

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**CELULAS MESENQUIMALES EN EL  
PACIENTE TRAUMATIZADO: ESTUDIO  
COMPARATIVO**

Raúl López Fernández

20/7/21



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

Prof. Dr. D. FRANCISCO LOZANO SÁNCHEZ, CATEDRÁTICO DE CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado " Células mesenquimales en el paciente traumatizado: estudio comparativo" cumple con los requisitos necesarios para ser defendido como trabajo para optar el grado de doctor por la Universidad de Salamanca.

Salamanca, a 20/07/2021.

Fdo. Dr. D. Francisco Lozano Sánchez.



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

Prof. Dr. D JUAN FRANCISCO BLANCO BLANCO, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado " Células mesenquimales en el paciente traumatizado: estudio comparativo" ha sido realizado bajo mi dirección por el Ldo. D. Raúl López Fernández en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al Grado de doctor de la Universidad de Salamanca.

Salamanca, a 20/7/2021.

Fdo. Dr. D. Juan Francisco Blanco Blanco.



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

Prof. Dr. D DAVID PESCADOR HERNÁNDEZ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado " Células mesenquimales en el paciente traumatizado: estudio comparativo" ha sido realizado bajo mi dirección por el Ldo. D. Raúl López Fernández en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al Grado de doctor de la Universidad de Salamanca.

Salamanca, a 20/7/2021.

Fdo. Dr. D. David Pescador Hernández.

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el proyecto GRS/1624/A/17 otorgado por la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León y por el Ayuntamiento de Salamanca mediante convenio sustentado en el artículo 83 LOU CLAVE L601.

Así mismo, el resumen de este trabajo ha sido aceptado para su publicación en la prestigiosa revista "Stem Cell Research & Therapy".



## Agradecimientos.

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado en este trabajo:

Al Dr. Juan Blanco, por haberme iniciado en el mundo de la investigación y haber invertido su tiempo y entusiasmo en sacar adelante este proyecto.

Al Dr. David Pescador, por su inestimable ayuda tanto en la parte técnica como académica.

A la Dra. Carmen da Casa, por todo el tiempo invertido y su buen hacer en el análisis de los datos.

Al servicio de Cuidados Intensivos del Hospital Universitario de Salamanca, especialmente al Dr. Javier González Robledo y al Dr. Luis Alfonso Marcos Prieto, por su exquisito trabajo en el cuidado de los pacientes y su desinteresada ayuda en la obtención de los datos clínicos necesarios.

Al laboratorio de Terapia Celular del Hospital Universitario de Salamanca, especialmente a Gerardo J. Martí Chillón, por su gran trabajo en el análisis de las MSCs de los pacientes incluidos en el estudio.

A Diana, por tu ayuda y apoyo en todo momento. Gran parte del tiempo que he empleado en la realización de este trabajo era tuyo.

A mi hermano, siempre empujándome a dar lo mejor de mí, ayudándome a alcanzar mis metas incluso cuando yo no lo creo posible.

Especialmente quiero agradecerse a mis padres. Sin vuestro sacrificio, esfuerzo y educación jamás habría llegado hasta aquí, ni en este ni en ningún otro proyecto de mi vida.





## Abreviaturas:

**TA** – tensión arterial.

**INR** – razón normalizada internacional

**TTPA** – tiempo de tromboplastina activado.

**MSCs** – células madre mesenquimales

**SIRS** – síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

**FC** – frecuencia cardíaca.

**LPM** – latidos por minuto.

**FR** – frecuencia respiratoria.

**T<sup>a</sup>**- temperatura.

**FN-kB** – factor nuclear kappa beta

**iFN-kB alfa** – inhibidor del factor nuclear kappa beta alfa

**TNF** – factor de necrosis tumoral.

**FMO** – fallo multiorgánico.

**PAF** – factor activador de plaquetas

**PCR** – proteína C reactiva.

**PCR** – reacción en cadena de la polimerasa (según contexto).

**NO** – óxido nítrico.

**iNOS** – inhibidor de óxido nítrico.

**IDO** – indolamina 2,3-dioxygenasa.

**PGE2** – prostaglandina E2.

**EAE** – encefalomiелitis experimental autoinmune.

**VE** – vesículas extracelulares.

**Ig** – inmunoglobulina.

**TGF-beta** – factor de crecimiento transformador beta

**VEGF** – factor de crecimiento del endotelio vascular.

**PDGF** – factor de crecimiento derivado de plaquetas.

**bFGF** – factor de crecimiento básico de fibroblastos.

**IGF-I** – factor de crecimiento de tipo insulina.

**CK** – creatinin quinasa.

**TLRs** – receptores Toll.

**PAMP** – patrones moleculares asociados a patógenos.

**SDRA** – síndrome de distress respiratorio del adulto.

**SF-D** – proteína surfactante D.

**RNM** – resonancia nuclear magnética.

**LES** – Lupus Eritematoso Sistémico.

**ICAM-1** – molécula de adhesión intracelular 1.

**VCAM-1** – molécula de adhesión vascular 1.

**PD-L1** – proteína de superficie inhibidora del ligando de muerte programada.

**HO-1** – hemo oxigenasa 1.

**LIF** – factor inhibidor de la leucemia.

**LPS** – lipopolisacáridos.

**RFA** – reactantes de fase aguda.

**SNC** – sistema nervioso central.

**STAT** – transductor de señal y activador de la transcripción.

**Fx** – fractura.

**TCE** – traumatismo craneoencefálico.

**TRA** – traumatología.

**COT** – cirugía ortopédica y traumatología.

**MID** – miembro inferior derecho.

**TTO** – tratamiento.

**ID** – intestino derecho.

**IQ** – intervención quirúrgica.

**CH** – concentrados de hematíes.

**EEII** – extremidad inferior izquierda.

**CPE** – ciático poplíteo externo.

**ATB** – antibiótico.

**SAMR** – stafilococo aureus meticilin resistente.

**PIC** – presión intracraneal.

**ESD** – extremidad superior derecha.

**HSA** – hemorragia subaracnoidea.

**UCI** – unidad de cuidados intensivos.

**TC** – tomografía computarizada.

**Hb** – hemoglobina.

**Hto** – hematocrito.

**Plaq** – plaquetas.

**Gluc** – glucosa.

**Cr** – creatinina.

**Na** – sodio.

**K** – potasio.

**Cl** – cloro.

**CPK** – creatina fosfo quinasa

**TP** – tiempo de protrombina.

**TTPA** – tiempo de tromboplastina activada.

**Fibrin** – fibrinógeno.

**INR** – ratio internacional normalizada.

**CEX** – consultas externas.

**RHB** – rehabilitación.

**MHC** – marcadores de histocompatibilidad.

# ÍNDICE

Tabla de contenido

<b>1. Introducción.</b>	<b>18</b>
<b>1.1 – Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.</b>	<b>20</b>
1.1.1 – Fisiopatología del SIRS.	21
1.1.2 – Evolución del SIRS.	24
1.1.3 – Procalcitonina y PCR como marcadores de sepsis.	25
1.1.4 – El síndrome de respuesta antiinflamatoria compensadora.	26
<b>1.2 – Las células madre.</b>	<b>27</b>
1.2.1 – Caracterización de las MSCs.	29
1.2.2 – Potencial de diferenciación.	30
1.2.3 – Fuentes de obtención de MSCs.	33
<b>1.3 – MSCs e inmunomodulación.</b>	<b>35</b>
1.3.1 – Propiedades inmunosupresivas de las MSCs.	36
1.3.2 – Papel de las micro vesículas en la inmunomodulación.	40
<b>1.4 – MSCs en paciente politraumatizados.</b>	<b>42</b>
<b>2. Hipótesis.</b>	<b>49</b>
<b>3. Objetivos.</b>	<b>49</b>
<b>4. Material y métodos.</b>	<b>50</b>
<b>4.1 – Diseño del estudio.</b>	<b>50</b>
<b>4.2 - Población de estudio.</b>	<b>51</b>
<b>4.3 – Obtención y análisis de las células mesenquimales.</b>	<b>53</b>
4.3.1 – Proceso de aspirado de cresta ilíaca.	53
4.3.2 – Separación de las células mononucleares.	55
4.3.3 – Aislamiento y expansión.	56
4.3.4 – Evaluación de la eficiencia celular.	57
4.3.5 – Análisis del contenido en Unidades Formadoras de Fibroblastos (CFU-U).	58
4.3.6 – Análisis de proliferación y ciclo celular.	58
4.3.7 – Análisis inmunofenotípico.	59
4.3.8 – Estudio de diferenciación in vitro.	60
<b>5. Resultados</b>	<b>61</b>

<b>5.1 – Pacientes estudiados: parámetros demográficos, clínicos analíticos y evolutivos.</b>	<b>61</b>
<b>5.2 – Estudio de MSC.</b>	<b>69</b>
5.2.1 - Aislamiento y expansión de MSC.	70
5.2.2 - Análisis de proliferación	70
5.2.3 - Análisis de la eficiencia celular y unidades formadoras de colonias (CFU-F).	72
5.2.4 - Análisis del ciclo celular	73
<b>5.3 - Estudio de la diferenciación <i>in vitro</i>.</b>	<b>74</b>
5.3.1 - Análisis inmunofenotípico.	76
<b>6. <i>Discusión.</i></b>	<b>83</b>
<b>7. <i>Conclusiones.</i></b>	<b>93</b>
<b>8. <i>Anexo.</i></b>	<b>95</b>
<b>9. <i>Bibliografía:</i></b>	<b>98</b>

## ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Tabla de pacientes y eventos incluidos en el estudio. ....	63
<b>Tabla 2.</b> Evolución de PCR durante el ingreso. ....	67
<b>Tabla 3.</b> Evolución de lactato durante el ingreso.....	67
<b>Tabla 4.</b> Evolución de procalcitonina durante el ingreso.....	68
<b>Tabla 5.</b> Evolución de hemoglobina durante el ingreso.....	68
<b>Tabla 6.</b> Evolución de leucocitos durante el ingreso. ....	69
<b>Tabla 7.</b> Valores representativos del estado de las fases de ciclo celular de las MSC de ambos grupos de estudio. ....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Aparición de SIRS. ....	22
<b>Figura 2.</b> Evolución de SIRS a FMO. ....	23
<b>Figura 3.</b> Evolución de SIRS y SRAC. ....	27
<b>Figura 4.</b> Diseño del estudio. ....	51
<b>Figura 5.</b> Proceso de obtención de muestra de médula ósea.....	55
<b>Figura 6.</b> Separación de células mononucleadas por gradiente de densidad. A) Muestra MO. B) Dilución de la muestra con Hanks. C) Muestra diluida sobre Ficoll. D) Interfase en la que están presentes las MSC. ....	56
<b>Figura 7.</b> Aislamiento y expansión. ....	56
<b>Figura 8.</b> Evaluación de la capacidad proliferativa en cultivo de las MSC de pacientes politraumatizados en comparación con los de cirugía programada siendo los valores acumulados en cada pase. ....	71
<b>Figura 9.</b> Valores del PDT de células de pacientes de cirugía programada y con politraumatismo. Se representa el tiempo requerido de las MSC para duplicar la población en cada pase. ....	72
<b>Figura 10.</b> Unidades formadoras de colonias fibroblásticas de muestras de médula ósea de <b>A.</b> pacientes de cirugía programada y <b>B.</b> pacientes con politraumatismo. ....	73
<b>Figura 11.</b> Análisis del ciclo celular poblacional de MSC de pacientes de <b>A.</b> cirugía programada y <b>B.</b> de politraumatismo. ....	74
<b>Figura 12.</b> Capacidad de diferenciación in vitro de MSC procedentes de pacientes con cirugía programada y politraumatizados. <b>A.</b> Tinción de Oil-Red para la identificación de MSC diferenciadas a adipocito tras 21 días de inducción de pacientes con cirugía programada y <b>B.</b> de pacientes politraumatizados. <b>C.</b> Actividad de fosfatasa alcalina para determinar la capacidad de diferenciación a osteoblasto pasados 10 días con medio de inducción de células de pacientes con cirugía programada y <b>D.</b> de pacientes con politraumatismo.....	75
<b>Figura 13.</b> Tinción de rojo de alizarina de MSC de <b>A.</b> cirugía programada y <b>B.</b> politraumatismo cultivadas durante 21 días en medio de diferenciación a osteoblastos (parte superior de las imágenes) y medio de cultivo para el control (parte inferior de las imágenes). ....	76



<b>Figura 14.</b> Caracterización inmunofenotípica de MSC de pacientes de cirugía programada (naranja) y pacientes politraumatizados (azul), por citometría de flujo con respecto a sus controles sin marcar (gris). Las bandas oscuras en los histogramas representan las MSC que han sido marcadas por los anticuerpos indicados en el eje de ordenadas. Los histogramas claros representan las células sin marcar con anticuerpos. ....	77
<b>Figura 15.</b> Niveles de expresión del marcador CD73 en las MSC de ambos grupos de estudio .....	78
<b>Figura 16.</b> Valores medios (eje vertical) en plasma de proteína C reactiva, lactato y procalcitonina de los pacientes politraumatizados con respecto a los días tras el accidente (eje horizontal). ....	79
<b>Figura 17.</b> Niveles de leucocitos en sangre de pacientes politraumatizados en los días posteriores al accidente.....	80
<b>Figura 18.</b> Correlación niveles en plasma de IL-6 con la severidad del politraumatismo de cada paciente.....	80
<b>Figura 19.</b> Correlación de los niveles en plasma de TNFa con la severidad del politraumatismo de cada paciente. ....	81
<b>Figura 20.</b> Correlación del valor ISS de cada paciente con los días de recuperación hasta el alta.....	82
<b>Figura 21.</b> Consentimiento informado.....	97

## 1. Introducción.

El paciente politraumatizado es un importante reto diagnóstico y terapéutico en la práctica médica. De acuerdo con la bibliografía científica, la primera vez que este término se ha utilizado fue en 1966 por Tscherne (1), que habla de ello para referirse a pacientes que presentaban “al menos 2 lesiones severas en el cráneo, tórax o abdomen” o “una de ellas asociada a la lesión de una extremidad”. Esta definición ha ido evolucionando con el tiempo hasta llegar al momento actual, en el que una revisión y consenso de 2014 (2) define como politraumatizado a aquel paciente que presenta “lesiones importantes en tres o más puntos de dos o más regiones anatómicas, unidas a una o más variables adicionales de 5 parámetros fisiológicos”. Estos 5 parámetros fisiológicos independientes a los que se refiere son la hipotensión (TA sistólica  $\leq$  90mmHg), el nivel de conciencia (Glasgow  $\leq$  8), la acidosis (exceso de bases  $\leq$  6.0), la coagulopatía (INR  $\geq$  1.4/ TTPA  $\geq$  40s), y la edad  $\geq$  70 años.

La importancia de la atención a este tipo de pacientes radica en la severidad de las lesiones y el potencial riesgo vital, por lo que una atención temprana y precisa puede cambiar el pronóstico del paciente. El traumatismo grave es actualmente la principal causa de muerte en las cuatro primeras décadas de la vida (3–5), también en nuestro país. Y no sólo hablamos de vidas, sino de las importantes secuelas que estos pacientes pueden tener y que afectan de forma directa a su calidad de vida, además de la repercusión socioeconómica, ya que se trata de pacientes jóvenes y laboralmente activos.

El principal problema que se plantea en este tipo de pacientes es, como hemos señalado, la mortalidad. Ésta sigue una distribución trimodal: en un primer momento, en los primeros minutos tras el accidente, la mortalidad acontece por las propias lesiones que presenta el paciente. La actividad asistencial no mejora esta primera etapa, únicamente la

prevención de los accidentes puede actuar aquí para disminuir la mortalidad. La segunda etapa de mortalidad es la que ocurre entre los primeros minutos a unas horas, es lo que se denomina “Golden hour”, y aquí la rápida y precisa atención sanitaria, juega un papel destacado en disminuir la mortalidad en este periodo. El tercer periodo comienza días o semanas después y suele ser consecuencia del desarrollo de sepsis o fracaso multiorgánico debido a las importantes lesiones que padece el paciente. En parte el presente trabajo aborda situaciones clínicas de este periodo.

Los artículos que nos hablan de las causas de muerte en el paciente politraumatizado, nos dicen que, en general, los daños en el SNC continúan siendo la principal causa de mortalidad, seguido de la pérdida sanguínea, la sepsis y fallo multiorgánico (6). Las muertes inmediatas y tempranas siguen estas causas, mientras que en el caso de las muertes tardías, las lesiones cerebrales secundarias y el fallo del sistema inmune son las principales causas (5).

En el estudio de Mestoui y cols. (7), estos autores analizan las causas e incidencia de mortalidad en su centro de Ámsterdam, obteniendo datos comparables al resto de Europa. Para empezar, el politraumatismo es más frecuente en varones (65% según este estudio). Reportan un 19,1% de mortalidad durante el ingreso, siendo las causas más frecuentes de mortalidad las reseñadas previamente. En cuanto al traumatismo desencadenante, las caídas de altura corresponden a más de la mitad de los traumatismos, seguidos de los accidentes de bicicleta. La media de edad de los politraumatizados que han fallecido es 58 años, significativamente mayor que la edad de los que han sobrevivido al traumatismo.

Para actuar sobre la mortalidad temprana, el Colegio Americano de Cirujanos adoptó en 1978 el protocolo de Soporte Vital Avanzado en Trauma. Varias revisiones se han ido publicando hasta la actual, publicada en 2013 (8). Se basa en una serie de medidas encaminadas a una rápida evaluación de las lesiones que permita identificar aquellas que pudieran poner en peligro la vida y actuar sobre ellas de forma secuencial y

ordenada.

En el caso de la mortalidad más tardía, en buena medida como se ha comentado puede estar determinada por el desarrollo de un cuadro de fallo multiorgánico que suele iniciarse con el llamado “síndrome de respuesta inflamatoria inadecuada”. Como su propio nombre indica, se trata de una situación fisiopatológica en la que la respuesta inmune es un factor determinante. En ocasiones acontece un fracaso en esta respuesta que puede ser causa de fallo multiorgánico y muerte. Por otro lado, disponemos de suficiente información que avala la capacidad de las células madre mesenquimales (MSCs) como inmunomoduladoras de la respuesta inmune frente a determinadas noxas. Diversos estudios señalan así mismo el posible rol terapéutico de estas poblaciones celulares en alteraciones inmunes (9–11). Sobre la posible implicación que pueden tener las MSCs en este síndrome de respuesta inflamatoria sistémica trata este trabajo.

### 1.1 – Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

La respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) es un mecanismo de defensa inespecífico que entraña una situación de gravedad y que guarda estrecha relación con el desarrollo de fallo multiorgánico cuando su intensidad es alta o no se limita en el tiempo. Los signos clínicos y de laboratorio de inflamación sistémica, incluyen cambios en la temperatura, taquicardia, leucocitosis o aumento de frecuencia respiratoria. Sus valores definitorios serían:

- FC > a 90 lpm.
- FR > 20 respiraciones por minuto o bien menos de 32 mmHg de O<sub>2</sub> en una gasometría arterial.
- T<sup>a</sup> > 38 °C o < de 36°C.
- Leucocitos > 12000/mm<sup>3</sup> o leucopenia < de 4000/mm<sup>3</sup>.

Como ya hemos dicho, el síndrome de respuesta inflamatoria

sistémica indica gravedad. El grado de presentación y sobre todo la duración de este tiene una importante relación con el pronóstico.

Los criterios diagnósticos del SIRS han sido muy criticados por su alto grado de sensibilidad y poca especificidad, y es por ello que no debe utilizarse para determinadas situaciones, como para la atención de pacientes en el servicio de urgencias (12).

### 1.1.1 – Fisiopatología del SIRS.

El evento inicial para que comience a desarrollarse el SIRS es la lesión tisular. El endotelio vascular es el órgano encargado de iniciar los eventos y de mantenerlos en el tiempo. La lesión puede ser de diversos tipos, tanto mecánica, calórica, por hipoxia-reperfusión o por radicales libres. Estos eventos inician la liberación de citoquinas y mediadores de la inflamación (13).

Estas citoquinas activan al factor nuclear Kappa-Beta (FN-kB). Este factor es activado por la acción sobre receptores de membrana de citoquinas proinflamatorias, sintetizadas por macrófagos activados, radicales libres, virus, proteínas bacterianas, lipopolisacáridos y linfocitos T, dependiendo de la etiología del cuadro. Una vez que son activados, estos receptores de membrana proinflamatorios activan diferentes proteinquinas citoplasmáticas que fosforilan y degradan al inhibidor del Factor Nuclear-kB alfa (iFN-kB alfa). Una vez libre, el FN-kB se traslada al núcleo en donde se une a la región promotora de los genes que median la síntesis de las diferentes citoquinas y moléculas involucradas en el SIRS. En esta fase, la síntesis de nuevas citoquinas perpetúa la activación del FN-kB cerrando un círculo de activación-activación que se puede prolongar en el tiempo.

Igualmente, los radicales libres actúan a nivel intracelular desencadenando una cascada que libera también al FN-kB permitiendo su función. El FN-kB en el núcleo facilita el proceso de transcripción de los genes involucrados en la inflamación, como son el factor de necrosis tumoral (TNF), y el receptor de IL-2, los cuales activan al FN-kB

amplificando la cascada.

Otros factores transcripcionales como la proteína activadora 1, la proteína sérica 1, el factor nuclear y la IL-6, potencian la acción del FN-kB y amplifican la síntesis de las interleuquinas 1,6 y 8, el TNF y la sintetasa de óxido nítrico, mediante un efecto de retroalimentación positiva.

Como hemos visto, el FN-kB es a su vez factor de transcripción para la síntesis de su inhibidor, el iFN-kB alfa. Esto es sumamente importante dado que constituye el inicio de la autorregulación negativa para bloquear la cascada molecular que perpetúa la síntesis de mediadores del SIRS y favorece la aparición de la respuesta inflamatoria sistémica compensatoria.

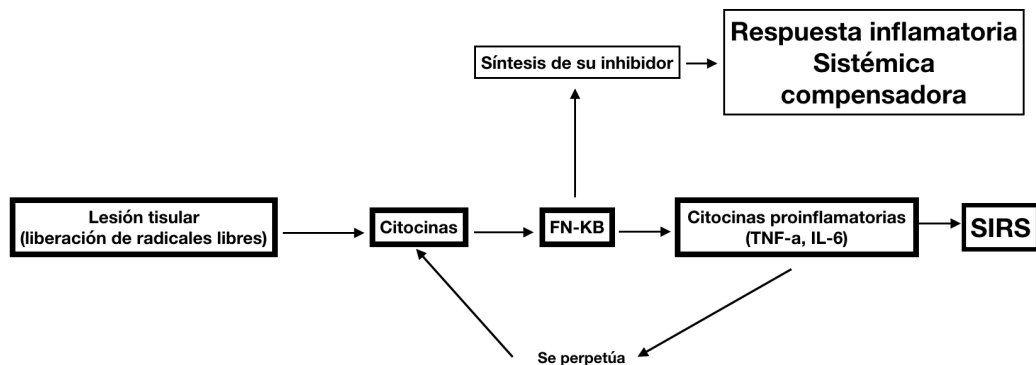


Figura 1. Aparición de SIRS.

Una vez iniciada esta respuesta antiinflamatoria sistémica, la capacidad de adaptación del huésped dependerá de la prontitud de inicio del SIRS, la gravedad de la respuesta, del inicio de la respuesta antiinflamatoria compensatoria y de la capacidad de adaptación orgánica.

La IL-6, uno de los factores transcripcionales que se liberaban en el proceso, es responsable de la coordinación de la respuesta en la fase aguda, que consiste en fiebre, taquicardia, leucocitosis, alteración de la permeabilidad vascular e incremento de la producción de proteínas de fase aguda.

Además de todos los mediadores inflamatorios descritos, se han descubierto también una serie de factores de crecimiento angiogénicos implicados en la respuesta inflamatoria, como son la angiopoyetina 1 y 2.

En la gravedad del proceso pueden tener alguna importancia el grado de reposición volumétrica que se haga en las primeras horas al paciente, la presencia de procesos infecciosos, el volumen de tejido no viable y la translocación bacteriana.

En el SIRS existe también una redistribución de los nutrientes con la intención de hacer frente al proceso lesivo; también existe un aumento importante en la gluconeogénesis, la proteólisis, lipólisis y producción de ácido láctico, con el fin de mantener activas las líneas de defensa, lo cual mantiene un cambio sostenido en las rutas metabólicas. Los micronutrientes también sufren cambios importantes en su metabolismo, sobre todo los implicados en los procesos de óxido-reducción (14) . La capacidad antioxidante es drásticamente disminuida frente a una producción sostenida y excesiva de radicales libres, tanto derivados del oxígeno como del óxido nítrico. El estrés oxidativo contribuye de forma puntual en el desarrollo del SIRS; los radicales libres no solo producen lesión directa celular mediante la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares, sino que también incrementan la producción de citoquinas proinflamatorias. Además, el estrés oxidativo contribuye al desarrollo temprano de disfunción hepática al disminuir los niveles de glutatión local, lo cual favorece la lesión hepática por radicales libres (15).

Todos estos disturbios son consecuencia de la activación inicial y sostenida del sistema inmune innato, el cual provoca y mantiene un estrés oxidativo. Esto mantiene el proceso inflamatorio, constituyendo así un factor clave fisiopatológico que ocasiona el SIRS y finalmente el fallo multiorgánico (FMO).

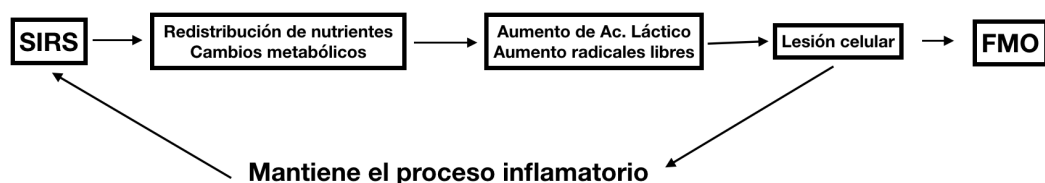


Figura 2. Evolución de SIRS a FMO.

### 1.1.2 – Evolución del SIRS.

Como ya hemos visto en el apartado anterior, la primera fase del desarrollo de la respuesta inflamatoria es una respuesta proinflamatoria, seguida de una respuesta antiinflamatoria que trata de compensar la anterior (13).

La disfunción endotelial inicial, provoca alteraciones en el equilibrio de óxido-reducción por culpa de los radicales libres, y la liberación de citoquinas activa los neutrófilos con liberación de enzimas proteolíticas, lo que mantiene la disfunción endotelial (16).

Los cambios hemodinámicos que encontramos en el paciente con SIRS son: bajas resistencias vasculares y alto gasto cardiaco. Esto sucede para tratar de mantener la perfusión sistémica en rangos adecuados, pero al existir lechos capilares abiertos sin necesidades metabólicas que lo justifiquen, una importante cantidad de este gasto cardiaco no se emplea correctamente. Al final estas alteraciones de la perfusión harán que el paciente desarrolle un estado de choque. Esta respuesta hemodinámica se divide en tres etapas:

- 1) Fase 1: existe un aumento en las resistencias vasculares tanto sistémicas como pulmonares mediada por ciclooxigenasa. Esta respuesta vasomotora no es igual en todas las zonas. Así, el lecho esplácnico responde de una forma más intensa, lo que ocasiona isquemia órgano regional, generación de radicales libres y favorece la translocación bacteriana, uno de los factores más importantes para mantener el proceso inflamatorio sistémico.
- 2) Fase 2: caracterizada por el aumento en la permeabilidad endotelial, especialmente en el pulmón. Mediada por el TNF-alfa, IL-6 y el factor activador de plaquetas (PAF).
- 3) Fase 3: en esta fase los cortocircuitos se incrementan de forma muy importante, se intensifica la vasoconstricción pulmonar hipóxica (para limitar la circulación pulmonar desperdiciada), y comienza la disfunción miocárdica.



La respuesta inflamatoria, como vemos, no se traduce solamente en cambios o alteraciones humorales, sino que hay una traducción estructural que puede conducir a disfunción orgánica.

### 1.1.3 – Procalcitonina y PCR como marcadores de sepsis.

Muchos esfuerzos se han encaminado a intentar diferenciar entre respuesta inflamatoria sistémica originada por un proceso séptico de los no sépticos, con el fin de limitar el uso de antibióticos. El uso de la PCR y la procalcitonina para este fin ha dado resultados prometedores, aunque no se puede decir que sean universalmente aceptados como criterios de infección (13).

La proteína C reactiva es un pentámero con actividad antiinflamatoria de síntesis hepática. Tiene también función de opsonizar bacterias, parásitos y hongos. Una vez iniciado el estímulo, su síntesis se inicia en unas 4-6 horas, doblando su valor cada 8h aproximadamente, y alcanzando su máximo en torno a las 50 horas. Una vez el estímulo cesa, sus cifras descienden con una vida media de aproximadamente 19 horas. Su especificidad para detectar un proceso infeccioso esta en torno al 50 %, aunque su sensibilidad llega al 91 % en algunas series. Esto hace que con ella sea capaz de descartarse un proceso infeccioso. Probablemente tenga más utilidad en el seguimiento del proceso que en su diagnóstico. Así, podemos encontrarnos varias situaciones:

- I. Patrón de infección simple, con elevación inicial seguida de disminución gradual.
- II. Elevación persistente que se mantienen hasta que se consigue eliminar el foco, como ocurre en los abscesos.
- III. Proceso complicado y no resuelto, donde se mantiene en elevación constante.
- IV. Niveles que después de una elevación inicial se elevan de nuevo, y deben hacer sospechar una reactivación.

En el caso de la procalcitonina, se trata de una proteína glucosilada, producida principalmente en los macrófagos y a nivel hepático, siguiendo

la vía de síntesis dependiente del FN-kB. Su estímulo principal de producción es un proceso inflamatorio sistémico por medio de citoquinas, TNF, y sobre todo endotoxinas. Una vez iniciado el estímulo, su síntesis se inicia en unas 4 horas, con un pico a las 6 horas y una vida media de 25-30 horas. Su utilidad sigue siendo controvertida, ya que se ha demostrado que en pacientes postoperados o traumatológicos, la procalcitonina se eleva de forma importante durante unos 3 días, por lo que su utilidad en este tiempo es muy limitada (17).

Por otro lado, si se combinan ambas pruebas, el rendimiento diagnóstico mejora. Si nos encontramos en un paciente con una elevación de PCR y procalcitonina, la posibilidad de que tenga un proceso infeccioso llega a ser del 85% (18),(19).

#### 1.1.4 – El síndrome de respuesta antiinflamatoria compensadora.

Cómo hemos visto anteriormente, en un intento de regular la respuesta inflamatoria masiva se desencadenará una respuesta antiinflamatoria compensadora (SRAC) (20). Esta respuesta tiene como objetivo controlar a la anterior y conseguir un equilibrio entre ambas mientras se consigue eliminar el factor desencadenante. Si este no se controla, o la respuesta antiinflamatoria es ineficiente, es cuando el paciente evoluciona progresivamente a FMO y a la muerte.

Existe también la posibilidad de que se desarrolle una hiperreactividad de la respuesta antiinflamatoria, llevando al enfermo a un estado de anergia e inmunosupresión que lo hace susceptible a las infecciones y a la imposibilidad de controlarlas. Acontece una disminución en la expresión de los antígenos HLA-DR y HLA-DQ, así como una tendencia a una disminución en la síntesis de citoquinas proinflamatorias y radicales libres de oxígeno. Los niveles elevados de interleucina 10 y de factor de crecimiento beta suprimen la expresión a nivel de los monocitos de antígenos de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad, lo que a su vez bloquea la proliferación de linfocitos T. Existe además un bloqueo en la activación de los macrófagos por citoquinas, un desequilibrio en la

síntesis de anticuerpos y disfunción local de los polimorfonucleares. Un gran número de enfermos que evolucionan a esta fase mueren con relación a la infección, por ser imposible su control a pesar del uso de antibióticos.

El conseguir un buen balance entre ambas respuestas (inflamatoria y antiinflamatoria), depende de la gravedad de la agresión inicial, de la situación del sistema inmune, de los determinantes genéticos del huésped, y de la interacción molecular a nivel de la respuesta inmune. Todo ello determinará el camino que seguirá la respuesta inflamatoria, que puede ir desde el autocontrol al fallo multiorgánico (FMO).

Teóricamente se puede concluir que cuanto mayor sea la lesión inicial y peor la autorregulación y reserva orgánica, más probable es la evolución a una respuesta inflamatoria sistémica más agresiva, al paro inmunológico y al FMO y la muerte.

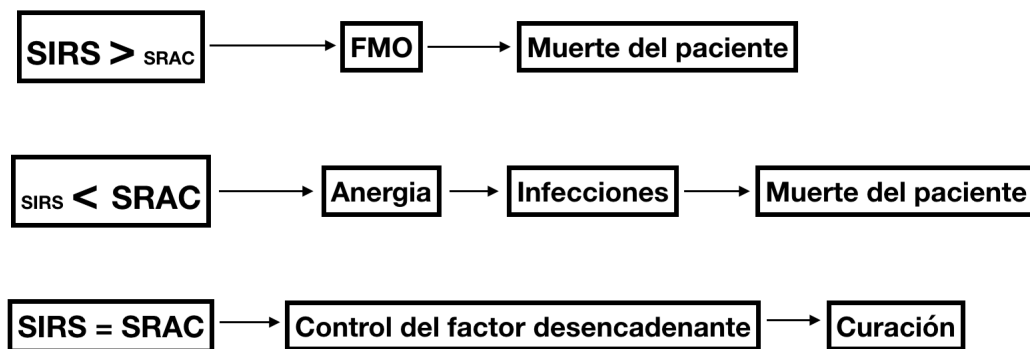


Figura 3. Evolución de SIRS y SRAC.

## 1.2 – Las células madre.

Una célula madre o troncal, también denominada “Stem cell”, se define como aquella que tiene las siguientes características (21).

- Capacidad de autorrenovación o de formar durante su división al menos una copia idéntica de la célula inicial, con las mismas características y propiedades biológicas.
- Capacidad de diferenciación hacia una (o varias) células maduras con función especializada.
- Capacidad de proliferación a largo plazo.

En los años 60, los experimentos de Till y McCulloch basados en el trasplante de células mononucleadas de médula ósea en ratones letalmente irradiados, demostraron por primera vez la existencia de células con estas propiedades en la médula ósea, las células madre hematopoyéticas (22).

Más tarde, cada vez más estudios han demostrado que la médula ósea contiene células madre con mayor versatilidad que las células madre hematopoyéticas, las células progenitoras del estroma medular, o células madre mesenquimales (23). Hay por ello cada vez más interés en el aislamiento y expansión de estos tipos celulares por su potencial empleo como herramienta terapéutica en programas de terapia celular somática.

Entre los tipos celulares aislados en M.O. con mayor versatilidad se encuentran las MAPS (del inglés "Multipotent Adult Progenitor Cells"), descritas inicialmente por el grupo de investigación de la Dra. Verfaillie (21), (24)(25)(26)(27), que poseen capacidad de diferenciación in vitro hacia tipos celulares derivados de las tres líneas embrionarias. Otro tipo de célula madre que está presente en la MO adulta es el denominado hemangioblasto (célula que previamente se creía limitada a etapas precoces del desarrollo embrionario), con capacidad de diferenciación tanto a línea hematopoyética como endotelial (28)(29)(30)(31).

Diversos autores han descrito otros tipos celulares en la médula ósea, y dependiendo del método y/o características de estos los han denominado de distinta forma. Así, podrían existir en la MO las llamadas células MIAMI (del inglés "human marrow isolated adult multilineage inducible cells") o las células VSEL (del inglés "very small embryonic-like stem cells").

Finalmente, junto a éstas, existen otras células madre más restringidas en su capacidad de diferenciación y descritas con anterioridad, como las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), y las células stem mesenquimales (MSC).

Las CPH son las encargadas de la regeneración del tejido hematopoyético y por tanto de mantener la producción celular durante toda

la vida del individuo para cubrir el recambio celular que se produce de forma continua.

Las MSC fueron estudiadas por primera vez por Friedestein y col. Denominándolas entonces CFU-F (unidad formadora de colonias fibroblásticas) (32).

El interés por estas células ha ido creciendo debido a las capacidades que poseen. En primer lugar, por su capacidad de diferenciación hacia linajes celulares derivados del mesodermo, así tejido óseo, graso o cartilagosos. Esto las convirtió en un objeto de estudio relevante como fuente para la terapia celular orientada a la regeneración tisular. En segundo lugar por su capacidad inmunorreguladora (33). La interacción entre las células del estroma y las CPH es fundamental para mantener una hematopoyesis eficaz (34) (35)(36), de alguna manera esas células actúan como reguladoras y favorecedoras de algunos procesos tisulares. Diversos estudios mostraron cómo este tipo celular tenía la capacidad de influir a través de mediadores en diversos procesos tisulares.

### 1.2.1 – Caracterización de las MSCs.

A la hora de identificarlas, en cultivo estas células suponen una población heterogénea de células de aspecto fibroblástico y morfología fusiforme. Ahora bien, los datos existentes sobre su caracterización indican que estas células comparten características inmonofenotípicas con células endoteliales, epiteliales y musculares (37–46). Además, carecen de marcadores específicos de otros tipos celulares presentes en MO o en sangre periférica (SP), como son el CD14 (monocitos), CD34 (célula stem hematopoyética), CD 45 (marcador panleucocitario) o CD19 (linfocitos B) (24),(40),(41),(47),(43),(44),(46).

En la actualidad no se conoce ningún marcador específico que defina a las MSC. Por este motivo, y para evitar la dificultad a la hora de comparar diferentes trabajos sobre las MSC, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, del inglés “International Society for Cellular

Therapy”) propone unos criterios mínimos para definir una MSC (48). Estos criterios son:

- Las MSC deben tener capacidad de adherencia al plástico cuando se mantienen en condiciones estándar de cultivo.
- Deben expresar determinados marcadores (CD105, CD73, y CD 90) y no expresar otros marcadores específicos de diversas líneas hematopoyéticas como CD45 (panleucocitario), CD34 (células progenitoras hematopoyéticas), CD14 o CD11b (monocitos), CD79alfa o CD19 (linfocitos B) ni tampoco expresar moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA-DR).
- Las MSC deben mostrar capacidad de diferenciarse in vitro hacia osteoblasto, adipocito y condroblasto.

#### 1.2.2 – Potencial de diferenciación.

Los primeros estudios realizados sobre células mesenquimales iban encaminados a ver la capacidad que tenían estas células para diferenciarse únicamente hacia células del tejido al cual pertenecían. Sin embargo, en estudios posteriores, han ido demostrando su capacidad para diferenciarse hacia múltiples líneas celulares (49).

Una de las formas de identificar las MSC es por su capacidad para diferenciarse “in vitro” hacia hueso, cartílago y grasa (32). Pueden además diferenciarse a otros tejidos como tenocitos, miocitos esqueléticos, células del mesodermo, del ectodermo y del endodermo (44)(50)(51).

A partir de esto se propone la posibilidad de diferenciar entre las células progenitoras mesenquimales, esto es, los precursores del estroma medular con capacidad de diferenciación mesenquimal, y las verdaderas células mesenquimales, con posibilidad de diferenciación hacia distintos tejidos tanto de origen ectodérmico como endodérmico (50).

En cualquier caso, en algunas ocasiones su capacidad para generar nuevos tejidos depende de la programación de expresión génica, mientras

que en otros casos depende probablemente de la presencia de ciertos factores solubles (33).

Como ya hemos dicho en el inicio de este capítulo, según la sociedad internacional de terapia celular, la diferenciación a adipocito, osteoblasto y condrocito es necesaria para la caracterización de las MSC:

### **Diferenciación a osteocito**

La diferenciación osteogénica requiere la presencia de beta-glicerolfosfato, ácido ascórbico-2-fosfato, dexametasona y suero bovino fetal. La diferenciación se evidencia cuando adquirimos las células con morfología osteoblástica y por la expresión de la actividad de la fosfatasa alcalina, apareciendo incluso depósitos de calcio, que se observan tras realizar la tinción con BCIT-NBT.

### **Diferenciación a adipocito**

Para conseguir la diferenciación hacia adipocito, las MSC deben incubarse con dexametasona, insulina, isobutilmetilxantina, e indometacina. En este caso, lo que veremos son vacuolas lipídicas dentro de las células, que expresan el receptor PPAR-gamma-2, lipoproteinlipasa y la proteína ácida P2 (44). Con el tiempo las vacuolas lipídicas se agrupan y van llenando el citoplasma celular. Estos acúmulos de lípidos se estudian histológicamente con oil red O (32). En distintos estudios se ha tratado de identificar el mecanismo que regula la conversión de las MSC en adipocito. El PPAR-gamma-2, es un activador de la diferenciación hacia adipocito, mientras que actúa negativamente sobre la diferenciación hacia osteoblasto (52). Esto hace pensar en una relación recíproca entre la osteogénesis y la adipogénesis, de forma que la diferenciación por un camino restringe la expresión de genes específicos del otro linaje (53).

### **Diferenciación a condrocito**

Para la diferenciación cartilaginosa se ha decidido evaluar la

expresión de genes de diferenciación a condrocitos, siendo importantes los genes SOX-9-factor de transcripción y COL1A1-colágeno.

Además de estos tejidos, el abanico de posibilidades de diferenciación de estas células es muy amplio. Todos los estudios tanto in vitro como in vivo, demuestran que la población de células mesenquimales puede diferenciarse hacia distintos linajes. Se conoce con el nombre de mesengénesis al proceso por el cual se diferencian los distintos tejidos mesenquimales a partir de las MSC. Así, durante el estado adulto, los vertebrados conservan la capacidad de reparar sus huesos, cartílagos, tendones, músculos, y el propio estroma medular, el tejido adiposo y cualesquiera otros tejidos conectivos (54).

Existen en la literatura varios estudios que emplean esta capacidad de diferenciación de las MSC hacia las diferentes líneas en nuestro beneficio. Por ejemplo, el grupo de Blanco y cols. (55) han publicado en 2019 el uso de trasplante de MSCs autólogo junto con fosfato tricálcico como complemento de la fusión espinal postero-lateral, con muy buenos resultados de fusión, control del dolor local y control del dolor radicular en estos pacientes, utilizando la capacidad de las MSCs de producir o regenerar el tejido óseo. No es el único trabajo en esta línea, también el trabajo de Pescador y cols. (56) emplea MSCs junto a un “carrier” de una proteína sintética, la elastina, para tratar defectos osteocondrales previamente inducidos en la rodilla de conejos. Los resultados son igualmente prometedores, con formación de cartílago hialino “de novo” y reparación del hueso subcondral de los roedores.

Otra característica interesante de las MSC es su capacidad de secretar múltiples citoquinas, ya sea en reposo o tras estimulación. Estas citoquinas van desde factores de crecimiento hematopoyético hasta no hematopoyético y sugieren que las MSC están implicadas en el desarrollo del estroma medular, y por tanto de las propias células mesenquimales por mecanismos autocrinos.

Además, se ha demostrado también la presencia de receptores para citoquinas y factores de crecimiento. La interacción entre los distintos factores y sus receptores hace pensar que las MSC están implicadas de



forma dinámica en el mantenimiento del micro ambiente celular (44–46,48)(57).

### 1.2.3 – Fuentes de obtención de MSCs.

La posibilidad de obtener MSC de distintas especies y localizaciones ha sido objeto de reciente interés.

Pueden, por un lado, aislarse de múltiples especies. Las más conocidas son de origen humano, ratón y rata (44,58), pero existen muchas otras.

En cuanto a localizaciones, por su fácil accesibilidad, la fuente mejor estudiada es la médula ósea, aún sabiendo que su presencia en dicho tejido representa solamente 0,01-0,0001% de las células nucleadas de una médula ósea humana. Ahora bien, se han conseguido aislar MSC de recolecciones de células madres de sangre periférica movilizada (59) (la modalidad de donación de progenitores hematopoyéticos de uso más extendido en la actualidad)(60), de muestras fetales obtenidas durante el primer trimestre del embarazo, tanto sanguíneas como de hígado o médula ósea, pulmón fetal, de las vellosidades coriogénicas de la placenta y del fluido amniótico (61–64). Una pequeña proporción de MSC puede también ser aislada de sangre procedente del cordón umbilical, de sangre periférica del adulto y de mujeres sanas durante el embarazo (65–67). Parecen ser células de origen fetal que persisten en el organismo durante años (33).

Existen diversidad de trabajos que proponen otros tipos de fuentes de obtención de MSCs, que van desde grasa, cuero cabelludo, ligamentos periodontales, tejidos prenatales como la placenta, médula fetal, sangre, pulmón, hígado o bazo (63), (68–70).

El estroma medular consta de los siguientes tipos celulares:

#### **Células endoteliales**

Podrían estar implicadas en la diferenciación de los adipocitos, ya

que tienen capacidad de estabilizar la lipoproteinlipasa necesaria para el almacenaje lipídico. Por otra parte, su capacidad de endocitosis, hace que se comporten como la barrera más importante para la entrada y salida de agentes químicos y partículas del espacio hematopoyético (71).

### **Células reticulares**

Dan soporte físico al nicho hematopoyético y sintetizan las fibras reticulares. La íntima relación entre las células reticulares y las hematopoyéticas hace pensar que estas inducen y regulan la hematopoyesis (72).

### **Adipocitos**

Ya que en la hematopoyesis in vitro los adipocitos se sitúan en las áreas de granulopoyesis activa, su presencia se utiliza como marcador de productividad hematopoyética en un cultivo (73,74).

### **Fibroblastos**

Los fibroblastos constituyen una matriz de apoyo para el desarrollo de células del estroma, ya que son capaces de mantenerse durante largos periodos de tiempo en cultivos in vitro. Su implantación en la cápsula renal induce la formación de estroma óseo y hematopoyesis (75), ahora bien, al no mantener la proliferación de la célula madre hematopoyética, no se pueden considerar como componentes funcionales del mismo (72).

### **Macrófagos**

Aunque no tienen su origen en células estromales, se considera que forman parte funcional del mismo (71). Están implicados en la diferenciación granulopoyética, en la maduración de la línea eritroide y en la producción de diversos factores reguladores.

### 1.3 – MSCs e inmunomodulación.

Por su amplia distribución en los tejidos, alta capacidad de diferenciación y establecidos efectos en estudios tanto preclínicos como clínicos, se cree que las MSCs podrían tener un importante papel en la reparación de tejidos dañados (76). Como hemos visto en apartados anteriores, la lesión tisular se asocia con la activación de células inflamatorias e inmunes, no sólo macrófagos y neutrófilos, sino también células inmunes adaptativas, incluyendo linfocitos T CD4+, CD8 + y células B, que son reclutadas por células apoptóticas, tejido necrótico o daño microvascular. Además, existen mediadores de la inflamación como el TNF alfa, IL-1 o radicales libres, producidos por los fagocitos en respuesta al daño celular. Todas estas células y moléculas inflamatorias, junto con células endoteliales y fibroblastos, producen cambios en el microambiente que llevan a la movilización de las MSC hacia los tejidos dañados. Estas MSC pueden provenir del propio tejido o ser captadas desde la médula ósea. Sin embargo, el mecanismo por el cual las células MSC son captadas no es bien conocido. Una vez allí, estas células son capaces de secretar multitud de factores de crecimiento y citocinas, que promueven el desarrollo de nuevos fibroblastos, células endoteliales y células propias de los tejidos, que llevarán a cabo la regeneración y reparación.

Además de su función en la reparación de tejidos, existe evidencia cada vez más fuerte de las propiedades inmunomoduladoras de las MSC. Varios ejemplos existen en la literatura. Jiang y colaboradores, describieron que las MSCs retienen a las células dendríticas en un estado de inmadurez inhibiendo la expresión de marcadores de histocompatibilidad (MHC) de clase II, CD1-alfa, CD40, CD80 y CD86, y suprimiendo la producción de citocinas proinflamatorias (77). También se ha demostrado que las MSCs inducen a los macrófagos a secretar IL-10 tanto in vitro como in vivo (78). Así mismo, las células NK también pueden ser suprimidas por las MSCs a través de factores solubles, como el TGF-beta y prostaglandina E2 (79). En cuanto a la respuesta inmune adaptativa, se sabe que las MSCs inhiben la

proliferación de células T, desencadenada por multitud de estímulos, para regular a la baja la producción del INF-gamma (80,81). Además, tienen también acción sobre los linfocitos B, reduciendo su proliferación por contacto célula-célula y mediante la secreción de factores solubles (82). Por si fuera poco, también existe evidencia de que favorecen la expansión de células T reguladoras, que aumentan aún más esta acción inmunomoduladora (83).

Estudios bastante recientes han sugerido que las funciones inmunosupresoras de las MSC están desencadenadas por el microambiente que las rodea, en el que gran cantidad de factores inflamatorios son lanzados por las células inmunes (84,85). Esto también se ha visto que puede estar influido por el micro ambiente especial de cada enfermedad, como se desprende de estudios en lupus eritematoso sistémico (9) o en enfermedad de injerto contra huésped (10).

### 1.3.1 – Propiedades inmunosupresivas de las MSCs.

Como ya se ha hablado en el apartado anterior, se ha demostrado que la capacidad de las MSC para inhibir la respuesta inmune está influenciada por el ambiente inflamatorio. El INF-gamma combinado con una de las citoquinas proinflamatorias (TNF-alfa o IL-1), puede estimular a las MSCs para secretar niveles muy altos de factores inmunosupresores, así como una cascada de quimiocinas y moléculas de adhesión (86). Toda esta acción lleva a una acumulación de células inmunes en proximidad a las MSCs, fabricando un microambiente en el cual los efectos de los factores locales producidos por las MSCs son amplificados y llevan a una potente inmunosupresión.

Muchas moléculas, la mayoría inducidas por citocinas inflamatorias, se han relacionado con la inmunosupresión mediada por MSCs. Explicaremos ahora cómo actúan en la inmunosupresión estos factores (87).

- **NO.**

Se sabe que las altas concentraciones de óxido nítrico inhiben la respuesta inmune, por mecanismos que continúan sin identificarse (88). Estas altas concentraciones llevan a la supresión del transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) en células T e inducen la apoptosis in vitro de las células inmunes (89). In vivo, la supresión de la actividad del inhibidor de NO (iNOS), ya sea de forma química o genética, disminuye de forma importante el efecto terapéutico de las MSCs en modelos ratones (84,90). Otros estudios también sugieren que las MSC son mediadores importantes en la inmunosupresión inducida por *Mycobacterium tuberculosis*, en un mecanismo dependiente de NO tanto in vitro como in vivo (91). No obstante, el NO es una especie oxidativa extremadamente lábil y sólo puede actuar en proximidad íntima a las células que lo producen (92). La actividad biológica del NO disminuye notablemente con tan sólo unos centímetros de distancia (93). Esto explica por qué la inmunosupresión mediada por MSCs disminuye de forma importante cuando se separan con una membrana semi permeable en algunas investigaciones (85). Para realizar su acción inmunosupresiva, después de la estimulación por citocinas inflamatorias, las MSC producen grandes cantidades de quimiocinas y moléculas de adhesión, especialmente los ligandos de CXCR3 y CCR5, la molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1 y la molécula de adhesión vascular (VCAM)-1 (85,94). A través de la acción sinérgica de estas moléculas, las células inmunes se acumulan en proximidad a las MSCs, donde la alta concentración de NO secretado puede suprimir a estas células inmunes (87).

- **Indolamina 2,3-dioxygenasa (IDO).**

El papel de la IDO en la inmunoregulación provocada por las MSCs ha sido demostrado recientemente mediante la supresión de varias poblaciones celulares, incluyendo células T y NK (81,95,96). En el estudio de este tema, se ha visto una diferencia en cuanto a la inmunomodulación producida por MSCs en diferentes especies. Como hemos visto en el apartado anterior, existen estudios que demuestran que los ratones utilizan el NO, mientras que humanos o monos utilizan la IDO (84),(81,95). Lo que

hace la IDO es catalizar un paso limitante de la degradación del triptófano, un aminoácido esencial. El resultado es la disminución local de este aminoácido y de sus metabolitos inmunomoduladores, lo que se cree que contribuye al efecto inmunomodulador de las células que expresan esta molécula (97). La expresión de IDO no es constitutiva, sino inducible por el estímulo de IFN-gamma y otras citocinas inflamatorias como TNF-alfa o IL-1. Es importante señalar que la disminución de triptófano y sus metabolitos se produce de forma local, y que la cantidad total de triptófano en el cuerpo no disminuye de forma significativa. Aunque el papel exacto de estos metabolitos en la inmunosupresión no se conoce, si se sabe que, como en los ratones, las MSCs humanas secretan cantidad de moléculas que atraen a las células inmunes a su proximidad y sirven para amplificar sus efectos (84).

- **Prostaglandina E2 (PGE2).**

Esta molécula es otra de las moléculas inmunosupresivas producidas por las MSCs ante el estímulo inflamatorio. Hay estudios que hablan de la implicación de la PGE2 en la supresión de células T, NK y macrófagos mediado por MSCs (78,96,98). En un modelo de ratón con artritis, la IL-6 dependiente de PGE2 ha demostrado un importante papel en los efectos terapéuticos de las MSC (99). También ha demostrado in vivo provocar una sobreexpresión de IL-10 en macrófagos, contribuyendo a la atenuación del proceso séptico en ratones (78). Es importante señalar que el efecto de la PGE2 en la inmunoregulación mediada por MSC se ejerce en combinación con otras moléculas inmunosupresivas, como estamos viendo en este apartado. En humanos, se ha encontrado que la PGE2 actúa junto con IDO alterando la producción de células T, así como la proliferación, citotoxicidad y la producción de citocinas de las células NK (96,100).

- **TSG6.**

TSG6 es una proteína anti-inflamatoria que se expresa en varias células de pacientes con enfermedades inflamatorias o autoinmunes, y que

es inducible por un conjunto de citocinas inflamatorias como el TNF-alfa o IL-1 (101). Existen estudios en ratones que hablan de las propiedades de esta molécula (102). Recientemente, se ha demostrado que la TSG6 producida por las MSCs humanas alivian la peritonitis inducida por zimosán en ratones, a través de la reducción de la señal del receptor Toll-like (TLR)2/NF-kB en macrófagos (103). Si el TSG6 actúa sólo o con otras moléculas anti-inflamatorias como las que estamos viendo (NO, IDO, PGE2...) no está claro, y necesitaría nuevos estudios (87).

- **Quimiocina CCL2.**

La acción de la CCL2, que actúa como un antagonista de su receptor CCR2, ha sido descrita en la inmunosupresión mediada por MSCs en EAE (encefalomielitis experimental autoinmune) (104). Las MSCs deficientes en CCL2 tienen mucha menor capacidad de inhibir la secreción de IL-17 por los linfocitos T activados, y por lo tanto pierden su efecto protector contra la EAE. Sus efectos no están limitados solamente a disminuir la producción de IL-17. También suprimen la producción de inmunoglobulinas por las células plasmáticas, inactivando el STAT3 e induciendo PAX5 (105). No solo eso, sino que además, durante la infección bacteriana, la estimulación de TLRs lleva a las MSCs a producir CCL2, que induce la migración de monocitos de la médula ósea hacia la periferia, aunque aún no se conoce como esto se relaciona con la inmunosupresión o la respuesta inmune (106).

- **IL-10.**

Aunque la IL-10 ha sido implicada en la inmunosupresión mediada por MSCs, la producción directa por parte de estas células no ha sido demostrada. A pesar de ello, si se ha visto que las MSCs inducen la producción de IL-10 por parte de células presentadoras de antígenos como las células dendríticas o los monocitos (98,107). La IL-10 también ha sido asociada con la inducción de otro factor inmunosupresivo como es la molécula HLA-G (108).

- **Otros mediadores.**

Además de las nombradas, muchas otras moléculas son producidas por las MSCs u otras células progenitoras gracias al estímulo inflamatorio, como la proteína de superficie inhibidora del ligando de muerte programada (PD-L1) (109), hemo-oxigenasa-1 (HO-1) (80), el factor inhibidor de la leucemia (LIF) (110), IL-6 (111) o el TGF-beta y células T reguladoras (108,112). Su modo de acción en la inmunosupresión mediada por MSC está aún por determinar (87).

### 1.3.2 – Papel de las micro vesículas en la inmunomodulación.

Durante todo este capítulo hemos visto como las MSC ejercen su función inmunomoduladora mediante diferentes moléculas secretadas en el ambiente inflamatorio. Como hemos comentado, la proximidad de las células es un factor clave en el desarrollo de esta actividad. Pero no es sólo por contacto directo como las MSC ejercen su función. En los últimos años se ha comprobado como, además de por contacto, las MSC ejercen su efecto mediante la secreción de vesículas extracelulares (VE), que son capaces de transferir moléculas bioactivas (mRNA, microRNA, proteínas, etc.) entre distintos tipos celulares (113,114). Estas vesículas se dividen en exosomas, más pequeñas (40-100nm) y derivadas de compartimentos endocelulares (endosomas), y las microvesículas, derivadas de escisiones de la membrana plasmática y de tamaño habitualmente mayor (<1 micra). Es un reto para los investigadores distinguir entre ambas por la similitud de sus características biofísicas y la ausencia de marcadores discriminativos (115,116).

Ya en 2010 (117), se demostró cómo las microvesículas derivadas de MSCs y células hepáticas contienen material genético (miRNA) proveniente de estas células, y que tras internalizarse en las células diana pueden compartir con ellas la información que poseen. Es decir, estas microvesículas pueden ejercer efectos a distancia de diversas maneras.

Otros estudios más recientes (118) continúan dándonos información



en este sentido. Se observa que los efectos inhibitorios de las MSCs sobre la proliferación y diferenciación de linfocitos B pueden ser completamente reproducidos aislando microvesículas de MSCs en el sobrenadante de los cultivos, y que su efecto es dosis dependiente (119). Una actividad inhibitoria dosis dependiente ha sido hallada también para la producción de inmunoglobulina M (IgM), IgG e IgA. El efecto de las microvesículas en las células T fue investigado por Mokarizadeh et al (120). Estos autores mostraron que las microvesículas aisladas de MSCs de vaca inhibían la proliferación de linfocitos T tanto alogénicos como singénicos. Además, demostraron que estas microvesículas eran capaces de inducir apoptosis en células T activadas. De forma interesante, esta inhibición estaba asociada con un incremento de la proporción de células T reguladoras CD4+, CD25+, FoxP3+.

Se observó también una secreción aumentada de IL-10 y TGF-beta en células esplénicas cultivadas con micro vesículas de MSC. Estos resultados sugieren que las microvesículas de MSC pueden inducir una señalización tolerogénica. Estos mismos autores hablan en su artículo de otro estudio aún no publicado en el que observan resultados similares en cultivos de células mononucleares periféricas humanas tratadas con activador de células T CD3/CD28 (118).

Los resultados in vitro son apoyados por las observaciones in vivo en modelos animales. En ratones a los que se les ha inducido una inflamación intestinal con sulfato de sodio, y eran tratados diariamente con micro vesículas de MSCs, mostraron menor pérdida de peso, mejores índices de actividad de la enfermedad y una menor reducción de la longitud del colon en comparación con el grupo control (118). Una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real fue realizada en el RNA que se extraía de la zona enferma de colon, y revelaba una fuerte inhibición de las citocinas inflamatorias con respecto a los animales no tratados.

Todos estos datos en conjunto sugieren que las micro vesículas derivadas de las MSC pueden reproducir los efectos inmunomoduladores que presentan estas células, y por tanto es una de las vías por las que estas llevan a cabo su efecto. Existen actualmente investigaciones sobre el uso

terapéutico de estas vesículas, como una forma más segura y reproducible de conseguir el efecto inmunomodulador, aunque por el momento no hay datos concluyentes. Para el trabajo que aquí se presenta resulta de gran interés conocer de la existencia de estas microvesículas como posible efectoras terapéuticas.

#### 1.4 – MSCs en paciente politraumatizados.

Tras haber estudiado la capacidad inmunomoduladora y cómo la ejercen, veremos la implicación que tienen las células MSC en los pacientes que sufren un politraumatismo o pacientes lesionados. Existen varios estudios al respecto que las relacionan con la capacidad de recuperación y regulación de la respuesta inmune en estos pacientes.

Para empezar, existen estudios que tratan sobre la movilización de las MSCs al torrente sanguíneo en pacientes con daño muscular. Se sabe que, tanto en el daño muscular agudo como en el crónico, estas células se movilizan para llevar a cabo su función. En el estudio de M. Ramírez (121), se compara un grupo de pacientes con enfermedad de McArdle, con otro grupo de pacientes a los que se les somete a una actividad física que provoca contracción excéntrica mantenida (carrera de 21 km) y por tanto daño muscular agudo reversible, cuantificado mediante la medición de la CK sérica, un marcador bien establecido de daño muscular (122). La enfermedad de McArdle es un raro desorden genético que implica a la capacidad metabólica del organismo, provocando una deficiencia total de la glicógeno-fosforilasa en su isoforma muscular. Estos pacientes presentan una intolerancia muy importante al ejercicio, con fatiga prematura, mialgias, etc. (123,124). Uno de sus problemas principales es la rabdomiolisis severa que sufren incluso en condiciones basales. Lo que hacen es estudiar el número de MSCs circulantes en ambos modelos y compararlos con grupo control sano. Encuentran que en pacientes con enfermedad de McArdle los niveles de MSCs circulantes son mucho

mayores que en pacientes sanos, y que en los corredores se produce una elevación importante de las MSC tras el ejercicio, teniendo correlación con los niveles de CK. Por tanto, concluyen que tanto el daño muscular agudo como el crónico movilizan MSC a la sangre.

Así mismo, se ha estudiado la capacidad proliferativa de las MSCs de la médula ósea en relación con la severidad del traumatismo. Para ello el grupo de Seebach (125) ha cuantificado in vitro la presencia de MSC en pacientes con traumatismo múltiple, monofractura, pacientes con pseudoartrosis de una fractura y un grupo control. En el grupo de traumatismo múltiple se escogieron pacientes programados para cirugía de pelvis, con un ISS >16. Estos autores utilizan el análisis de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F) para cuantificar el número de colonias de MSCs formadas. De todos los grupos estudiados, en el que se ha observado un mayor número de CFU-F, y por tanto una mayor proliferación de MSCs, es en el grupo de pacientes con traumatismo múltiple. También encontraron diferencias en cuanto al sexo, con mayores niveles en pacientes varones. Estos datos sugieren que tanto el traumatismo múltiple como el sexo, afectan a la capacidad de la médula ósea de enviar MSCs al torrente sanguíneo.

Es bien conocido que en pacientes politraumatizados ocurre un aumento del remodelado óseo, que requiere el aporte continuo de células osteoprogenitoras. Por ello, es posible que en estos pacientes sean liberados distintos mediadores que activen a las MSC para ejercer sus misiones. Esto se apoya en los hallazgos de un aumento en las concentraciones de VEGF y TGF-beta en el suero de pacientes politraumatizados, que promueven la diferenciación in vitro a otro tipo de células progenitoras (126). Además, existen también datos en la literatura de que factores derivados de las plaquetas (PDGF, bFGF, IGF-I...) contribuyen a la proliferación de MSC (127).

En un experimento publicado en 2013 el grupo de G. Krumina y cols. (128) estudiaron la diferencia en la recuperación tras un politraumatismo en ratas tratadas con trasplante de MSC de médula ósea. Se comparaban tres grupos; politraumatizadas, politraumatizadas tratadas con MSC y grupo

control normal. El politraumatismo se llevaba a cabo provocando múltiples fracturas y shock hemorrágico. Se realizaban una serie de mediciones en varios días postoperatorios, análisis de sangre y estudio macroscópico e histológico a los 30 días, tras sacrificar a las ratas. Sus resultados concluyen que las ratas que habían recibido el trasplante de MSCs conseguían mejores resultados de recuperación física, mejores resultados en los test de actividad, mayor ganancia de peso y menor atrofia muscular. Además, vieron también un callo óseo más avanzado en estas ratas al realizar el estudio histológico en comparación con las no tratadas.

El grupo de Hengartner y col. (129) realiza un estudio recreando un ambiente inflamatorio similar al que se produce en pacientes politraumatizados. En los últimos años, se ha hecho patente que el número de MSCs en sangre aumenta significativamente tras una lesión como una fractura de cadera o de huesos largos, un infarto de miocardio, daño severo muscular, o hipoxia (121,130–132), y que estas MSCs tienen características similares a aquellas que se aíslan de la médula ósea (130), por lo que una explicación puede ser que estas células sean reclutadas desde ahí. Como las MSC han sido aisladas en otros muchos lugares, es también posible que se recluten de otras zonas (133–137). Lo que hace este grupo es investigar los efectos de un cóctel que contiene IL-beta, IL-6, IL-8 y las anafilotoxinas C3a y C5a, en concentraciones correspondientes a las que se han medido en la sangre de pacientes politraumatizados en las 24h siguientes al trauma (138–144), y las enfrentan a células MSCs humanas in vitro. Lo que consiguen es una migración de estas células MSCs, siendo C3a el agente más activo en este sentido. Además, aumenta la expresión de MMP1, COX2, PTGES y TSG6, moléculas que como hemos visto, se relacionan con la capacidad de inmunorregulación de las MSC. También se ha encontrado un aumento de la expresión de hasta 84 genes relacionados con la inflamación. Esto hace pensar en la capacidad de estas moléculas, con la IL-beta a la cabeza, de activar a las MSCs y hacerlas migrar al lugar de la inflamación, por lo que una transfusión de MSC, bien endógena o exógena, podría ser capaz teóricamente de llegar al lugar de lesión, y liberar sus moléculas reguladoras (129).

Esta movilización sistémica de las MSC desde la médula ósea u otros tejidos o en el caso de su administración intravenosa, y su migración hacia el lugar de inflamación, es dependiente de la acción de varias citocinas inflamatorias. Al igual que hemos visto en el estudio previo, existen otros que hablan del importante papel que ejerce en este punto la IL-beta (145).

Ya han sido nombrados en este capítulo otros estudios que hablan de movilización de MSC ante diferentes estímulos. Especial interés tiene el publicado por Rochefort et al. En relación a la respuesta al estímulo hipóxico (130). Este grupo compara dos grupos de ratas, unas sometidas a un ambiente hipóxico durante 3 semanas y un grupo control. Realizan análisis de sangre periférica y médula ósea para evaluar el conteo y características de las MSC. Encuentran que la hipoxia crónica es un estímulo para el aumento de las MSC periféricas, en una proporción hasta 15 veces mayor que en el grupo control, y que, al igual que hemos visto en el estudio previo, estas células son de características similares a las presentes en la médula ósea, por lo que apoya la teoría de la movilización desde esa localización. El mecanismo por el cual esto se lleva a cabo no está bien demostrado, aunque existen estudios que hablan de la posible implicación de varios mecanismos directos o indirectos, tales como factores locales, agentes quimiotácticos, aumento de la permeabilidad vascular, etc. (146). Previamente a este, existe un estudio in vitro que establece la hipoxia como posible factor movilizador de MSCs (147). La hipoxia también ha sido objeto de estudio como estímulo de la expresión de metaloproteinasa-2 (MMP-2) y factor de crecimiento endotelial, que pueden estar relacionados también con la movilización de MSCs (148,149).

Para terminar de apoyar este apartado, no podemos dejar de mencionar el estudio de Alm y col. (131), en el que relacionan la presencia de MSCs circulantes con la presencia de fractura. Dividen los pacientes en tres grupos; pacientes ancianos con fractura de cadera a los que se realiza una artroplastia parcial cementada; pacientes similares en edad y sexo con artrosis de cadera tratados con artroplastia total de cadera cementada; pacientes jóvenes que han sufrido fractura de hueso largo de extremidad

inferior. Comparan la presencia de MSCs circulantes pre y postoperatoriamente, obteniendo un aumento significativo de estas células en los pacientes que han sufrido una fractura, y no en aquellos sometidos a cirugía electiva. Este aumento aparece entre las 39 y 101 horas después de la fractura, y ocurre incluso en fractura de baja energía como fracturas de tobillo. Las MSCs circulantes encontradas son en su mayoría similares a las obtenidas en la médula ósea, datos que concuerdan con los estudios previos que hemos señalado. Previamente ya se había hablado en la literatura de la posibilidad de movilización de MSCs tras una fractura (150–156). Una explicación que dan en este texto del no aumento de MSC tras la artroplastia sin fractura, es la presencia de anestesia espinal durante el proceso, y por tanto la ausencia de dolor. Otro detalle importante es el mayor aumento que se produce en gente joven con respecto a los ancianos, que también está en consonancia con estudios previos (157,158).

Todos estos estudios apoyan la idea de que las MSCs tienen una importante función en la respuesta reparadora e inmune, y por tanto ejercen una acción indispensable en el paciente politraumatizado.

En los párrafos anteriores se han visto diferentes estudios que nos hablan de la movilización de MSC ante estímulos lesivos de varios tipos e intensidades, pero no se dispone de muchos datos de los mecanismos concretos por los que las MSC pueden ejercer su acción en los pacientes politraumatizado, y por tanto más estudios de este tipo serían necesarios para poder establecer conclusiones al respecto.

En cualquier caso, sí existen algunos datos sobre los mecanismos implicados en las acciones celulares de los pacientes politraumatizados.

El grupo de Li y col (159) realizaron un experimento para evaluar la actividad de las MSCs en la supresión de la inflamación inducida por lipopolisacaridos (LPS) en células humanas de cordón umbilical y macrófagos alveolares. Realizando varias mediciones (Western blot, PCR cuantitativa, ELISA), consiguieron demostrar que los LPS causaban una respuesta inflamatoria en los macrófagos alveolares y las células de cordón, aumentando su permeabilidad, regulando al alza los receptores

Toll 2 y 4 (TLR) y la fosforilación de p65, disminuyendo la IL-10 y promoviendo el TNF-alfa en ambas células. Cultivando esto junto con MSCs, demostraron que todas estas actividades eran atenuadas en ambos tipos celulares, de forma dependiente a la dosis de MSCs, y que esta protección era suficiente ya incluso a partir de la primera hora. Estos datos nos hacen pensar que la administración inmediata de MSCs en pacientes con SIRS podría tener efectos beneficiosos. Existen otros estudios previos en la misma línea (160,161), aunque existen discrepancias con otros en cuanto a que el daño a las células dependa del tiempo (162).

Se conoce también que los TLRs juegan un papel importante en la defensa contra los patógenos, reconociendo PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos) expresados por las bacterias. Su activación permite la activación de MAPK y FN-kB (descrito en anteriores apartados), que conlleva a la producción de citocinas inflamatorias, incluyendo IL-1, IL-6 y TNF-alfa (163–165). TNF-alfa es un potente factor inflamatorio e IL-10 es una citocina clave en el proceso. El descenso de TNF-alfa y la elevación de IL-10 en las células de cordón estudiadas y macrófagos indican que la reacción inflamatoria se suprime.

Otro estudio de Gore et al. (166) aporta datos sobre como las MSCs actúan a través de la población de Treg (linfocitos T reguladores) para disminuir la inflamación. Estas células tienen una función inmunosupresiva, importante para mantener la homeostasis inmune (167). Era conocido que los pulmones de roedores se recuperaban completamente de una contusión pulmonar en una semana tras una contusión unilateral, pero si esto era seguido de shock hemorrágico, la curación se veía alterada (168). Utilizando un modelo animal al que se le aplica una contusión pulmonar unilateral que se sigue de shock hemorrágico, estudian varios parámetros, incluyendo la respuesta tras la administración inmediata de una dosis de MSC iv. Observan en estos modelos un aumento significativo de Treg. Es conocido que tras un traumatismo, la respuesta inicial esta mediada por Th1 (linfocitos helper 1), mientras que la respuesta inflamatoria tardía es llevada a cabo por Th2 (169). Estas células Treg interaccionan con ambas, llevando la respuesta a una restauración del balance Th1/Th2 y por tanto controlando la respuesta inflamatoria (170). Previamente, Cook et al habían

investigado esta población, observando un aumento de las Treg a partir del quinto día post-traumatismo, y este era aún mayor tras la administración de MSC. Cuando este autor veía el efecto de las MSC en la contusión unilateral de pulmón y bloqueaba los Treg, el efecto de las MSC no se producía. Existen otros estudios que hablan de la acción de MSC sobre Treg, como los de Kavanagh et al, que muestran el efecto protector de las MSC en la inflamación alérgica de vía aérea, y que este no se produce cuando la población de Treg está disminuida (171).

Como hemos visto, las poblaciones celulares que denominamos células mesenquimales tienen, entre otras potencialidades, importantes capacidades inmunoreguladoras o moduladoras de la respuesta inmune. A su vez nos enfrentamos a un problema clínico como es el paciente traumatizado o crítico, en el que la respuesta inmune juega un papel destacado en su evolución y resolución.



## 2. Hipótesis.

Si en los pacientes politraumatizados las poblaciones de MCS obtenidas de la Mo presentan características diferentes de las poblaciones de MSCs obtenidas de la misma fuente de pacientes sometidos a cirugía electiva.

## 3. Objetivos.

Para responder a la hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

- **3.1-Objetivo general:** comparar las características fenotípicas y funcionales de las MSCs de los pacientes ingresados por un trauma grave con los ingresados para una cirugía programada.
  
- **3.2- Objetivos específicos:**
  - Describir las características de las poblaciones de MSCs de pacientes con trauma grave, en cuanto a:
    - Capacidad de proliferación.
    - Caracterización inmunofenotípica.
    - Ciclo celular.
    - Producción de citocinas.
  - Analizar la situación clínica de los pacientes críticos, así como los datos de laboratorio relacionados con su situación clínica.
  - Correlacionar las características funcionales de las MSCs con la evolución o situación clínica de los pacientes con trauma grave y con los marcadores de inflamación.

## 4. Material y métodos.

### 4.1 – Diseño del estudio.

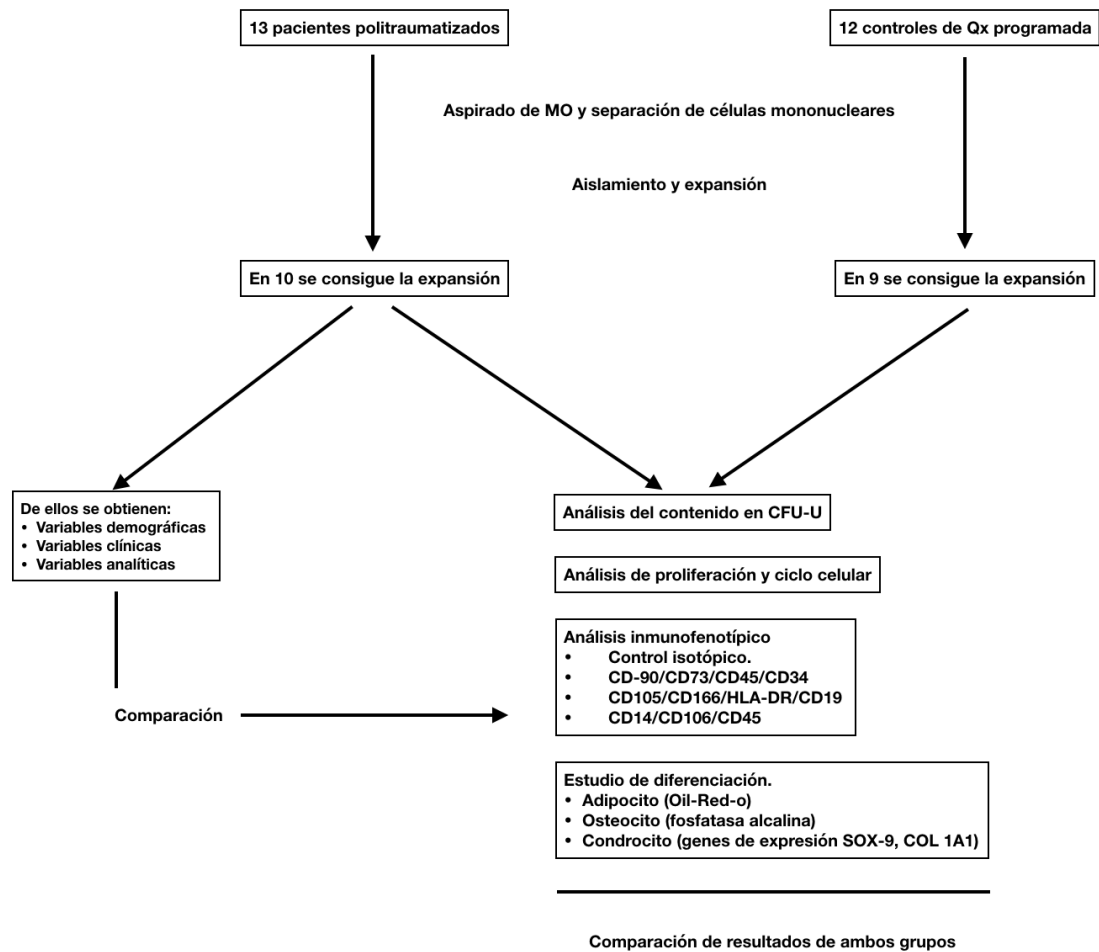
Para conseguir nuestros objetivos se pretende analizar las MSCs de 10 pacientes, mayores de edad, de ambos sexos, que ingresan en nuestro centro por un traumatismo grave (ISS>16) y compararlas con las MSC de otros 10 pacientes que ingresan de forma programada para realizar una artrodesis vertebral instrumentada. Se trata por tanto de un estudio prospectivo descriptivo y comparativo entre las dos muestras de pacientes.

En ambos casos se establecen los siguientes criterios de inclusión:

- Politraumatismo con ISS>16 (grave).
- Edad entre 18 y 85 años.
- Firmar el Consentimiento Informado que detallaremos más adelante y que ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de nuestro hospital. En caso de no poder firmarlo el paciente por su situación clínica, el consentimiento se obtiene de los familiares.

Criterios de exclusión:

- Presencia de enfermedad tumoral, proceso hematológico o patología infecciosa, inflamatoria o autoinmune, que pueden influir en los datos obtenidos.
- Estar recibiendo un tratamiento inmunosupresor en el momento del traumatismo.
- Padecer enfermedades infectocontagiosas (VIH, VHC, VHB).
- Situación clínica muy desfavorable, que prevé el fallecimiento inminente del paciente.
- Negativa por parte del paciente o familiares para ser incluidos en el estudio.



**Figura 4.** Diseño del estudio.

## 4.2 - Población de estudio.

Todos los procedimientos se realizaron bajo aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario de Salamanca y de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 2000, y con la obtención del consentimiento informado de cada paciente o de su representante legal, (adjuntamos copia en el anexo).

De todos los pacientes incluidos en el estudio se registrarán las siguientes variables:

- ◆ Variables demográficas:
  - Edad.
  - Sexo.

- ◆ Variables clínicas:
  - Al ingreso:
    - ISS.
    - NISS.
    - Valores de saturación de O2.
    - Frecuencia cardiaca.
    - Tensión arterial.
    - Escala de Glasgow.
  - En la evolución del paciente:
    - Días de ingreso en UVI.
    - Estancia hospitalaria total.
    - Complicaciones y tratamientos recibidos.
    - Aparición de fiebre o sepsis.
- ◆ Variables analíticas:
  - Al ingreso:
    - Analítica básica con hemograma, bioquímica y coagulación.
    - Valores de IL-6.
    - Valores de PCR.
    - Valores de VSG.
    - Valores de TNF-alfa.
  - En la evolución del paciente:
    - Medición en los días 1, 2, 5, 7, 10, 15, 20 y al final del ingreso en los casos en los que este se prolonga más tiempo, de los valores de PCR, lactato, procalcitonina, hemoglobina y leucocitos con % de neutrófilos.

Los datos demográficos de los pacientes son obtenidos de la base de datos del hospital y de su historia clínica.

Los valores de ISS (Injury Severity Score) y NISS (New Injury Severity Score) son calculados de forma habitual en el servicio de UVI de nuestro hospital e incorporados a una base de datos de todos los pacientes que ingresan en ese servicio. Se calculan mediante el empleo de las

herramientas informáticas habituales.

La analítica de ingreso con los valores de hemograma, bioquímica y coagulación es obtenida en el momento de obtención de la muestra de médula ósea (primeras 24 horas tras el politraumatismo). A esta analítica básica se suman los valores de IL- 6, VSG y TNF-alfa, que también son solicitados en ese momento. A lo largo del ingreso se realizan varias mediciones seriadas de los valores de PCR, lactato, procalcitonina y hemograma para el seguimiento analítico del paciente. Estas mediciones se realizan en los días 1,2,5,7,10,15 y 20 de ingreso, para tener una idea de la evolución de estos parámetros y poder compararla con la evolución clínica del paciente. En el caso de aquellos enfermos cuya estancia se prolongue más tiempo, se obtiene un último dato final. Si la estancia es más corta, se obtiene también el dato del último día de ingreso del paciente. Todos estos valores se obtienen del sistema informático del centro hospitalario y son anotados en tablas para un mejor manejo de los mismos.

La evolución clínica es revisada en la Historia Clínica del paciente, anotando en un inicio las constantes vitales del paciente al ingreso y la escala de Glasgow para valorar el grado de consciencia a su entrada en urgencias. La evaluación inicial y pruebas realizadas con todos los diagnósticos obtenidos también son anotados y trasladados a una tabla. Todos los eventos que sufren los pacientes control, tratamiento y cirugías realizadas, así como la aparición de complicaciones y su tratamiento son también anotadas. Especial atención se presta a la aparición de fiebre y procesos sépticos y su tratamiento y resolución.

Al final de la estancia se anotan los días que el paciente ha permanecido ingresado tanto en el servicio de UVI como posteriormente en planta hospitalaria, y el desenlace que ha tenido el proceso, con la posible curación o secuelas.

### 4.3 – Obtención y análisis de las células mesenquimales.

#### 4.3.1 – Proceso de aspirado de cresta ilíaca.

Para la obtención de muestras del grupo control se emplearon pacientes que ingresaban de forma programada para realizar un procedimiento de artrodesis vertebral. Durante la intervención a la que fueron sometidos se extrajeron entre 5-7ml de aspirado de médula ósea de la cresta iliaca. Esta se realizó en todos los casos bajo anestesia general. Se trata de un procedimiento que se realiza de forma habitual en este tipo de cirugías, sobre la cresta iliaca posterosuperior, para obtener un aspirado que se mezcla con un carrier y autoinjerto y se utiliza para lograr la fusión vertebral.

En el grupo de politraumatizados, las muestras se han obtenido en todos los casos durante las primeras 24 horas tras el traumatismo. Para ello se realiza un aspirado de cresta iliaca en zona antero-externa con el paciente sedado y la inyección de anestésico local formando un habón en la zona de punción. El anestésico local empleado es mepivacaína al 2%.

La aguja utilizada en todos los casos es InterV® de 15gr x 4in. Se obtiene una muestra de 5 a 7 ml de contenido medular que se deposita en un tubo estéril con heparina y sin aditivos.

Ambas muestras se envían en un contenedor al laboratorio de Terapia Celular, para comenzar el aislamiento y expansión de las MSC a partir de ambas fuentes celulares.

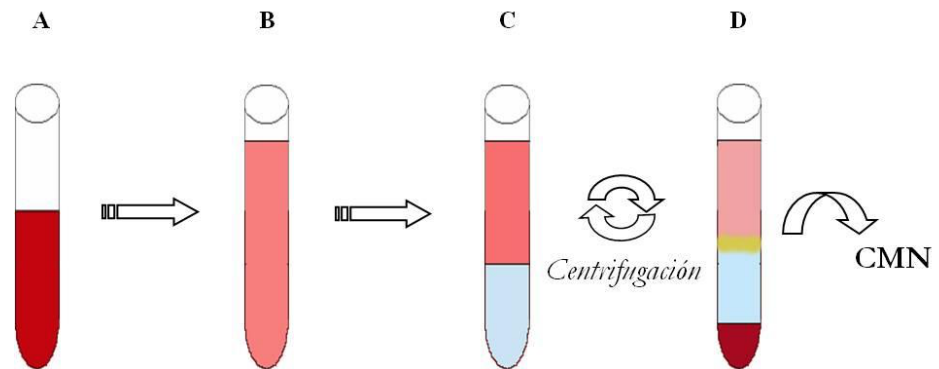




**Figura 5.** Proceso de obtención de muestra de médula ósea.

#### 4.3.2 – Separación de las células mononucleares.

Para realizar la separación se diluyó la muestra en medio Hanks (Gibco, Invitrogen) hasta tener un volumen de 12 ml y se homogeneizó. Esta dilución se añadió a dos tubos a los que previamente se había añadido 4 ml de Ficoll-Hypaque (Biochrom KG, Berlín, Alemania) y se centrifugó a 1500 rpm durante 30 minutos. Tras recuperar las MSC de la interfase se realizaron dos lavados con Hanks (10 minutos a 1200 rpm), y se resuspendió el botón celular en 1 ml de DMEM (Gibco BRL, Paisley, Reino Unido), procediéndose al recuento celular en una cámara de Neubauer. (Figura 1).

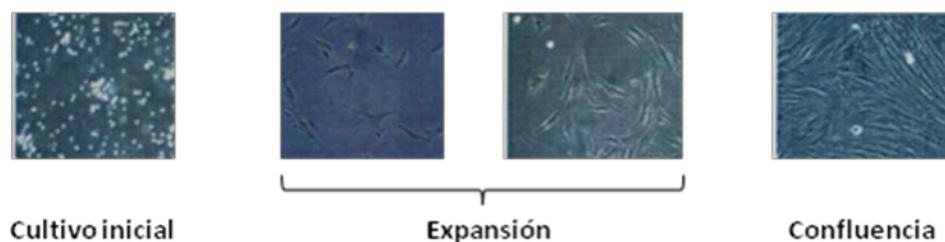


**Figura 6.** Separación de células mononucleadas por gradiente de densidad. A) Muestra MO. B) Dilución de la muestra con Hanks. C) Muestra diluida sobre Ficoll. D) Interfase en la que están presentes las MSC.

#### 4.3.3 – Aislamiento y expansión.

Ambos aspirados celulares se plantaron en placas de cultivo a una concentración de  $10^6$  células/cm<sup>2</sup>, en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, temperatura de 37 °C y ambiente hipóxico (5% de O<sub>2</sub>) dado que dicho ambiente mejora su crecimiento. El medio de cultivo en el que se plantaron consistía en DMEM con 10% de suero bovino fetal (FBS); Bio Whittaker, Bélgica) y 1% de penicilina-estreptomicina.

Cada 3-4 días dicho medio es recambiado (con lo que se eliminan también las células hematopoyéticas no adherentes).



**Figura 7.** Aislamiento y expansión.



Cuando la confluencia de la placa de cultivo supera el 80% de la superficie de la placa, se procede a subcultivar nuevamente las células a una menor concentración en nuevas placas de cultivo. Para realizar este paso las células adherentes serán separadas en un proceso llamado tripsinización. Son plantadas nuevamente a una concentración de  $10^4/\text{cm}^2$ . Este proceso de recolección y siembra se denomina “pase” del cultivo. Para realizarlo, se retira el medio de expansión, se lavó con PBS y posteriormente se añadió la tripsina (Gibco BRL, Paisley, Reino Unido) dejándola actuar de 6 a 8 minutos en el incubador a 37°C. A continuación, se añadió medio con DMEM y 10% de SBF para neutralizar la acción tóxica de la tripsina, se recogió la suspensión celular obtenida y se centrifugó durante 10 minutos a 1200 rpm, decantándose el sobrenadante, y procediendo a contar las células resultantes, para proceder a replantarlas.

Este proceso de expansión se mantiene hasta el cuarto pase, siendo posteriormente analizados de la siguiente forma y de acuerdo con los objetivos del proyecto.

#### 4.3.4 – Evaluación de la eficiencia celular.

Se analiza el número total de MSC obtenidas a partir de cada aspirado de cresta iliaca mediante contaje con cámara de Neubauer, con respecto a las células mononucleares totales obtenidas tras la separación en gradiente de densidad a partir de ambas fuentes celulares, teniendo en cuenta que se utilizarán 750.000 células mononucleadas para la cuantificación de CFU-F.

#### 4.3.5 – Análisis del contenido en Unidades Formadoras de Fibroblastos (CFU-U).

Tras el aislamiento de las células mononucleadas mediante centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll), se plantarán 750.000 células en una placa de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con 5 ml de medio de cultivo consistente en IMDM con 12,5% de FBS, en ambiente con 5% de CO<sub>2</sub> y 21% de O<sub>2</sub>, recambiando el medio cada 4-5 días. Tras 4 días en cultivo, se retirará el medio y tras lavar con PBS, se fija la placa con metanol puro durante 5 minutos, tras los cuales se decanta el metanol y se espera a que se evapore. Tras ello se teñirá con May-Grünwald durante 10 minutos, con lavado con agua destilada, y posteriormente con Giemsa durante 3 minutos, procediéndose a contar el número de colonias CFU-F.

#### 4.3.6 – Análisis de proliferación y ciclo celular.

La proliferación celular se determinará mediante MTT. Para ello se depositarán en una placa de 24 pocillos 5000 MSC por pocillo, en al menos 4 pocillos por grupo con medio de expansión de MSC en un volumen de 1ml. Dicho medio se recambiará cada 3-4 días (dependiendo del tiempo que se vayan a mantener en cultivo: 1 (sin cambio de medio), 7 y 14 días) en las mismas condiciones de expansión de las MSC especificado en el punto 4.1.4. Transcurridos 1,7 o 14 días, se añada 250 microlitros de MTT (a una concentración de 0,5 mg/ml) por pocillo, y se incuban durante al menos una hora en incubador a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, se añaden 500 microlitros de DMSO para romper las membranas celulares. Se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y agitación. Finalmente, se analiza la cantidad de MTT reducido a formazán (color púrpura) mediante

la determinación de absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro Ultra Evolution (Tecan).

Asimismo, se analiza el ciclo celular mediante tinción de las MSC obtenidas tras el cuarto pasa en cultivo mediante tinción con yoduro de propidio (PI). Para ello, se incubarán las células con PI durante 15 minutos y posteriormente la muestra será adquirida en un citómetro de flujo FACSCalibur (Betcon Dickinson-BD-) empleando el software CellQuest (BD). Para el análisis del porcentaje de células en fase G0/G1, S y G2/M del ciclo celular se empleará el programa informático ModFit (BD).

#### 4.3.7 – Análisis inmunofenotípico.

Para analizar comparativamente las características inmunofenotípicas de las MSC de ambas fuentes celulares, se emplearán las siguientes combinaciones cuádruples de anticuerpos monoclonales, siguiendo las recomendaciones de la International Society for Cellular Therapy (Cytotherapy 2006; 2006; 4. 315-317):

- Control isotópico
- CD90-FITC/CD73-PE/CD45-PerCP-Cy5.5/CD34-APC
- CD105-FITC/CD166-PE/HLA-DR PerCP/CD19-APC
- CD14-FITC/CD106-PE/CD45-PerCP-Cy5.5

Se emplearán un mínimo de  $1 \times 10^6$  células por cada uno de los 3 tubos anteriores. Tras 20 minutos de incubación con los anticuerpos monoclonales y posterior lavado, las muestras serán adquiridas en un citómetro de flujo FACSCalibur (Betcon Dickinson-BD-) empleando el software CellQuest (BD). Para el análisis inmunofenotípico se empleará el programa informático Paint-A-Gate Pro (BD), analizándose

comparativamente tanto el porcentaje de células positivas para cada uno de los marcadores como la intensidad media de fluorescencia (MFI).

#### 4.3.8 – Estudio de diferenciación in vitro.

##### I. Diferenciación hacia adipocito:

Para la diferenciación hacia adipocito, las MSC son cultivadas en una placa de cultivo sobre porta (Slide Flask), a una concentración aproximada de  $10^4$  células/cm<sup>2</sup>, con 3ml con medio de cultivo NH AdipoDiff® de Miltenyi Biotech. Dicho medio se recambia cada 3-4 días. Tras 21 días en cultivo, se analiza la diferenciación a adipocitos mediante tinción inmunocitoquímica con Oil-Red-O.

##### II. Diferenciación hacia osteocito:

Para la diferenciación hacia osteocito, las MSC se cultivan en una placa de cultivo sobre porta (SlideFlask), a una concentración aproximada de  $10^4$  células/cm<sup>2</sup>, con 3 ml con medio de cultivo NH OsteoDiff® de Miltenyi Biotech. Dicho medio se recambia cada 3-4 días. Tras 21 días en cultivo, se analiza la diferenciación a condrocitos mediante tinción inmunocitoquímica con fosfatasa alcalina.

##### III. Diferenciación hacia condrocito:

Para la diferenciación hacia condrocito, se estudia la expresión de genes en las MSC de ambos grupos. Estos genes son el SOX-9-factor de transcripción y COL1A1-colágeno.

## 5. Resultados

5.1 – Pacientes estudiados: parámetros demográficos, clínicos, analíticos y evolutivos.

Adjuntamos la tabla con los pacientes valorados y los datos obtenidos de cada uno de ellos, en cuanto a lesiones iniciales, evolución clínica y parámetros clínicos estudiados:

Pacientes	Edad	Sexo	Patología	Fecha de ingreso	ISS	NISS	Días en UVI	Estancia total	Complicaciones (mortalidad)	Hemograma al inicio	Bioquímica	Coagulación	II-6	TNF	PCR	VSG	Fiebre (aparición de sepsis)	Saturación O2	FC	TA	Glasgow	Evolución tras el alta.
1	73	M	Tráfico; traumatismo craneoencefálico; fracturas costales (1ª a 4ª D, 6ª a 9ª), fx cuerpo vertebral de C2; neumotórax; contusión pulmonar; hemotórax traumático; hemorragia subaracnóidea parietal I; hematomas subdural bilateral; contusión parasagital frontal D.	4/4/18	25	34	14	14	Ninguna; ispatomía exploradora sin hallazgos importantes.	Hb: 9,3 - Hto: 27,8 - Leucocitos: 10370 - Plaq: 127000	Gluc: 206 - Urea: 41 - Cr: 0,84 - Na: 144 - K: 4,2 - Cl: 106 - CPK: 1734	TPA: 32,7 - Fibrin: 149 - INR: 1,22 - TP: 74%	83,80 pg/ml	10,7 pg/ml	6,58 mg/dl	15	110	120-85	9	Última visita a RHE el 30/4/18. Alta por traslado a Avila. No déficit neurológico.		
2	22	M	Precipitada 8m de altura; contusión temporal D y frontal bilateral. Fx D2 sin desplazamiento, hematoma paravertebral I, desplazamiento, hematomas paravertebral I, Fx apófisis transversas de D1 D2 y D3. Fx aplastamiento D5 sin afectar muro posterior, Fx de tercio superior de esternón y extremo proximal de clavícula I, Fx de 2,3,4,5 arcos costales I, mínimo neumotórax I, contusiones pulmonares bilaterales.	11/2/18	17	17	2	2	Etaion 1,89 g/l. Hemodinámicamente estable durante el ingreso. Respiración espontánea al inicio. Episodio de disminución del nivel de conciencia tras administración de fentanilo que precisa intubación. Retirada a las 8 horas, con buena respuesta. Corral SOMI para fx vertebral.	Hb: 12,3 - Hto: 36,5 - Leucocitos: 23120 - Pla: 196000	Gluc: 119 - Urea: 17,3 - Cr: 0,56 - Na: 141 - K: 3,7 - Cl: 102 - Etanot: 1,89	TP: 79 - TPA: 34,1 - Fibrin: 161 - INR: 1,16	22,50 pg/ml	6 pg/ml	1,32 mg/dl	Coagulado	95 %	101	125-78	9	Alta de CEX al 12/4/19. Sin secuelas.	
3	25	M	Tráfico; fx costales 1ª, 9ª a nivel lateral y 1ª, 5ª a nivel posterior; hemoneumotórax, contusión pulmonar; fx clavícula I, TCE con hematoma subdural, fx en lágrima de C5, fx, apófisis transversas de C7 y D1.	18/3/18	17	17	3	2 días en cirugía torácica	Colocación de pleurocath por hemoneumotórax. Estabilidad clínica y hemodinámica desde las primeras 24 horas. Colocación de collar cervical. No ha presentado fiebre durante todo el ingreso. Fractura de 1/3 medio de clavícula a tratamiento conservador y con buena evolución.	Hb: 18,4 - Hto: 52,6 - Leucocitos: 37470 - Pla: 318000	Gluc: 181 - Urea: 27 - Cr: 0,75 - Na: 100 - K: 4 - Cl: 101 - Etanot: 1,8	TP: 99% - TPA: 27 - INR: 1,01	31,30 pg/ml	5,9 pg/ml	5,35 mg/dl	Coagulado	93 %	108	90-45	15	Última visita el 31/10/18 a TRA. Alta. Consolidación de la clavícula.	
4	63	V	Tráfico en moto; múltiples fracturas costales derechas (6-11), mínimo derrame pleural derecho, fx de pata ilíaca derecha y rama iliopubiana derecha, fx de rama isquípública derecha, isquípública y ala sacra izquierda, hematoma adyacente a cúpula vesical y aumento de tamaño de íliaco derecho.	25/4/18	17	17	6	23 días más en COT	Tracción en MID, que mantiene durante 3 semanas sin incidencias. Hematuria a to con lavados. Drenaje torácico derecho hasta el alta de UVI. 2 Concentrados de hemátias durante el ingreso.	Hb: 11,9 - Hto: 34,3 - Leucocitos: 19370 - Pla: 193000	Gluc: 145 - Urea: 35,9 - Cr: 0,8 - Na: 141 - K: 3,4 - Cl: 106 -	TP: 82% - TPA: 28,2 - Fibrin: 203 - INR: 1,14					97 %	80	90 -50	15	Alta de TRA el 5/6/19 con buena consolidación de fractura de peñía.	
5	65	V	Accidente de tráfico; neumotórax anterior izquierdo, mínimo apical derecho, contusión pulmonar inferior y lóbulo medio derecho, hemotórax derecho; Fracturas múltiples costales con hundimiento y deformidad de ambas paredes torácicas. Roura diafragmática. Hemoperitoneo, isquemia intestinal de unos 25 cm de D. Fractura de fémur derecho. Anterolisis de D6 sobre D6. Fractura de patillo superior de L5 con extensión a pared anterior. Fractura de espina de D12.	26/5/18	25	34	18	8 más en Trauma	Al ingreso se coloca drenaje torácico. Colocación de fracción transesquelética provisional en fémur derecho. Inestabilización en las primeras 24h que requiere IQ urgente; ispatomía media con resección intestinal y anastomosis latero-lateral más sutura diafragmática. Osteosíntesis de fractura femoral con placa LISS. Síntesis de fracturas vertebrales dorsales (D3-D7). Inestabilización durante la cirugía, precisa 4 CH. Tras IQ preciso otros 2 CH y presentó coagulopatía corregida con protrombónicos, fibrinógeno y vit k. Exvubado a los 10 días de IQ. Tras IQ se observa plejía en EEII a expensas de CPE, por lo que se coloca férula antiesquin. A tratamiento Abx durante el ingreso por aislamiento en faringe de SAMR. Pecho de cultivos negativos excepto uno para s.hominis en sangre.	Hb: 11,9 - Hto: 33,8 - Leucocitos: 19850 (neutrófilos: 84,8) - Pla: 213000	Gluc: 302 - Urea: 36,3 - Cr: 0,67 - Na: 137 - K: 4,1 - Cl: 105 - Car: 7,6 -	TP: 87% - TPA: 27,2 - INR: 1,09	480 pg/ml	10,4 pg/ml	13,15 mg/dl	21 mm	95	91	100-60	14	25/1/19 se intervino por pseudoartrós de fractura femoral con placa y injerto. 25/5/19 fuerza 3/5 en MID. Deambula con andador. Persiste parálisis del CPE izquierdo.	
6	63	M	Atropello en vía pública; hematoma subdural laminar fronto-temporal I, contusiones hemorrágicas frontales; fx, parietotemporal I, fractura de arco costales 3 a 6, fx de clavícula izquierda, fx de tibia y peroné D.	4/7/18	22	27	3	10 días más en COT	No precisó tratamiento por parte de neurocirugía, buena evolución. No ha precisado transfusiones. Intervención a los 6 días de elevación de tibia tipo Spectrum con buena evolución.	Hb: 12,9 - Hto: 37 - Leucocitos: 10950 - Pla: 27000	Gluc: 281 - Urea: 37,2 - Cr: 0,78 - Na: 144 - K: 3,4 - Cl: 107	TP: 129% - TPA: 26,3 - INR: 0,93	10,20 pg/ml	5,4 pg/ml	3,50	17	36,5	60	120-50	14	Fractura de clavícula con desplazamiento secundario que requiere IQ el día 9/8/18 y nueva intervención al día siguiente. Drenaje de clavo de tibia el día 25/9/18 por falta de consolidación. Última revisión el 4/12/18. Tíbea en fase de consolidación (callo delimitado). Cava izquierda en fase de consolidación. Mínima limitación de movilidad de brazo. Carga parcial.	

7	43	V	18/7/18	29	34	16	2 días más en neurociugía	Colocación de PIC y PICO. En las primeras horas medidas de resucitación. Fabricula mantenida al inicio por su de respuesta inflamatoria. Retirada de sedación al 5º día. Durante ingreso precisa transfusión de 3 CH por anemia. ECG péflico. Evaluación al 13 día de ingreso. Inmenda comunicación con el medio sin lograrse entendido. Cultivos todos negativos. Alta a neurociugía.	Hb: 13,9 - Hic: 40,4 - Leucocitos: 1940 (neutrofilos 78,5%) - plaq: 233000	Gluc: 154 - urea: 39,7 - Cr: 1,01 - Na: 142 - K: 4,1 - Cl: 108 - Cx: 8,6	TP: 86% - TTPA: 28,6 - INR: 1,1	75,10 pg/ml	9,5 pg/ml	12,87 mg/dl	18 mm	Primeras horas fibrícula mantenida en el contexto de inflamatoria. Posteriormente afébril hasta el octavo día, 38º y secreción respiratoria resuelta con antibiótico. Resto de ingreso afébril.	100 %	95	114-90	5	Da 14/8/18 alta. Tratado a Barcelona. Estabilidad clínica, radiológica. Convalecencia.
8	69	M	29/7/18	33	50	43	Trasladado a Toledo (servicio de lesionados medulares)	Recupera nivel de conciencia en las primeras horas. Al ingreso intubado y con ventilación mecánica. A las 48 h traqueotomía percutánea sin incidencias. Paciente con contusión pulmonar bilateral que genera SDRA. Dermateo plura bilateral que requiere drenajes. Mejora progresiva pasando a ventilación mecánica. Paciente con auto anticoagulos en sangre por lo que es difícil conseguir sangre compatible. Requiere varias transfusiones. Antibiótico desde el ingreso por sospecha de broncoaspirado. Tras primeros días se mantiene afébril. Varos picos febriles de hasta 38 grados que se resuelven con antibiótico. Todos los cultivos realizados negativos. Intimenda de clavícula izquierda con placa. Intimenda de entosisis D1-D2 y D5-D6. Al alta nivel motor D1 y sensitivo D2, sin tono de esfinter anal. ASIA A.	Hb: 10,7 - Hic: 32,4 - Leucocitos: 1470 (Neu: 94,7%) - PlaQ: 189000	Gluc: 442 - Urea: 36,6 - Cr: 0,82 - Na: 73 - K: 3,9 - Cl: 104 - Cx: 8,1	TP: 101 - TTPA: 24,3 - INR: 0,89	17,10 pg/ml	29,8 pg/ml	3,46 mg/dl	35 mm	Afébril al inicio, varos picos de hasta 38 grados resueltos con antibiótico iv. Todos los cultivos negativos.	84 %	61	110-74	11	Da 13/9/18 trasladado a Toledo (centro de lesionados medulares)
9	47	V	30/1/18	17	17	3	1 día más en COT. Trasladado a mutua laboral para tratamiento definitivo de Fx. Clavícula.	Estable hemodinámica y respiratoriamente en todo momento. Precisa IO para limpieza de herida, sin lesiones vasculares. Fx. D6 a to ortopédico. Fx. de clavícula quirúrgica. Fabricula durante el ingreso sin signos infecciosos.	Hb: 11,1 - Hic: 31,8 - Leucocitos: 13510 (Neu: 88,4%) - PlaQ: 168000	Gluc: 159 - Urea: 33,5 - Cr: 0,79 - Na: 138 - K: 4,1 - Cl: 106	TP: 77% - TTPA: 24 - INR: 1,19			2,24 mg/dl		Fabricula a to con amoxiclavámico sin signos de infección.	94	77	125-79	15	Trasladado a mutua laboral
10	85	V	17/7/18	22	27	18	12 más en planta de neurociugía	Realizados 2 TC de control posteriores, observándose aumento de las colecciones frontotemporoparietales bilaterales de aspecto serohemático. Evolución escasa favorable en UCI. Persistencia de situación de coma. Tras su paso a neurociugía, deterioro respiratorio progresivo, con pausas de apnea hasta el Evtus el 16/7/19	Hb: 13,9 - Hic: 39,6 - Leucocitos: 10250 (Neu: 83,2) - PlaQ: 185000	Gluc: 216 - Urea: 28 - Cr: 0,81 - Na: 138 - K: 4,2 - Cl: 107	TP: 101% - TTPA: 28,1 - INR: 0,99	59,10 pg/ml	11,8 pg/ml	13,6 mg/dl	43 mm					3	Evtus en el ingreso el 16/7/19

Tabla 1. Tabla de pacientes y eventos incluidos en el estudio.

Como podemos observar en la tabla adjunta, se han obtenido datos de 10 politraumatizados. 13 han sido los pacientes de los que hemos obtenido muestra de médula ósea, pero en 3 de los casos no se ha conseguido el crecimiento celular, y por tanto se han eliminado del estudio al no disponer de los datos de proliferación de MSC.

Al tratarse de un estudio preliminar, el número de pacientes es pequeño, y la variabilidad entre ellos importante. De los 10 pacientes, el menor tiene 22 años, y el más añoso está en el límite de los criterios de inclusión, 85 años. En cuanto al sexo la muestra es homogénea, 5 varones y 5 mujeres del total de pacientes incluidos.

4 pacientes se encuentran en el límite bajo del ISS considerado grave, con una puntuación de 17. Nuestro ISS más grave tiene una puntuación de 33, en una paciente precipitada con un traumatismo raquímedular no recuperado.

En cuanto a la causa del politraumatismo, en 6 de los casos se trata de accidentes de tráfico, dos de ellos atropellos, y uno de ellos un accidente de moto. De los 4 restantes tenemos tres precipitados y un raro traumatismo por el golpeo del tronco de un árbol al caer al suelo. Una de las precipitadas presentaba niveles elevados de etanol en sangre.

6 de los pacientes presentaban un TCE, tres de ellos asociados a fracturas craneales. La lesión más frecuente es la contusión pulmonar con fracturas costales, en 8 de los casos. En cuanto a lesiones vertebrales, en 2 casos existen fracturas cervicales, y en 5 casos fracturas dorsolumbares, con un caso de lesión medular y otro con lesión axonal difusa no recuperada. 4 de los politraumatizados presentaban traumatismo abdominal, con lesiones como laceraciones hepáticas, hematomas vesicales o necrosis intestinal.

Tras las fracturas costales, la fractura más frecuentemente presentada fue la clavicular, en 5 de los casos. 2 de ellas precisaron tratamiento quirúrgico y las otras tres fueron resueltas con tratamiento ortopédico. En 3 de los casos existían fracturas en el anillo pélvico. Ninguna de ellas precisó estabilización quirúrgica, tan solo la colocación de una



tracción transesquelética en uno de los casos, con buena consolidación de la fractura durante el seguimiento. En cuanto a fracturas de huesos largos, tenemos un caso de fractura de tibia y peroné intervenida con un enclavado tibial, y una fractura femoral que precisó una tracción inicial y posterior estabilización con una placa. En ambos casos fue necesaria una nueva intervención, en el caso del fémur con aporte de injerto y nueva osteosíntesis por pseudoartrosis, y en el caso de la tibia una dinamización del clavo por consolidación deficiente. El paciente de la fractura femoral desarrolló una parálisis postquirúrgica del CPE no recuperada y tratada con una férula antiequino.

Los días de ingreso también son altamente variables entre unos pacientes y otros, tanto en tiempo de estancia en UVI como el tiempo posterior en planta. La estancia más larga en UVI es de 43 días, de un politraumatizado con lesión medular. En planta, la estancia más larga son los 23 días de un accidente de moto con fracturas pélvicas y que requirió la colocación de una tracción transesquelética para su tratamiento.

Sobre la aparición de fiebre durante el ingreso, uno de los pacientes estudiados presentó febrícula mantenida durante las primeras horas en el contexto de SIRS, y posteriores picos febriles resueltos con antibiótico. Otros tres pacientes han presentado picos febriles en la evolución, tratados y resueltos con tratamiento antibiótico y sólo un cultivo positivo para *S. Hominis* en uno de los casos. Todos los demás hemocultivos obtenidos de los pacientes febriles han sido negativos.

De las proteínas relacionadas con la inflamación que se han estudiado, también se obtienen resultados interesantes. El valor más alto de VSG al ingreso son 43mm, en el paciente fallecido durante la estancia hospitalaria. También este paciente tiene el nivel más alto de PCR, 13,6 mg/dl. El mayor valor de TNF son 29,8 pg/ml en el paciente lesionado medular y la mayor IL-6 son 490 pg/ml, en un paciente con múltiples fracturas, tanto costales como de huesos largos y vertebrales, traumatismo abdominal con lesión intestinal y rotura diafragmática tras un accidente de tráfico.

En cuanto al seguimiento de los pacientes, como vemos en la tabla, en varios casos disponemos de pocos datos al alta. Uno de ellos realizó el seguimiento en su mutua laboral, por lo que no se disponen de datos tras abandonar el hospital. En otros dos casos se llevó a cabo el traslado a un centro rehabilitador por la no recuperación de sus lesiones (un lesionado medular y una lesión axonal difusa), y un cuarto se trasladó al alta a su hospital de referencia, y tan solo disponemos de datos de su evolución a corto plazo, aunque no presentaba ninguna secuela ni déficit neurológico. Ya se ha comentado también que uno de los pacientes falleció durante su estancia hospitalaria.

De los e restantes sí disponemos de información a más largo plazo. 3 de los casos fueron dados de alta de las consultas externas sin ninguna complicación ni secuela, y con consolidación de sus fracturas. En otro de los casos fue necesaria una reintervención por pseudoartrosis de fractura femoral, ya comentado en este apartado, y en la última visita, persistía parálisis del CPE postquirúrgica y se ayudaba de andador para deambular. En cuanto al último paciente, también ha sido comentado que requirió una nueva intervención de su fractura de tibia por un retardo de consolidación. Este mismo paciente, fue intervenido de forma diferida de su fractura de clavícula por desplazamiento secundario, y requirió una nueva intervención de esta por no conseguirse una síntesis adecuada. En la última revisión de la que disponemos de datos, ambas fracturas se encontraban en fase de consolidación y caminaba con apoyo parcial de la extremidad inferior afecta. No presentaba ningún otro déficit.

A continuación, se presenta los datos de los niveles de PCR, lactato, procalcitonina, Hemoglobina y leucocitos durante los días de ingreso. Se obtienen datos de los días 1,2,5,7,10,15 y 20, en caso de que el ingreso sea lo suficientemente largo. Si este es menos duradero, se obtiene un dato final del momento del alta, y si es más duradero, se obtiene el dato final del último día de ingreso. Estos datos finales se recogen en la tabla en la columna del día 20.

	PCR (mg/dl)						
	Dia 1	Dia 2	Dia 5	Dia 7	Dia 10	Dia 15	Dia 20
1	6,58	16,26	11,35	7,23	7,69		final 5,22
2	1,92	6,34					
3	5,35	18,74					final 8,45
4	0,06	4,72	5,72				final 3,49
5	13,15	3,43	12,76	7,19	4,5	5,72	3,16 (final:0,91)
6	3,63	4,83					
7	12,87	13,85	3,09	17,53	16,51	6	
8	0,39	3,46	4,25	7,53	9,05	6,29	14,57 (final 1,4)
9	2,24	6,28					final 6,30
10	13,6	9,65	9,99	9,36	12,49	8,64	final 4,10

**Tabla 2.** Evolución de PCR durante el ingreso.

Como observamos en la tabla, la PCR tiene una evolución un poco tardía, coincidiendo los picos en la mayoría de los casos con el segundo día de ingreso, y descendiendo de forma progresiva en el resto de los días. Se observa también algún pico, como los 12,76 mg/dl del paciente número 5 en el quinto día, o los 14,57 mg/dl del paciente 8 en el día 20 de ingreso. En los valores finales, la tendencia en todos ellos es a la normalización. Es importante comentar que la medición de la PCR se realiza de forma seriada en el servicio de UVI, con varias determinaciones a lo largo del día. Para la elaboración de la tabla hemos utilizado el valor de la primera analítica obtenida en cada día.

	Lactato (mmol/l)						
	Dia 1	Dia 2	Dia 5	Dia 7	Dia 10	Dia 15	Dia 20
1	3,1	1,3	1	1,4	1,1		final 1,4
2	2,3	0,8					
3	3,3						final 1,1
4	2,4	2,5	1,2				final 1,1
5	1,4	2,5	1,2	1,1	1,5	2	1,5
6	2,5	1,8					
7	2,7	1,3	1,3	0,9	1	1	
8	3,5	1,7	1,1	1,2	1,4	1,1	0,8
9		0,7					final 1
10	2,6	1,7	1,4	1,2	1,2	1,1	

**Tabla 3.** Evolución de lactato durante el ingreso.

En la mayoría de los casos, se produce un pico en el primer día, con una normalización progresiva y rápida de los valores.

	Procalcitonina						
	Dia 1	Dia 2	Dia 5	Dia 7	Dia 10	dia 15	Dia 20
1	6,91	3,56	0,78	0,43	0,2		final 0,1
2		0,06					
3	2,83	2,49					final 1,01
4		1,99					final 0,39
5		3,4	0,62	0,35	0,19	0,08	0,04(final:0,05)
6		0,74					
7	3,15	1,51	0,25		0,07	0,07	
8		0,38	0,14	0,15	0,23	0,16	0,21 (final 0,07)
9	1,3	1,11					final 0,56
10			1,36	0,57	0,21	0,11	final 0,09

**Tabla 4.** Evolución de procalcitonina durante el ingreso.

Como podemos observar en la tabla, la procalcitonina no es un parámetro que se obtenga de rutina de forma seriada en todos los pacientes. Los niveles más elevados se encuentran en los dos primeros días, con descenso progresivo posterior.

	Hemoglobina						
	Dia 1	Dia 2	Dia 5	Dia 7	Dia 10	Dia 15	Dia 20
1	9,2	7	9,6	9,6	9,1		final 9,7
2	12,3	10,1					
3	14,6	13,4					final 13,8
4	11,8	10,9	8,7				final 9
5	14,1	10,4	8,8	8,6	7,8	8,7	10,6 (final:13,4)
6	11,1	10,8	10,4	9,8			
7	13,9	8,7	9,4		9,3	11,4	
8	12,7	10,4	8,9	10,6	10,1	8,5	7,8 (final 8,9)
9	11,9	9,2					final 8,1
10	13,9	13,5	11,3	11,4	9,8	9,5	final 11

**Tabla 5.** Evolución de hemoglobina durante el ingreso.

Los niveles de Hb obtenidos son bastante oscilantes, dependiendo de las lesiones de los pacientes, intervenciones realizadas o transfusiones en muchos de los casos.

	Leucocitosis (% de neutrófilos)						
	Día 1	Día 2	Día 5	Día 7	Día 10	Día 15	Día 20
1	7420(81,7)	10550(73,9)	9240(66,1)	14000(79,1)	14770(81)		final 11350(64,9)
2	231120(86)	7750(72,8)					
3	18140(82,3)	13380(67,7)					final 11760(78,4)
4	11340 (85,5)	8780 (83,5)	6200 (64,5)				final 6140 (60,4)
5	17620(79,6)	11790(87,6)	8460(83,8)	11950(76,1)	9540(78,5)	11820(82,1)	8558(73,7) - final 5910 (57,8)
6	10550(neu:84)	7290(neu:84,7)	5810(neu:60,4)	7390(neu:59,9)			
7	19940(neu: 78,5)	7300(neu:63,5)	7810(neu:71,4)		9730(neu:73,8)	10890(neu:66,2)	
8	5540 (neu: 69,9)	14940 (neu: 89,8)	6003(neu: 74,9)	7690(neu:82,8)	8950(neu:75,6)	5190(neu:73,7)	5840(neu:74,6)
9	16150(89,9)	11510(neu:79)					final 6530(71,7)
10	10250(neu: 83,2)	9030(neu:79,9)	5850(neu:76,2)	5850(neu:82,1)	5600(neu:75)	11470(neu:84,5)	final 7810(neu:68,9)

**Tabla 6.** Evolución de leucocitos durante el ingreso.

La leucocitosis, con el porcentaje de neutrófilos, tiene tendencia progresiva al descenso hasta llegar a la normalización y estabilización. En algunos casos se producen picos, coincidentes con episodios febriles en la clínica que se resuelven y vuelven a estabilizar con tratamiento antibiótico. Los resultados finales de leucocitos de todos los pacientes están dentro de la normalidad.

## 5.2 – Estudio de MSC.

Al Laboratorio de Terapia Celular y Medicina Regenerativa del hospital de Salamanca, hemos enviado 12 muestras procedentes de pacientes sometidos a una intervención quirúrgica programada y 13 muestras procedentes de pacientes que habían sufrido politraumatismo.

Nuestro primer objetivo era estudiar comparativamente las capacidades de proliferación, el ciclo celular y la capacidad de diferenciación de las MSC de médula ósea de pacientes de cirugía programada y de pacientes politraumatizados.

Referente a los resultados obtenidos hasta la fecha, se puede resumir que las MSC de pacientes politraumatizados presentan una mayor capacidad de proliferación. Respecto al ciclo celular, las poblaciones de MSC de pacientes politraumatizados presentaron un mayor porcentaje de células en fase de síntesis. Las MSC de ambos grupos han presentado la

capacidad de diferenciación a osteoblastos y adipocitos, aparentemente sin diferencias significativas en el grado de diferenciación.

### 5.2.1 - Aislamiento y expansión de MSC.

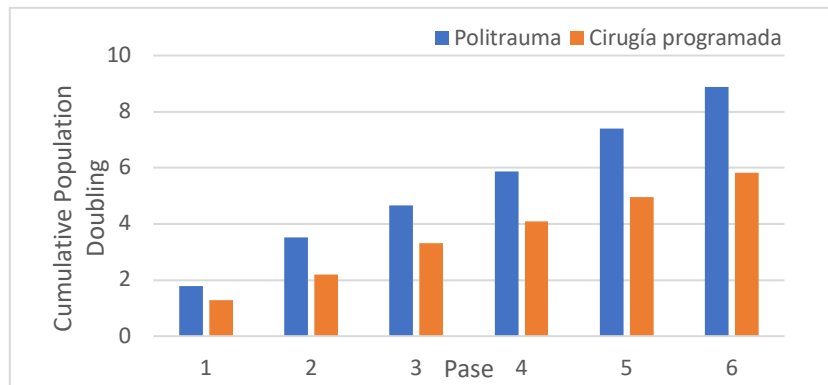
De las 12 muestras procesadas en el laboratorio procedentes de pacientes de cirugía programada se han podido expandir células mesenquimales entre los pases 3 y 6 en nueve de los casos. Referente a las muestras procedentes de pacientes con politraumatismo, hemos logrado expandir hasta los pases entre el 3 y 6, diez de las 13 muestras recepcionadas. Las muestras que no logramos expandir fueron desechadas desde el cultivo inicial ya que en ningún momento observamos células adheridas al plástico. Todos los estudios de este proyecto se han llevado a cabo con células mesenquimales entre los pases 3-6 para poder evaluar las características de las MSC establecidas.

### 5.2.2 - Análisis de proliferación

Para el análisis de la capacidad de proliferación de las MSC de los dos grupos; 8 muestras de cirugía programada y 5 de politraumatismo fueron evaluadas para el establecimiento de los siguientes resultados. Para el cálculo de los niveles de proliferación de las MSC, se calculó el *Population doubling (PD)* de cada pase, teniendo en cuenta el número de células plantadas ( $N_p$ ) y el número de células recogidas ( $N_h$ ) tras alcanzar una confluencia del 80-90% anotando el tiempo que se tardó en dicha confluencia. Para el cálculo del PD de cada pase hasta el pase 6, se siguió la fórmula:

$$PD = \frac{[\log_{10}(N_h) - \log_{10}(N_p)]}{\log_{10}(2)}$$

El *Cumulative population doubling (CPD)* se estableció para tener un conocimiento global de la capacidad de desarrollo de unas MSC, y para su cálculo se hizo el sumatorio del PD de cada uno de los pases, obteniéndose así la capacidad de proliferación de cada grupo.

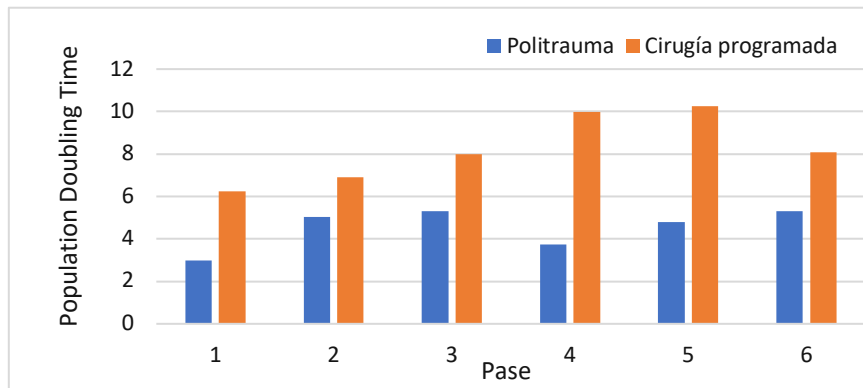


**Figura 8.** Evaluación de la capacidad proliferativa en cultivo de las MSC de pacientes politraumatizados en comparación con los de cirugía programada siendo los valores acumulados en cada pase.

El *Population doubling time (PDT)* es indicativo del tiempo que requieren las células para duplicar el número de células inicial. El PDT se determina conociendo el tiempo (t) transcurrido entre que se plantan las células ( $N_p$ ) y hasta que alcanzan la confluencia del 80-90% que se recogen ( $N_h$ ). Se sigue la fórmula:

$$PDT = \frac{t * \log_{10}(2)}{[\log_{10}(N_h) - \log_{10}(N_p)]}$$

Los resultados mostrados en la siguiente figura (Fig.9) indican que las MSC de pacientes de cirugía programada requieren más tiempo para duplicar la población, indicando que poseen un nivel de proliferación inferior a las MSC de pacientes politraumatizados.



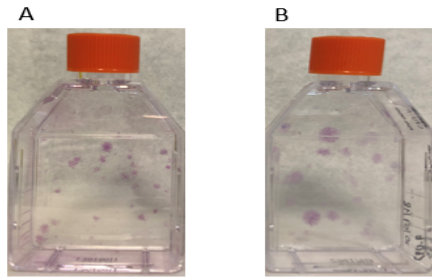
**Figura 9.** Valores del PDT de células de pacientes de cirugía programada y con politraumatismo. Se representa el tiempo requerido de las MSC para duplicar la población en cada pase.

Tanto si analizamos el CPD como PDT se observa que las células mesenquimales procedentes de pacientes traumatizados tienen una mayor capacidad de proliferación.

### 5.2.3 - Análisis de la eficiencia celular y unidades formadoras de colonias (CFU-F).

La eficiencia celular se evalúa con el estudio de la capacidad para formar colonias. Estas colonias se generan a partir de una célula con alta capacidad proliferativa, generando nuevas células (clones), es decir, con capacidad clonogénica. Para ello se plantaron 750.000 células mononucleadas, aisladas por gradiente de densidad con Ficoll, en una superficie de 25 cm<sup>2</sup>. Tras 14 días de cultivo se contaron el número de colonias de la superficie. Se realizó el estudio en 9 muestras de cada uno de los grupos analizados. Los resultados mostraron valores dispares entre las muestras de cada grupo establecidos, siendo la media 5,5 colonias para las muestras de cirugía programada y una media de 5,1 colonias en las muestras de politraumatismo.





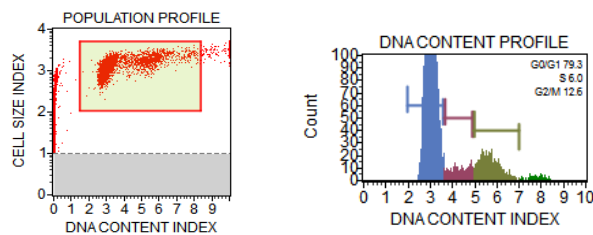
**Figura 10.** Unidades formadoras de colonias fibroblásticas de muestras de médula ósea de **A.** pacientes de cirugía programada y **B.** pacientes con politraumatismo.

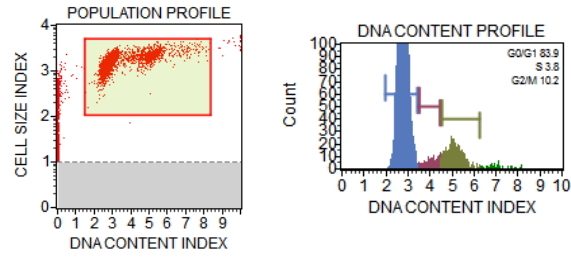
A la vista de estos hallazgos podemos decir que hay escasas diferencias entre los dos grupos celulares a la hora de su capacidad para formar colonias.

#### 5.2.4 - Análisis del ciclo celular

La determinación de la fase del ciclo en la que se encuentran las células de un cultivo puede ser indicativo de la condición y del estado proliferativo celular. Para este estudio se determinó la distribución de las MSC en las tres etapas del ciclo celular de forma indirecta, midiendo el contenido en ADN que presentaron las células MSC en el Pase 3-4. Se siguió el protocolo del kit MUSE Cell Cycle Reagent (Sigma-Aldrich). Para este estudio, 9 muestras de cirugía programada fueron procesadas, mientras que de politrauma fueron 10.

**A**





**B**

**Figura 11.** Análisis del ciclo celular poblacional de MSC de pacientes de **A.** cirugía programada y **B.** de politraumatismo.

Los valores representativos y porcentuales del estado celular en el que se encuentran las MSC en fase 3-4 de una muestra de cada grupo estudio se recogen en la siguiente tabla:

Fases Ciclo Celular	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
Cirugía programada	82	6	10,5
Politraumatismo	74	11	13

**Tabla 7.** Valores representativos del estado de las fases de ciclo celular de las MSC de ambos grupos de estudio.

Con los resultados obtenidos aparecen resultados significativos en cuanto al estado del ciclo celular de las MSC entre las dos poblaciones de estudio. Las MSC de origen politraumático presentan una mayor población en fase S del ciclo celular, indicando que tienen una tendencia superior a la división celular. Este resultado se correlaciona con los obtenidos tras el estudio de proliferación (Apartado 2 – Análisis de proliferación).

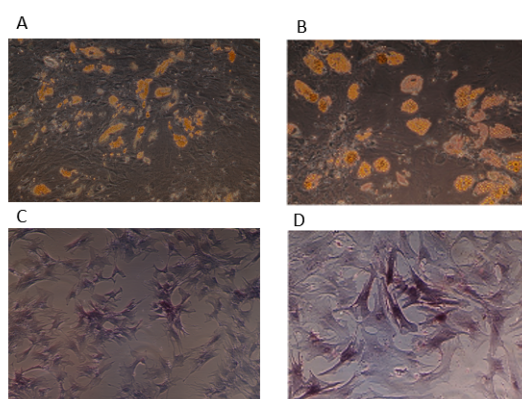
### 5.3 - Estudio de la diferenciación *in vitro*.

Una de las propiedades que caracterizan a las MSCs es su capacidad multipotente de poder diferenciarse en diferentes linajes

celulares. Para comprobar que el estudio se centra sobre MSC, se evaluó la capacidad de diferenciación en adipocitos, condrocitos y osteoblastos. Para comprobar este criterio las células fueron crecidas en un medio de diferenciación a osteoblastos durante 10 (medición de la actividad de la fosfatasa alcalina) y 21 días (medición de la capacidad de mineralización por rojo de alizarina).

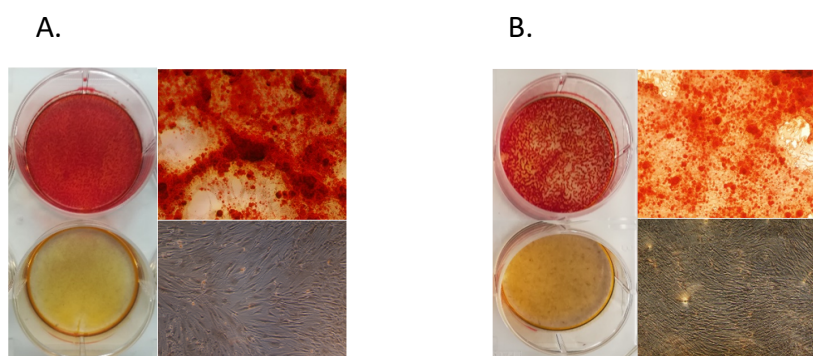
Para la diferenciación a adipocitos y condrocitos, las MSC se mantuvieron en cultivo con medios de diferenciación específicos durante 21 días para caracterizar la multipotencia de estas células en los otros dos linajes.

Diez muestras de cirugía programada fueron utilizadas para el estudio de diferenciación. Respecto a los de politraumatismo, 6 muestras fueron estudiadas para la determinación de la capacidad de diferenciación de MSC en los diferentes linajes:



**Figura 12.** Capacidad de diferenciación in vitro de MSC procedentes de pacientes con cirugía programada y politraumatizados. **A.** Tinción de Oil-Red para la identificación de MSC diferenciadas a adipocito tras 21 días de inducción de pacientes con cirugía programada y **B.** de pacientes politraumatizados. **C.** Actividad de fosfatasa alcalina para determinar la capacidad de diferenciación a osteoblasto pasados 10 días con medio de inducción de células de pacientes con cirugía programada y **D.** de pacientes con politraumatismo.

Ambos grupos de células MSC presentaron capacidad de diferenciación a osteoblasto y adipocito por ser positivos a la tinción de fosfatasa alcalina y de Oil-Red, respectivamente. Las MSC presentaron capacidad de mineralización tras 21 días en un medio de inducción (Fig. 13).



**Figura 13.** Tinción de rojo de alizarina de MSC de A. cirugía programada y B. politraumatismo cultivadas durante 21 días en medio de diferenciación a osteoblastos (parte superior de las imágenes) y medio de cultivo para el control (parte inferior de las imágenes).

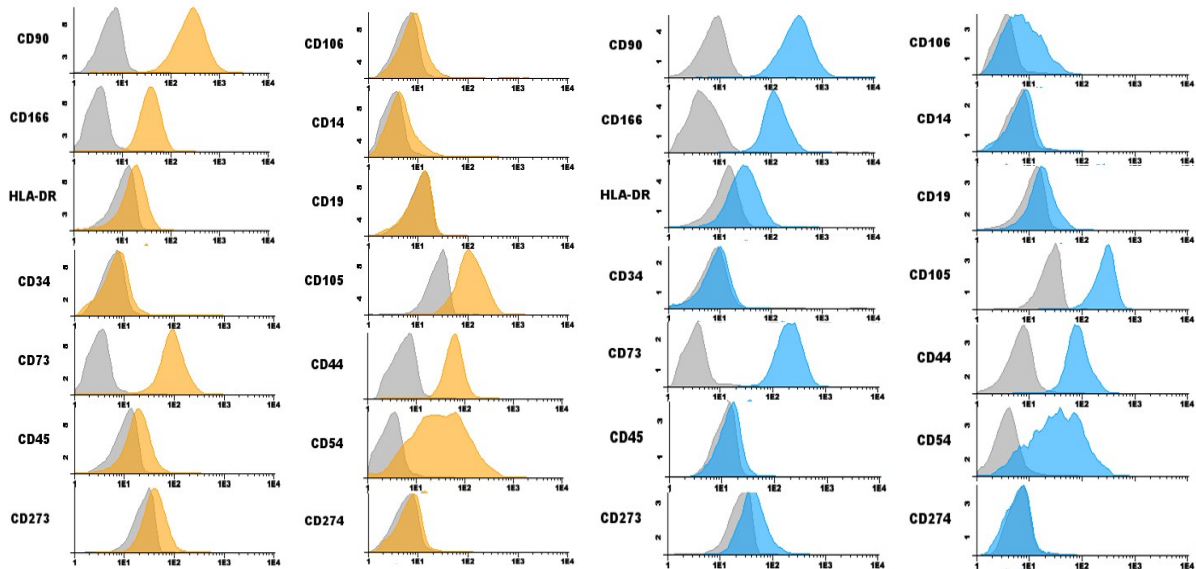
Respecto a la capacidad de diferenciación de las MSC de ambos grupos a condrocitos, lo que se ha hecho es evaluar la expresión de genes de diferenciación, como son el gen SOX-9-factor de transcripción y COL1A1-colágeno. En este caso no hay diferencias significativas entre los dos grupos de estudio, por lo que tanto las MSC de politraumatizados como los de cirugía programada presentan la misma capacidad de diferenciación a condrocito, o bien que el estrés ocasionado en los traumas no supone un cambio en la capacidad condrocítica de estas células.

### 5.3.1 - Análisis inmunofenotípico.

Otra cualidad que presentan las MSC, es la disposición o no de determinados antígenos de membrana. Las MSC no presentan antígenos característicos del linaje hematopoyético como son el CD34 o CD45. No disponen de un antígeno exclusivo, pero si son positivas para CD73, CD105 y CD90. Para ello, se analizaron diferentes marcadores de membrana permitiendo identificar la población de interés y estudiar marcadores de membrana relacionados con la migración y la proliferación celular. Los marcadores estudiados son: CD90, CD105, CD73, CD44, CD106, CD166, CD54, CD14, CD19, HLA-DR, CD34, CD45, CD273 y CD274. Para ello se

utilizan anticuerpos monoclonales con capacidad de adherencia a las diferentes proteínas de membrana. Los anticuerpos marcados con los fluorocromos FITC, PE, PerCP Cy5.5 y APC se combinaron para hacer el estudio por citometría de flujo en el equipo FACSCalibur.

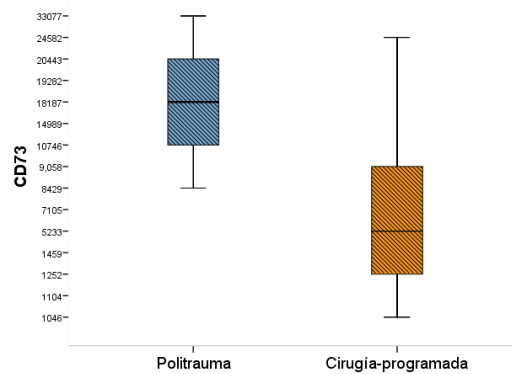
Para el estudio de marcadores de membrana, 9 muestras de cada grupo fueron analizadas.



**Figura 14.** Caracterización inmunofenotípica de MSC de pacientes de cirugía programada (naranja) y pacientes politraumatizados (azul), por citometría de flujo con respecto a sus controles sin marcar (gris). Las bandas oscuras en los histogramas representan las MSC que han sido marcadas por los anticuerpos indicados en el eje de ordenadas. Los histogramas claros representan las células sin marcar con anticuerpos.

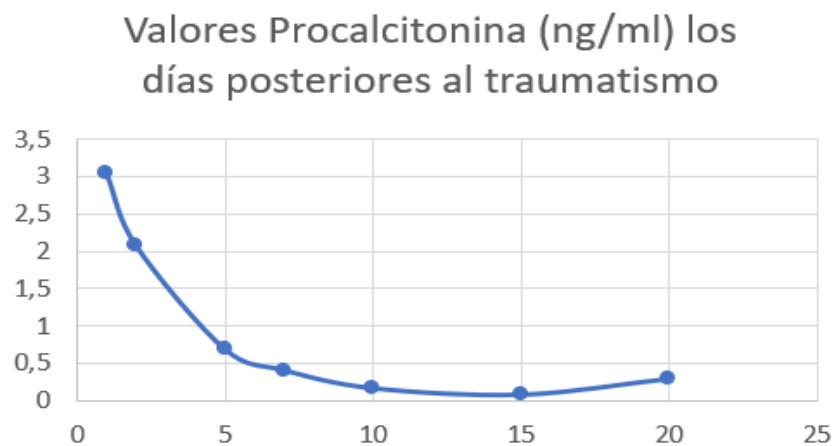
Las células obtenidas de pacientes politraumatizados y de cirugía programada presentan los antígenos CD73, CD90, CD105 y CD166, y son negativos para los marcadores CD34, CD45, CD14, CD19 y HLA-DR, por lo que se confirma que el trabajo se ha realizado con MSC según la International Society for Cellular Therapy (Fig 14). Respecto a los marcadores evaluados y comparados entre el grupo de MSC a partir de Pase 3 de pacientes de cirugía programada y el grupo de pacientes politraumatizados, no presentaron diferencias de expresión significativas en ninguno de los marcadores evaluados ( $p$ -valor  $< 0,05$ ). Parece haber

una mayor expresión del marcador CD73 (p-valor = 0,161) pero no alcanza a ser significativa. Las MSCs de ambos grupos no presentan diferencias en el nivel de expresión de los marcadores de estudio. Este resultado no es exclusivo de que no haya variación en la expresión por la condición de estrés del paciente politraumatizado, puesto que los niveles de estos marcadores se pueden haber normalizado tras más de 20 días en cultivo (hasta Pase 3).

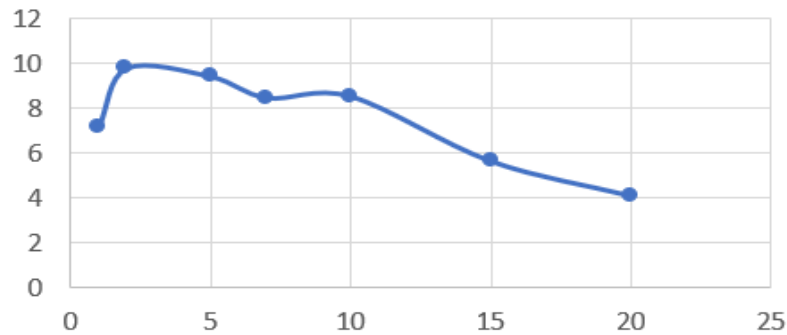


**Figura 15.** Niveles de expresión del marcador CD73 en las MSC de ambos grupos de estudio

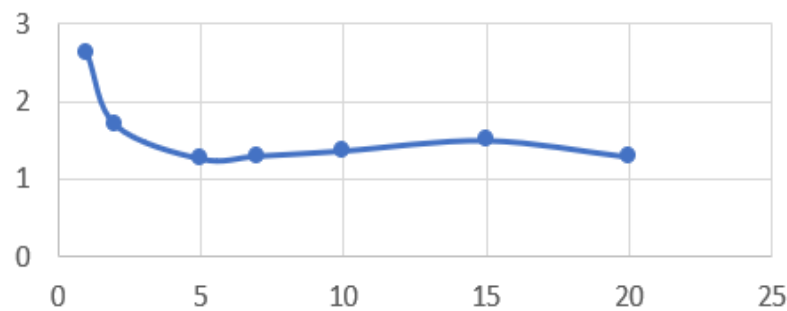
La respuesta del organismo frente a un politraumatismo se puede medir analizando la concentración en sangre de una serie de factores, pudiendo ser determinantes para su pronóstico. Referente a los estudios clínicos (bioquímica, hemograma) de los pacientes politraumatizados se destacan los niveles altos en plasma de la proteína C reactiva, lactato y procalcitonina en los primeros días tras el traumatismo (Fig. 16).



Valores PCR (mg/dl) los días posteriores al traumatismo

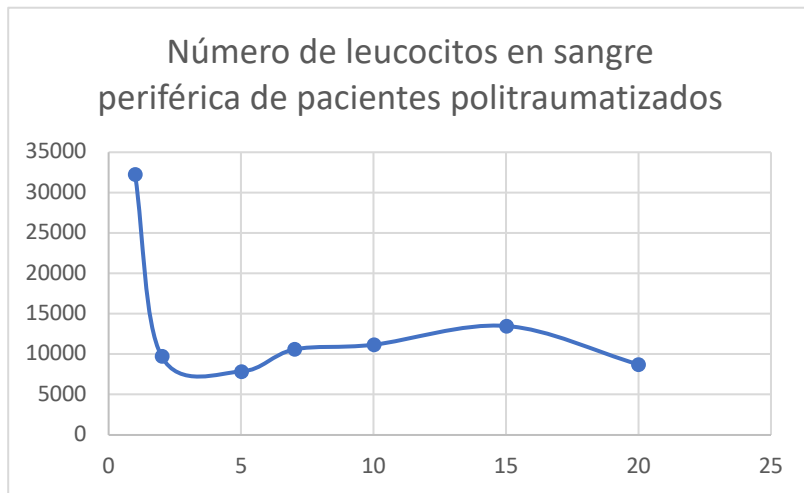


Valores Lactato (mmol/l) los días posteriores al traumatismo



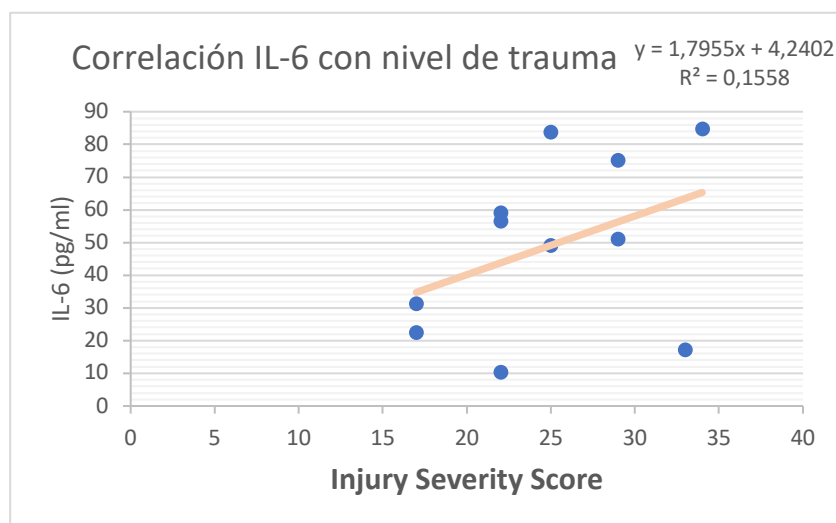
**Figura 16.** Valores medios (eje vertical) en plasma de proteína C reactiva, lactato y procalcitonina de los pacientes politraumatizados con respecto a los días tras el accidente (eje horizontal).

Los pacientes politraumatizados mostraron una leucocitosis en plasma en las primeras horas tras el traumatismo, seguido de una disminución de los niveles de estos, por debajo de los basales (4500-11000 leucos por microlitro) en los siguientes días.



**Figura 17.** Niveles de leucocitos en sangre de pacientes politraumatizados en los días posteriores al accidente.

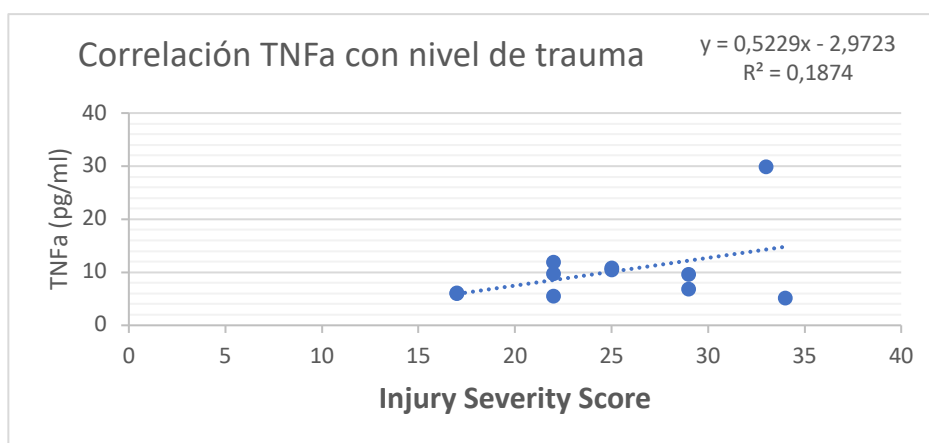
El análisis del plasma llevado a cabo ha permitido conocer los niveles de citoquinas como la IL-6 o TNFa tras el politraumatismo. Estos factores moleculares son liberados en condiciones de inflamación y de respuesta celular hacia cierto estrés. En el caso de la IL-6 se puede correlacionar la concentración en plasma de esta molécula con respecto a la puntuación de politraumatismo que se le atribuye a cada paciente según sus lesiones. En la siguiente figura se observa una tendencia, donde mayor número y gravedad de las lesiones supone un aumento de IL-6 en plasma (Fig. 18).



**Figura 18.** Correlación niveles en plasma de IL-6 con la severidad del politraumatismo de cada paciente.

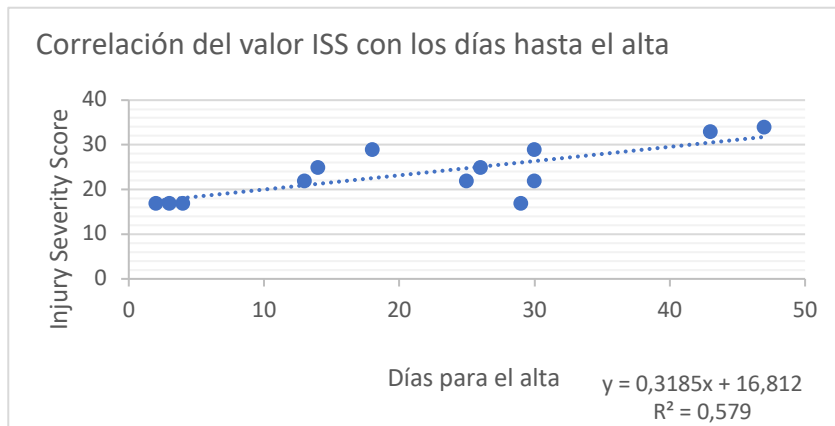


En un caso similar se encuentra el factor TNFa, pero con una pendiente inferior (Fig. 19). Estos resultados permiten tener una idea de la respuesta celular antes los traumatismos, no obstante, se ha de aumentar el número de pacientes para una mayor confianza.



**Figura 19.** Correlación de los niveles en plasma de TNFa con la severidad del politraumatismo de cada paciente.

Se conoce que estos factores moleculares pueden actuar sobre el comportamiento de las células mesenquimales estromales, actuando sobre receptores de membrana que activan una ruta de señalización celular que finaliza con una respuesta celular ante dicho estímulo. En este estudio no se ha visto correlación con la capacidad de proliferación y el nivel de ISS asignado a cada paciente. No obstante, las MSC de pacientes politraumatizados han presentado una mayor capacidad de proliferación que las de cirugía programada (Fig. 8), por lo que se puede pensar que el traumatismo condiciona una respuesta de inducción en la proliferación de las MSC.



**Figura 20.** Correlación del valor ISS de cada paciente con los días de recuperación hasta el alta.

Existe una correlación directa entre la gravedad del traumatismo y los días de recuperación de los pacientes, a mayor número y severidad de los traumatismos, los pacientes requieren de más tiempo para recibir el alta. El papel que pueden desempeñar las MSCs en el control de la inflamación del sistema y en la recuperación de los tejidos no se puede correlacionar directamente con la capacidad de proliferación de estas MSC, por haber gran heterogeneidad entre la severidad y tipo de traumatismos, y depende de gran número de variantes. No obstante, las MSCs que migran desde la médula ósea o están presentes en el tejido dañado por el traumatismo reciben una inducción mediada por citoquinas, factores moleculares o por contacto directo, lo que provoca la estimulación de la proliferación de estas células. Esta inducción provoca un aumento de esta población en un menor tiempo, consiguiendo una mayor actividad inmunomoduladora y de reparación de los tejidos. Este factor puede ser condicionante en la recuperación de la homeostasis de los tejidos, favoreciendo la mejoría del paciente y su pronóstico.

## 6. Discusión.

Como nos hemos venido refiriendo en todo este texto, el paciente politraumatizado es aquel que presenta (2) “lesiones importantes en tres o más puntos de dos o más regiones anatómicas, unidas a una o más variables adicionales de los 5 parámetros fisiológicos”, que son: hipotensión, bajo nivel de conciencia, acidosis, coagulopatía y edad mayor o igual a 70 años. El traumatismo grave es actualmente en nuestro país, la principal causa de muerte en las cuatro primeras décadas de la vida, con todo lo que ello supone. Se trata habitualmente de pacientes previamente sanos, que además del alto riesgo de muerte, pueden presentar importantes secuelas relacionadas con el traumatismo, llegando incluso a ser completamente dependientes para cualquier actividad. Además de los problemas en la salud y calidad de vida, estos pacientes suponen un gran problema socio económico para el país ya que como hemos dicho, se trata de pacientes jóvenes en su mayoría, previamente activos laboralmente, y que a consecuencia de su traumatismo pueden perder su capacidad de trabajo y pasar a depender económicamente del Estado.

De las tres curvas de mortalidad que afectan a estos pacientes, en este estudio nos centramos en la tercera, la que ocurre días o semanas después del traumatismo y que es consecuencia del fracaso multiorgánico por la no recuperación de las múltiples lesiones. Aquí es donde tiene cabida el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y el papel que hemos visto que desarrollan las células MSC en su regulación.

Múltiples estudios nos han hablado del efecto inmunomodulador de las MSC, tal y como hemos visto en la introducción de este texto. Centrándonos en el paciente politraumatizado, ya disponíamos de datos que avalaban su implicación, como su aumento en casos de daño muscular (132), aumentos en caso de traumatismo múltiple (125), o incluso tras producirse fracturas (131), siendo este aumento mayor en pacientes jóvenes. In vitro y en modelo animal, también se han publicado estudios

sobre la migración de las MSC a la zona lesionada en animales sometidos a trasplante de MSC (128).

Con nuestro estudio ampliamos este campo con nuevos datos y algunos otros ya mencionados en anteriores estudios. En la misma línea de este trabajo, Amann et al. (172) han publicado sus resultados el pasado año. Este grupo compara, mediante un estudio de expresión génica y secreción proteica, el efecto que tienen sobre las MSC la activación con suero de paciente politraumatizado, con IL1B (conocido activador de estas células), y un cóctel de proteínas inflamatorias empleado a dosis altas o estándar. Este cóctel se utiliza basándose en varios estudios realizados sobre pacientes politraumatizados, como el publicado por Hobisch-Hagen (173). En el caso de la IL1B, es bien conocido que tanto ella como la IL-6 actúan haciendo proliferar las MSC (145), como avalan este y otros trabajos. Pues bien, lo primero que han concluido es que la IL1B como estímulo único tiene la misma capacidad que los cócteles empleados para activar las MSC y provocar la secreción de citocinas. Esto ya había sido visto en otros trabajos (129), aunque en este caso, al contrario que lo publicado por Hengartner, si existían diferencias en función de la concentración de IL1B.

Nuestro grupo también ha demostrado este aumento en la capacidad de proliferación de las MSC en el paciente politraumatizado, en este caso con los datos in vivo que publicamos en este trabajo. Calculando el *Cumulative Population doubling* obtenemos información detallada de la diferencia en cuanto a la proliferación de las MSC que existe entre los dos grupos estudiados. En las tablas expuestas en el apartado de resultados podemos observar de forma muy visual la importante proliferación de MSC que se produce in vivo en estos pacientes politraumatizados en comparación con aquellos sometidos a cirugía programada, que también supone una agresión para el organismo.

Desde el primer pase ya podemos observar la mayor proliferación de las MSC, diferencia que va en aumento con los sucesivos pases. Este aumento de proliferación ya había sido estudiado en varios tipos de lesiones, pero según nuestros datos es la primera vez que se confirma en

un estudio in vivo con pacientes politraumatizados. Aunque el análisis de proliferación es claramente positivo a favor de las MSC de pacientes politraumatizados, no hemos encontrado diferencias significativas en cuanto al número de CFU-F entre los dos grupos de estudio. Aquí podemos pensar que el número de CFU-F no se relaciona con la situación de estrés de los traumas, y que podría venir reflejado por factores intrínsecos de los pacientes como la edad o el sexo.

En nuestro estudio no hemos visto relación entre la severidad del traumatismo y la mayor proliferación de las MSC, mediante el análisis del nivel de proliferación de estas células en función del ISS asignado a cada paciente introducido en el estudio. No obstante, aunque no hemos encontrado esta relación con la severidad, con los datos anteriores se puede decir que el traumatismo sí condiciona una respuesta de inducción sobre las MSC, mayor que en los pacientes control. Una explicación a esto puede ser que el aumento en la proliferación se dé por la implicación de otros factores solubles, como otras citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento u moléculas que no han sido incluidas en este estudio. No hemos encontrado datos concluyentes en la literatura sobre este tema.

El trabajo de Amann (172) habla de que, a pesar de los estudios previos, los genes regulados por el grupo estimulado con el suero y los que habían recibido cualquiera de las otras opciones eran diferentes, y por tanto también las proteínas encontradas. Lo explican por la ausencia de IL1B en el suero de los pacientes politraumatizados (no encontrado en los análisis posteriores del mismo), por lo que el proceso podría estar mediado por otras sustancias. Esto parece poder explicarse por las diferencias de severidad del traumatismo, que hace que las citocinas presentes en el suero pueda ser menor (172), y por tanto la activación de las MSC también lo sea.

Nuestro trabajo nos da información a este respecto, encontrándose una relación lineal entre el ISS de nuestros pacientes y el nivel de IL-6 o el TNF-alfa, aunque menor en este último caso. Estas son las dos únicas citocinas que nosotros hemos analizado. Ambas son liberadas en el proceso de lesión tisular a través de la acción del FN-kB, actuando como

citocinas proinflamatorias perpetuando la cascada (13). La IL-6 es clave en este proceso de fase aguda, siendo la responsable de la fiebre, taquicardia, leucocitosis e incremento de reactantes de fase aguda.

La relación entre los niveles de IL-6 y el ISS no ha sido descrita por nosotros por primera vez, sino que existen estudios previos en esa línea (174). Benjamin Sears y su equipo ya en 2009 hablaban de que la IL-6 y el HLA-DR2 eran los mejores marcadores para predecir los resultados y complicaciones en pacientes politraumatizados (175). Nuestros datos ayudan a confirmar los ya publicados.

Esta acción de la IL-6 es la responsable entre otras cosas de la leucocitosis, que también hemos observado en los primeros días tras el traumatismo, y que desciende de forma importante en casi todos los casos, llegando a cifras normales alrededor del 4-5 día de ingreso.

Otra de las relaciones de la IL-6 es con el aumento de RFA. Hemos observado aumentos importantes tanto de PCR, como procalcitonina como lactato en sangre periférica de estos pacientes durante los primeros días de ingreso. Tanto procalcitonina como lactato disminuyen de forma importante ya desde los siguientes días, mientras que la PCR lo hace de forma más progresiva (alcanza su máximo en torno a las 50 horas). Ya hemos hablado en este texto sobre la importancia que tienen estos reactantes, sobre todo PCR y procalcitonina, en el diagnóstico de una posible infección, hablándose de hasta un 85% de posibilidades de esta en caso de que ambos factores se eleven tras el repunte inicial (18,19). En nuestro estudio en ninguno de los pacientes se ha confirmado el diagnóstico de sepsis durante el ingreso.

Junto con toda la correlación clínica que hemos ido viendo en este apartado, el dato más importante que hemos encontrado en este estudio es la gran diferencia en la fase del ciclo celular en la que se encuentran las MSC de ambos grupos. El mayor porcentaje de células de politraumatismo en fase S nos habla de la mayor tendencia de estas células a la división y, por tanto, confirma esta mayor capacidad de proliferación, unos de los principales objetivos de nuestro trabajo.

No podemos correlacionar directamente la capacidad de

recuperación de los pacientes politraumatizados con la capacidad de proliferación de las MSCs con los datos que disponemos, ya que aquí existe mucha variabilidad en cuanto a traumatismo, severidad, etc., pero sí podemos decir que estas células reciben una inducción mediada por citocinas, moléculas de contacto directo etc. que provoca su estímulo y proliferación. Como ya hemos comentado previamente, se trata de un estudio preliminar, que busca obtener unos datos iniciales que nos orienten sobre los parámetros más importantes que debemos tener en cuenta para posteriores trabajos que desarrollen este tema. Somos conscientes de que la muestra estudiada es pequeña, por lo que los datos estadísticos obtenidos no permiten sacar conclusiones a gran escala, sino que sientan las bases sobre la línea de trabajo a seguir. Como hemos dicho, no hemos podido correlacionar la severidad de las lesiones del paciente con una mayor proliferación de MSCs, algo que a priori podría parecer factible, ya que si hemos visto que se produce un aumento de MSCs con el traumatismo. Esa pequeña "n" de la que disponemos en este estudio podría ser una razón por la que no hemos obtenido significación estadística en este sentido, y por tanto nuevos estudios con un mayor número de pacientes podrían aclararlo. También es cierto que sólo uno de nuestros pacientes presentó una evolución fatal, lo que hace muy escasos los datos en estas situaciones extremas. Posiblemente, el tener más pacientes con evolución desfavorable, arrojaría más datos en este sentido, y permitiría obtener conclusiones más precisas sobre la relación de la gravedad del traumatismo y la proliferación de MSCs.

Como hemos visto en la descripción de los pacientes, el abanico de edades que existe entre los pacientes es amplio, desde los 22 años de la más joven a los 85 del más añoso. Esto es importante ya que la capacidad de respuesta del organismo de uno y otro no es la misma. Sería interesante también en un estudio posterior con más pacientes, plantear posibles diferencias en cuanto a la edad en el desarrollo de SIRS y respuesta de MSC. En nuestro caso, el único paciente fallecido es este varón de 85 años, y se sitúa en la mitad de la tabla en cuanto a gravedad de las lesiones iniciales (ISS). Otro punto a tener en cuenta es la pérdida de datos de evolución final tras el alta que existe, ya que en tres de los casos el

seguimiento se ha realizado en otros centros y no se conoce realmente la evolución posterior al alta.

Para ulteriores estudios, sería interesante, además de lo comentado en el párrafo anterior, llevar a cabo análisis seriados de las MSC además de los datos de laboratorio obtenidos. Esto nos daría mucha más información sobre el comportamiento de las MSC de estos pacientes durante la evolución, según los eventos que van surgiendo en el ingreso, descompensaciones, etc. y arrojaría mas luz sobre las implicaciones de estas células en el politraumatismo.

Y, en último caso, ¿para qué podemos utilizar estos datos? Pues bien, el principal interés del estudio de las MSCs es su empleo como herramienta terapéutica. Ya sabemos que estas células aumentan su proliferación en el politraumatizado, y sabemos de la importante capacidad inmunomoduladora que presentan. Por tanto, podemos hipotetizar sobre su papel como herramienta terapéutica en la prevención y control de SRIS, causa de la mortalidad tardía en el paciente politraumatizado.

El empleo de MSC como herramienta terapéutica ya se ha demostrado en otras patologías. Las MSC se han empleado, por ejemplo, para tratar la enfermedad de injerto contra huésped en pacientes refractarios a corticoides. En los primeros estudios se demostró que esta terapia era segura y efectiva, pero en muchos de ellos los pacientes recibían sólo una o dos dosis de MSCs (10,176,177). En 2014, Sánchez-Guijo et al. Publicaron un estudio en el que aplicaban una dosis de MSCs expandidas con lisado de plaquetas en el día 1, 4, 11 y 18 en pacientes con enfermedad de injerto contra huésped refractaria a corticoides. Estudios previos empleaban suero de ternera o suero humano autólogo para la expansión de las MSCs (10,178–181), pero se ha demostrado que las MSC expandidas con lisado de plaquetas tienen propiedades similares y es una técnica más sencilla y con importantes ventajas (182). La dosis fue aplicada a 25 pacientes, de los cuales 21 recibieron 3 dosis y 18 las 4 dosis. De todos ellos, 17 pacientes respondieron al tratamiento, 11 con una respuesta completa, con una media de 28 días tras la administración de la primera dosis. Sólo reportan una complicación en uno de los pacientes, un evento



isquémico cardiaco en un paciente con historia previa de enfermedad. Por lo tanto, es una estrategia segura y con buenos resultados en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped.

No sólo en esta patología se han empleado las MSCs. También existen datos en otras, por ejemplo, como tratamiento del Síndrome de Distress Respiratorio del Adulto (SDRA). En 2014 Zheng et al. Publican su estudio (183). Utilizan 12 pacientes randomizados a recibir tratamiento con MSC alogénicas derivadas de tejido adiposo o placebo. La presencia de MSC en tejido adiposo fue descrita por Zuk et al (134) y tienen la ventaja de la mayor accesibilidad para su obtención y de encontrarse en mayor proporción, en torno a un 2% de las células nucleadas de la grasa (184). Aplican una dosis intravenosa de  $1 \times 10^6$  cels/kg de peso, y analizan la presencia de efectos adversos y marcadores de lesión como IL-6, IL-8 o proteína surfactante D (SF-D). La administración intravenosa de MSC parece ser especialmente ventajosa en cuanto a su distribución a los pulmones (185). No reportan un aumento de toxicidad o efectos adversos con el tratamiento. Sí existe una mejora significativa en la medición de SF-D y también una mejora en los niveles de IL-6 a los 5 días tras tratamiento, aunque este dato no es estadísticamente significativo. La conclusión que obtienen es que el tratamiento parece ser seguro, aunque los resultados obtenidos con la dosis utilizada son débiles y nuevos estudios serían necesarios. También existen estudios previos en enfermedad pulmonar obstructiva crónica (186) con resultados similares en la actividad y ausencia de efectos adversos.

En la Enfermedad Inflamatoria Intestinal también tenemos trabajos con el empleo de MSC. De la Portilla et al. (187) publicaron sus resultados tratando fistulas de pacientes con enfermedad de Crohn con una inyección intralesional de una suspensión de MSC alogénicas derivadas de tejido adiposo. 24 pacientes fueron incluidos en el estudio, seguidos durante 24 semanas y una nueva dosis del doble de la primera era aplicada en la semana 12 si no se veía curación. No reportan efectos adversos del tratamiento, con unos resultados aceptables. Un 69% de los pacientes tenían una reducción en el número de fístulas y un 56% tenían un cierre

completo, definido este como ausencia de supuración y completa reepitelización del orificio externo y ausencia de colecciones en RNM. Existen otros estudios similares como es el caso del llevado a cabo por Ciccocioppo et al (188), aunque en este caso emplean MSC autólogas derivadas de médula ósea.

Así mismo, existen datos en algunas enfermedades autoinmunes, como el Lupus Eritematosos Sistémico (LES). Se han empleado MSC en pacientes refractarios al tratamiento convencional. En este estudio de Sun et al. (189) 16 pacientes fueron tratados de esta forma, con mejorías significativas tanto en los parámetros clínicos de la enfermedad como en los valores séricos de ANA, anticuerpos anti-dsDNA o función renal. Se ha visto también un aumento de Treg periféricas, y un restablecimiento del balance Th1/Th2. Se trata por tanto de datos muy prometedores como punto de partida para nuevas investigaciones. Existen otros estudios que van en la misma dirección (9,190). Incluso tenemos también estudios que comparan la administración de una única dosis de MSC o si los efectos serían mayores con dos dosis, concluyendo que una única dosis de MSC de un millón por kg de peso es suficiente para conseguir la remisión de la enfermedad en el LES refractario (191).

No es el único empleo que se ha estudiado en enfermedades autoinmunes. En la esclerosis múltiple también se han utilizado MSC con resultados prometedores. Previamente se conocía por estudios in vitro y modelos experimentales los datos prometedores del tratamiento con MSC para la enfermedad vascular periférica severa (192,193). Ishigatsubo et al. las utilizaron para reducir tanto el tamaño como el número de úlceras digitales resistentes al tratamiento en pacientes con esclerosis múltiple, mediante la inyección intramuscular de MSC derivadas de la médula ósea en los miembros isquémicos (194). También Nevskaya et al. las utilizaron de forma local en úlceras digitales, resultando en una curación acelerada (195). Incluso existe un caso de isquemia aguda severa en paciente con esclerosis múltiple tratada con tres infusiones intravenosas de MSC y consiguiendo ya tras la primera inyección una disminución de las áreas de necrosis. La angiografía posterior mostró una revascularización de los

miembros y los cortes histológicos un aumento de la expresión de factores angiogénicos (196).

Incluso en cirrosis hepática causada por hepatitis B se han empleado estas células, consiguiendo mejorías en los parámetros analizados a corto plazo (2-3 primeras semanas tras el trasplante) en comparación con el grupo control (197), datos que no son tan claros a largo plazo.

Otra patología en la que el tratamiento con MSC ha sido estudiado es en el infarto de miocardio, aunque en este caso en un modelo animal. Lo que hace el grupo de Miyahara et al (198) es cultivar MSC de tejido adiposo y construir con ellas una monocapa mediante la tecnología de laminado celular. Esta monocapa es trasplantada sobre el tejido cardiaco cicatrizado de las ratas tras haberles producido una isquemia 4 semanas antes mediante ligado coronario. Observan que este tejido trasplantado, gradualmente va formando una capa de neovasos, células indiferenciadas y algunos cardiomiocitos. Esto hace que la función cardiaca de las ratas trasplantadas mejore.

También en modelo animal disponemos de datos en traumatismos craneales. Tras una lesión aguda, la microglia se diferencia en macrófagos neurotóxicos proinflamatorios M1 (199). Estos M1 activados son responsables de la producción continuada de citocinas proinflamatorias y sustancias citodestructivas (200). El grupo de Walker et al. (201) realizaron un experimento inyectando MSC intravenosas a ratones 24 horas después de sufrir un traumatismo cortical controlado. Realizaron varias mediciones posteriores in vivo y tras sacrificar a los modelos. Observan un aumento en las células Treg tanto a nivel esplénico como en plasma ya a las 24 horas de la administración de las MSC. También observan un aumento de la relación de macrófagos M2/M1 a nivel cerebral, secundario a una apoptosis de macrófagos M1, que como hemos visto anteriormente, son los responsables de mantener la inflamación.

Como vemos, el estudio y empleo de estas células como tratamiento de diferentes patologías es actualmente objeto de numerosos estudios, debido a las altas capacidades regenerativas e inmunomoduladoras que poseen las MSC, lo que las hace las células ideales como terapia dirigida

a acabar con múltiples enfermedades.

Nuestro trabajo actual aporta más datos para sentar las bases del diseño de nuevos estudios que empleen las MSC como tratamiento y prevención del SRIS.

## 7. Conclusiones.

### 7.1 General:

**Comparar las características fenotípicas y funcionales de las MSCs de los pacientes ingresados por un trauma grave con los ingresados para una cirugía programada.**

En este aspecto podemos afirmar que fenotípicamente no existen diferencias significativas en ambos grupos celulares comparados. No obstante, los datos apoyan que las MSC de pacientes politraumatizados se activan y duplican en mayor proporción que en el grupo control.

### 7.2 Específicos:

**Describir las características de las poblaciones de MSCs de pacientes con trauma grave, en cuanto a:**

▪ **Capacidad de proliferación:** las MSCs de los pacientes del grupo de politraumatizados presentan una gran capacidad proliferativa ante el traumatismo, mucho mayor que la observada en el grupo control.

▪ **Caracterización inmunofenotípica:** en este apartado podemos decir que no hemos encontrado diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a marcadores de membrana y capacidad de diferenciación. En todos los casos, las células cumplían los criterios inmunofenotípicos de la “International Society for Cellular Therapy”, lo que confirma que el trabajo ha sido realizado con MSCs.

▪ **Ciclo celular:** hemos encontrado un mayor porcentaje de células en fase de división en el grupo de politraumatizados, lo que ayuda a apoyar esa mayor capacidad de proliferación observada en el estudio.

▪ **Producción de citocinas:** se observan elevados niveles tanto de IL-6 como de TNF-alfa en el politraumatizado, correlacionándose de forma importante con el grado del traumatismo.

**Analizar la situación clínica de los pacientes críticos, así como los datos de laboratorio relacionados con su situación clínica.**

Hemos observado que los niveles de IL-6 suponen un buen predictor del estado de gravedad del paciente, con relación lineal entre estos y el

valor de ISS. El ISS se relaciona a su vez con una mayor estancia hospitalaria.

**Correlacionar las características funcionales de las MSCs con la evolución o situación clínica de los pacientes con trauma grave y con los marcadores de inflamación.**

En este trabajo hemos observado una mayor proliferación de las MSC en pacientes politraumatizados, pero no una relación entre el grado de gravedad del traumatismo, medido con el ISS, y una mayor actividad de estas células. Fenotípicamente y en cuanto a capacidad de diferenciación, estas células no presentan diferencias con las del grupo control.

## 8. Anexo.

COMPLEJO ASISTENCIAL UNIVERSITARIO  
DE SALAMANCA. SERVICIO DE TRAUMATOLOGÍA

APELLIDOS: \_\_\_\_\_  
NOMBRE: \_\_\_\_\_  
DNI/NIE: \_\_\_\_\_  
Nº S.S.: \_\_\_\_\_  
EDAD: \_\_\_\_\_ SEXO: \_\_\_\_\_

### **DONACIÓN VOLUNTARIA DE MÉDULA ÓSEA Y/O SANGRE PERIFÉRICA DE DONANTES SANOS y PACIENTES CRÍTICOS PARA EL ESTUDIO “CÉLULAS MESENQUIMALES EN EL PACIENTE TRAUMATIZADO. ESTUDIO COMPARTIVO.”**

#### **Introducción y finalidad**

Para un adecuado avance en la investigación médica es necesario estudiar muestras de sangre y tejidos procedentes de donantes sanos y pacientes, con el fin de conocer mejor las características de las células patológicas y los mecanismos que intervienen en el desarrollo de diferentes enfermedades de los pacientes críticos o politraumatizados.

En concreto, el servicio de Traumatología y el servicio de hematología del Hospital Universitario de Salamanca investiga sobre la posible relación de la activación de las células madre mesenquimales en pacientes en situación crítica (politraumatismo etc.)

Toda la información personal que se recopile o genere en el estudio quedará protegida de acuerdo con la legislación vigente.

#### **Descripción del proceso:**

- A. Se le informará sobre los objetivos del proyecto de investigación para el que se emplearán las muestras y se le responderá a las dudas que pueda plantear.
- B. La donación de las muestras debe hacerlo de forma totalmente voluntaria.
- C. No percibirá ninguna recompensa económica o de otro tipo por las muestras. Los resultados de las investigaciones que se realicen pueden llegar a ser valiosos desde un punto de vista clínico. Si usted lo desea podrá ser informado de los resultados finales de la investigación.
- D. La negativa a proporcionar su consentimiento no comportará repercusión alguna, ni afectará en ningún modo a los cuidados médicos y a la asistencia que usted reciba.
- E. Se le tomará muestra de médula ósea de cresta iliaca (aproximadamente 5-9ml) mediante aspirado de la misma con aguja fina, previa anestesia local de la zona, o durante la realización de otro procedimiento quirúrgico. En la mayoría de los pacientes el dolor o molestias son mínimas. Las complicaciones descritas asociadas al procedimiento son las siguientes: hemorragia/hematoma en la zona de la punción, que en casos raros puede producir compresión y/o irritación nerviosa, infección de la herida, rotura de la aguja de punción y reacción alérgica a la anestesia. La incidencia de las complicaciones descritas es muy baja (alrededor del 1 por mil en la experiencia del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca). Se aprovechará la punción que se realice para extracción de la muestra con fines diagnósticos y terapéuticos, de manera que usted donará para investigación biomédica el remanente de médula ósea que no sea necesario para el diagnóstico o tratamiento, que siempre será prioritario.
- F. Los productos obtenidos de las muestras y los datos generados a partir de las mismas serán almacenados y custodiados manteniéndose la confidencialidad y el respeto absoluto a los datos y muestras personales.
- G. Las muestras estarán codificadas de forma que la identidad del donante será anónima para los investigadores.

APELLIDOS:	_____
NOMBRE:	_____
DNI/NIE:	_____
Nº S.S.:	_____
EDAD:	_____ <u>SEXO:</u> _____

- H. Los análisis genéticos y fenotípicos realizados serán almacenadas de forma informática y tratados estadísticamente, exclusivamente para fines de investigación biomédica, de acuerdo a lo descrito anteriormente.
- I. Las personas responsables de la custodia de este documento y de las muestras y datos asociados a las mismas, garantizarán que la identidad del donante no sea accesible a personas ajenas al proyecto de investigación.
- J. En todo momento el donante tendrá acceso a los datos registrados, siempre que expresamente lo solicite.
- K. Sólo si el donante lo solicita, se transferirá la información a terceras personas fuera de los proyectos de investigación para los que han sido cedidas las muestras.
- L. En cualquier momento usted puede revocar su consentimiento y solicitar la destrucción de sus datos personales y de las muestras de sus tejidos que estén almacenadas en ese momento.
- M. En algunos casos será necesaria la recogida adicional de datos contenidos en su historia clínica para realizar los estudios pertinentes. En esta situación, se seguirá la misma política de confidencialidad y se requiere también de su consentimiento para poder acceder a dicha información con fines de investigación.
- N. Para todo lo no previsto en este documento, se aplicará la legislación vigente sobre protección de datos de carácter personal (Ley 41/2002 de 14 de noviembre básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica: BOE ~~num.~~ 274 de 15 de noviembre 2002); Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de protección de datos personales, BOE 298 de 14 de diciembre de 1999; Real decreto 1720/2007, de 21 de diciembre por el que se aprueba el Reglamento de Desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de caracteres personal) y cualquier otra que resultara aplicable.

Recibirá usted una copia de esta hoja de información al paciente y del consentimiento informado firmado por usted o representante legal

---

#### DECLARACIONES Y FIRMAS

▪ **Declaración del donante o representante legal:**

He sido informado por el profesional de salud abajo mencionado:

- Sobre las ventajas e inconvenientes de este procedimiento.
- Sobre el lugar de obtención, almacenamiento y el proceso que sufrirán los datos personales y las muestras.
- Sobre el fin para el que se utilizarán mis muestras y datos personales (estudios fenotípicos, genéticos o estadísticos), que cumplan todos los requisitos que exige la ley.
- Que mis muestras y datos personales serán proporcionados de forma codificada a los investigadores que trabajen con ellas.



APELLIDOS: \_\_\_\_\_  
NOMBRE: \_\_\_\_\_  
DNI/NIE: \_\_\_\_\_  
Nº S.S.: \_\_\_\_\_  
EDAD: \_\_\_\_\_ SEXO: \_\_\_\_\_

- Que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento y solicitar la eliminación de mis datos personales y muestras que permanezcan almacenadas en el
- Que en cualquier momento puedo solicitar información genérica sobre los estudios para los que se han utilizado mis muestras de médula ósea y/o sangre.
- Que tengo derecho de acceso a los datos asociados a mis muestras.
- Que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas.

Accedo a que el personal del Hospital Clínico Universitario de Salamanca / Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca se ponga en contacto conmigo en el futuro, en caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos.

- Sí  
 No

Nombre: ..... Firma: .....

▪ **Declaración del médico de que ha informado debidamente al donante.**

Nombre: ..... Firma: .....

---

APARTADO PARA LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, .....reviso el consentimiento de participación en el estudio, arriba firmado, con fecha .....

Fecha de la revocación.....

Firma:

---

Figura 21. Consentimiento informado.

## 9. Bibliografía:

1. Tscherne H. [The treatment of the seriously injured at an emergency station]. *Chir Z Alle Geb Oper Medizen*. junio de 1966;37(6):249-52.
2. Pape HC, Lefering R, Butcher N, Peitzman A, Leenen L, Marzi I, et al. The definition of polytrauma revisited: An international consensus process and proposal of the new «Berlin definition». *J Trauma Acute Care Surg*. 2014;77(5):780-6.
3. Acosta JA, Yang JC, Winchell RJ, Simons RK, Fortlage DA, Hollingsworth-Fridlund P, et al. Lethal injuries and time to death in a level I trauma center. *J Am Coll Surg*. mayo de 1998;186(5):528-33.
4. Demetriades D, Murray J, Charalambides K, Alo K, Velmahos G, Rhee P, et al. Trauma fatalities: time and location of hospital deaths. *J Am Coll Surg*. enero de 2004;198(1):20-6.
5. Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury*. junio de 2005;36(6):691-709.
6. Pfeifer R, Tarkin IS, Rocos B, Pape H-C. Patterns of mortality and causes of death in polytrauma patients--has anything changed? *Injury*. septiembre de 2009;40(9):907-11.
7. El Mestoui Z, Jalalzadeh H, Giannakopoulos GF, Zuidema WP. Incidence and etiology of mortality in polytrauma patients in a Dutch level I trauma center. *Eur J Emerg Med Off J Eur Soc Emerg Med*. febrero de 2017;24(1):49-54.
8. Changes C. Advanced trauma life support (ATLS®). *J Trauma Acute Care Surg*. 2013;74(5):1363-6.
9. Sun L, Akiyama K, Zhang H, Yamaza T, Hou Y, Zhao S, et al. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells Dayt Ohio*. junio de 2009;27(6):1421-32.
10. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet Lond Engl*. 10 de mayo de 2008;371(9624):1579-86.

11. Sánchez-Guijo F, Caballero-Velázquez T, López-Villar O, Redondo A, Parody R, Martínez C, et al. Sequential third-party mesenchymal stromal cell therapy for refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. octubre de 2014;20(10):1580-5.
12. Shapiro N, Howell MD, Bates DW, Angus DC, Ngo L, Talmor D. The Association of Sepsis Syndrome and Organ Dysfunction With Mortality in Emergency Department Patients With Suspected Infection. *Ann Emerg Med*. noviembre de 2006;48(5):583-590.e1.
13. Mote DJD. Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Aspectos fisiopatológicos. :9.
14. Berger MM. Antioxidant Micronutrients in Major Trauma and Burns: Evidence and Practice. *Nutr Clin Pract*. octubre de 2006;21(5):438-49.
15. Crimi E, Sica V, Williams-Ignarro S, Zhang H, Slutsky AS, Ignarro LJ, et al. The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radic Biol Med*. febrero de 2006;40(3):398-406.
16. Biesalski HK, McGregor GP. Antioxidant therapy in critical care—Is the microcirculation the primary target?: *Crit Care Med*. septiembre de 2007;35(Suppl):S577-83.
17. Wacker C, Prkno A, Brunkhorst FM, Schlattmann P. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. mayo de 2013;13(5):426-35.
18. Horeczko T, Green J, Panacek E. Epidemiology of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) in the Emergency Department. *West J Emerg Med*. 5 de mayo de 2014;15(3):329-36.
19. Luzzani A, Polati E, Dorizzi R, Rungatscher A, Pavan R, Merlini A. Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as markers of sepsis: *Crit Care Med*. junio de 2003;31(6):1737-41.
20. Cano VC. Trauma de alta energía y su respuesta inflamatoria sistémica. 2008;4(1):12.
21. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol*. noviembre de 2002;12(11):502-8.

22. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. 1961. *Radiat Res.* agosto de 2012;178(2):AV3-7.
23. Serafini M, Verfaillie C. Pluripotency in Adult Stem Cells: State of the Art. *Semin Reprod Med.* noviembre de 2006;24(5):379-88.
24. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood.* 2001;98:2615-2625. *Blood.* 5 de marzo de 2009;113(10):2370-2370.
25. Reyes M, Verfaillie CM. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci.* junio de 2001;938:231-3; discussion 233-235.
26. Verfaillie CM, Schwartz R, Reyes M, Jiang Y. Unexpected potential of adult stem cells. *Ann N Y Acad Sci.* mayo de 2003;996:231-4.
27. Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells: an update. *Novartis Found Symp.* 2005;265:55-61; discussion 61-65, 92-7.
28. Cogle CR. Adult human hematopoietic cells provide functional hemangioblast activity. *Blood.* 1 de enero de 2004;103(1):133-5.
29. Forrai A, Robb L. The hemangioblast--between blood and vessels. *Cell Cycle Georget Tex.* abril de 2003;2(2):86-90.
30. Jaffredo T, Bollerot K, Sugiyama D, Gautier R, Drevon C. Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. *Int J Dev Biol.* 2005;49(2-3):269-77.
31. Loges S, Fehse B, Brockmann MA, Lamszus K, Butzal M, Guckenbiehl M, et al. Identification of the Adult Human Hemangioblast. *Stem Cells Dev.* junio de 2004;13(3):229-42.
32. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells.* noviembre de 2007;25(11):2739-49.
33. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.* mayo de 2006;20(3):161-71.
34. Conneally E, Cashman J, Petzer A, Eaves C. Expansion in vitro of transplantable

human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lymphomyeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci.* 2 de septiembre de 1997;94(18):9836-41.

35. Holyoake T, Alcorn M. CD34 + positive haemopoietic cells: Biology and clinical applications. *Blood Rev.* junio de 1994;8(2):113-24.

36. Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: Structure, Biology, and Clinical Utility. :14.

37. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone.* septiembre de 1997;21(3):225-35.

38. Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, et al. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* abril de 1998;13(4):655-63.

39. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* agosto de 2000;28(8):875-84.

40. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone.* 1992;13(1):69-80.

41. Kobune M, Kawano Y, Ito Y, Chiba H, Nakamura K, Tsuda H, et al. Telomerized human multipotent mesenchymal cells can differentiate into hematopoietic and cobblestone area-supporting cells. *Exp Hematol.* agosto de 2003;31(8):715-22.

42. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol.* agosto de 2002;30(8):879-86.

43. Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Role of Adult Mesenchymal Stem Cells in Bone Tissue Engineering Applications: Current Status and Future Prospects. *Tissue Eng.* mayo de 2005;11(5-6):787-802.

44. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 2 de abril de 1999;284(5411):143-7.

45. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 4 de abril de 1997;276(5309):71-4.
46. Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang P-H, et al. Isolation of Mouse Marrow Mesenchymal Progenitors by a Novel and Reliable Method. *Stem Cells*. septiembre de 2003;21(5):527-35.
47. Buth J, Raines JK, Kolodny GM, Darling RC. Effect of intraoperative autotransfusion on red cell mass and red cell survival. *Surg Forum*. 1975;26:276-8.
48. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
49. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 15 de noviembre de 2003;102(10):3483-93.
50. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 4 de julio de 2002;418(6893):41-9.
51. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. febrero de 2006;24(2):386-98.
52. Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EJ, Kajkenova O, Lipschitz DA, Manolagas SC, et al. Inhibition of *Osf2/Cbfa1* expression and terminal osteoblast differentiation by *PPARgamma2*. *J Cell Biochem*. 1 de septiembre de 1999;74(3):357-71.
53. Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol*. junio de 2004;4(3):290-4.
54. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg*. julio de 1994;21(3):429-35.
55. Blanco JF, Villarón EM, Pescador D, da Casa C, Gómez V, Redondo AM, et al. Autologous mesenchymal stromal cells embedded in tricalcium phosphate for posterolateral spinal fusion: results of a prospective phase I/II clinical trial with long-term follow-up. *Stem Cell Res Ther*. 22 de febrero de 2019;10(1):63.

56. Pescador D, Ibáñez-Fonseca A, Sánchez-Guijo F, Briñón JG, Arias FJ, Muntión S, et al. Regeneration of hyaline cartilage promoted by xenogeneic mesenchymal stromal cells embedded within elastin-like recombinamer-based bioactive hydrogels. *J Mater Sci Mater Med.* agosto de 2017;28(8):115.
57. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* octubre de 1999;181(1):67-73.
58. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem.* 15 de agosto de 2003;89(6):1235-49.
59. Villaron EM, Almeida J, López-Holgado N, Alcoceba M, Sánchez-Abarca LI, Sanchez-Guijo FM, et al. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* diciembre de 2004;89(12):1421-7.
60. Urbano-Ispizua A. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: stem cell source. *Best Pract Res Clin Haematol.* junio de 2007;20(2):265-80.
61. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.* 15 de octubre de 2001;98(8):2396-402.
62. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy.* 2004;6(6):543-53.
63. in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica.* agosto de 2003;88(8):845-52.
64. Tsai M-S, Lee J-L, Chang Y-J, Hwang S-M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod Oxf Engl.* junio de 2004;19(6):1450-6.
65. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* abril de 2000;109(1):235-42.
66. O'Donoghue K, Choolani M, Chan J, de la Fuente J, Kumar S, Campagnoli C,

et al. Identification of fetal mesenchymal stem cells in maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Mol Hum Reprod.* agosto de 2003;9(8):497-502.

67. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000;2(6):477-88.

68. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GMJS, Claas FHJ, Fibbe WE, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2004;22(7):1338-45.

69. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2004;14(4-6):311-24.

70. Shih DT, Lee D-C, Chen S-C, Tsai R-Y, Huang C-T, Tsai C-C, et al. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells Dayt Ohio.* agosto de 2005;23(7):1012-20.

71. Allen TD, Dexter TM. The essential cells of the hemopoietic microenvironment. *Exp Hematol.* agosto de 1984;12(7):517-21.

72. Dexter TM. Stromal cell associated haemopoiesis. *J Cell Physiol Suppl.* 1982;1:87-94.

73. Sorrell JM, Weiss L. Cell interactions between hematopoietic and stromal cells in the embryonic chick bone marrow. *Anat Rec.* mayo de 1980;197(1):1-19.

74. Weiss L. The haemopoietic microenvironment of bone marrow: an ultrastructural study of the interactions of blood cells, stroma and blood vessels. *Ciba Found Symp.* 1980;71:3-19.

75. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* abril de 1974;17(4):331-40.

76. Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P, et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res.* mayo de 2010;20(5):510-8.



77. Jiang X-X, Zhang Y, Liu B, Zhang S-X, Wu Y, Yu X-D, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 15 de mayo de 2005;105(10):4120-6.
78. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. enero de 2009;15(1):42-9.
79. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. enero de 2006;24(1):74-85.
80. Mougiakakos D, Jitschin R, Johansson CC, Okita R, Kiessling R, Le Blanc K. The impact of inflammatory licensing on heme oxygenase-1-mediated induction of regulatory T cells by human mesenchymal stem cells. *Blood*. 5 de mayo de 2011;117(18):4826-35.
81. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 1 de mayo de 2003;101(9):3722-9.
82. Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Sánchez-Abarca LI, Blanco B, López A, et al. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica*. septiembre de 2008;93(9):1301-9.
83. Hao L, Sun H, Wang J, Wang T, Wang M, Zou Z. Mesenchymal stromal cells for cell therapy: besides supporting hematopoiesis. *Int J Hematol*. enero de 2012;95(1):34-46.
84. Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'huillie A, et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells Dayt Ohio*. agosto de 2009;27(8):1954-62.
85. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 7 de febrero de 2008;2(2):141-50.
86. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*. febrero de 2014;21(2):216-25.
87. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem

cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol.* marzo de 2012;33(3):136-43.

88. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* octubre de 2001;2(10):907-16.

89. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood.* 1 de enero de 2007;109(1):228-34.

90. Chabannes D, Hill M, Merieau E, Rossignol J, Brion R, Souillou JP, et al. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood.* 15 de noviembre de 2007;110(10):3691-4.

91. Raghuvanshi S, Sharma P, Singh S, Van Kaer L, Das G. Mycobacterium tuberculosis evades host immunity by recruiting mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14 de diciembre de 2010;107(50):21653-8.

92. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* diciembre de 1987;84(24):9265-9.

93. Porterfield DM, Laskin JD, Jung SK, Malchow RP, Billack B, Smith PJ, et al. Proteins and lipids define the diffusional field of nitric oxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* octubre de 2001;281(4):L904-912.

94. Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 de marzo de 2010;184(5):2321-8.

95. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood.* 15 de junio de 2004;103(12):4619-21.

96. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood.* 1 de febrero de 2008;111(3):1327-33.

97. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol.* octubre de 2004;4(10):762-74.
98. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 15 de febrero de 2005;105(4):1815-22.
99. Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noël D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PloS One.* 7 de diciembre de 2010;5(12):e14247.
100. Matysiak M, Orłowski W, Fortak-Michalska M, Jurewicz A, Selmaj K. Immunoregulatory function of bone marrow mesenchymal stem cells in EAE depends on their differentiation state and secretion of PGE2. *J Neuroimmunol.* abril de 2011;233(1-2):106-11.
101. Wisniewski HG, Vilcek J. TSG-6: an IL-1/TNF-inducible protein with anti-inflammatory activity. *Cytokine Growth Factor Rev.* junio de 1997;8(2):143-56.
102. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell.* 2 de julio de 2009;5(1):54-63.
103. Choi H, Lee RH, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- $\kappa$ B signaling in resident macrophages. *Blood.* 14 de julio de 2011;118(2):330-8.
104. Rafei M, Campeau PM, Aguilar-Mahecha A, Buchanan M, Williams P, Birman E, et al. Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de mayo de 2009;182(10):5994-6002.
105. Rafei M, Hsieh J, Fortier S, Li M, Yuan S, Birman E, et al. Mesenchymal stromal cell-derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. *Blood.* 15 de diciembre de 2008;112(13):4991-8.
106. Shi C, Jia T, Mendez-Ferrer S, Hohl TM, Serbina NV, Lipuma L, et al. Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity.* 22 de abril de 2011;34(4):590-601.

107. Yang S-H, Park M-J, Yoon I-H, Kim S-Y, Hong S-H, Shin J-Y, et al. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med.* 31 de mayo de 2009;41(5):315-24.
108. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Stem Cells Dayt Ohio.* enero de 2008;26(1):212-22.
109. Sheng H, Wang Y, Jin Y, Zhang Q, Zhang Y, Wang L, et al. A critical role of IFN $\gamma$  in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res.* agosto de 2008;18(8):846-57.
110. Cao W, Yang Y, Wang Z, Liu A, Fang L, Wu F, et al. Leukemia inhibitory factor inhibits T helper 17 cell differentiation and confers treatment effects of neural progenitor cell therapy in autoimmune disease. *Immunity.* 26 de agosto de 2011;35(2):273-84.
111. Djouad F, Charbonnier L-M, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells Dayt Ohio.* agosto de 2007;25(8):2025-32.
112. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 15 de mayo de 2002;99(10):3838-43.
113. Stoorvogel W. Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood.* 19 de enero de 2012;119(3):646-8.
114. Zomer A, Vendrig T, Hopmans ES, van Eijndhoven M, Middeldorp JM, Pegtel DM. Exosomes: Fit to deliver small RNA. *Commun Integr Biol.* septiembre de 2010;3(5):447-50.
115. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* febrero de 2009;19(2):43-51.
116. van Dommelen SM, Vader P, Lakhal S, Kooijmans S a. A, van Solinge WW, Wood MJA, et al. Microvesicles and exosomes: opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 20 de julio de 2012;161(2):635-44.

117. Collino F, Deregibus MC, Bruno S, Sterpone L, Aghemo G, Viltono L, et al. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PloS One*. 27 de julio de 2010;5(7):e11803.
118. Fierabracci A, Del Fattore A, Luciano R, Muraca M, Teti A, Muraca M. Recent advances in mesenchymal stem cell immunomodulation: the role of microvesicles. *Cell Transplant*. 2015;24(2):133-49.
119. Budoni M, Fierabracci A, Luciano R, Petrini S, Di Ciommo V, Muraca M. The immunosuppressive effect of mesenchymal stromal cells on B lymphocytes is mediated by membrane vesicles. *Cell Transplant*. 2013;22(2):369-79.
120. Mokarizadeh A, Delirez N, Morshedi A, Mosayebi G, Farshid A-A, Mardani K. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: potent organelles for induction of tolerogenic signaling. *Immunol Lett*. septiembre de 2012;147(1-2):47-54.
121. Ramírez M, Lucia A, Gómez-Gallego F, Esteve-Lanao J, Pérez-Martínez A, Foster C, et al. Mobilisation of mesenchymal cells into blood in response to skeletal muscle injury. *Br J Sports Med*. agosto de 2006;40(8):719-22.
122. Sorichter S, Puschendorf B, Mair J. Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as markers of muscle fiber injury. *Exerc Immunol Rev*. 1999;5:5-21.
123. McARDLE B. Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown. *Clin Sci*. febrero de 1951;10(1):13-35.
124. Tsujino S, Shanske S, DiMauro S. Molecular genetic heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *N Engl J Med*. 22 de julio de 1993;329(4):241-5.
125. Seebach C, Henrich D, Tewksbury R, Wilhelm K, Marzi I. Number and proliferative capacity of human mesenchymal stem cells are modulated positively in multiple trauma patients and negatively in atrophic nonunions. *Calcif Tissue Int*. abril de 2007;80(4):294-300.
126. Henrich D, Hahn P, Wahl M, Wilhelm K, Dernbach E, Dimmeler S, et al. Serum derived from multiple trauma patients promotes the differentiation of endothelial progenitor cells in vitro: possible role of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor165. *Shock Augusta Ga*. enero de 2004;21(1):13-6.

127. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense J-R, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol.* noviembre de 2005;205(2):228-36.
128. Krumina G, Babarykin D, Krumina Z, Paegle I, Suhorukov O, Vanags D, et al. Effects of systemically transplanted allogeneic bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells on rats' recovery after experimental polytrauma. *J Trauma Acute Care Surg.* marzo de 2013;74(3):785-91.
129. Hengartner N-E, Fiedler J, Schrezenmeier H, Huber-Lang M, Brenner RE. Crucial role of IL1beta and C3a in the in vitro-response of multipotent mesenchymal stromal cells to inflammatory mediators of polytrauma. *PLoS One.* 2015;10(1):e0116772.
130. Rochefort GY, Delorme B, Lopez A, Héroult O, Bonnet P, Charbord P, et al. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells Dayt Ohio.* octubre de 2006;24(10):2202-8.
131. Alm JJ, Koivu HMA, Heino TJ, Hentunen TA, Laitinen S, Aro HT. Circulating plastic adherent mesenchymal stem cells in aged hip fracture patients. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* diciembre de 2010;28(12):1634-42.
132. Lucia A, De La Rosa A, Silván MA, López-Mojares LM, Boraita A, Pérez M, et al. Mobilisation of mesenchymal cells in cardiac patients: is intense exercise necessary? *Br J Sports Med.* marzo de 2009;43(3):221-3.
133. Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg.* enero de 1999;65(1):22-6.
134. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* abril de 2001;7(2):211-28.
135. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* agosto de 2001;44(8):1928-42.
136. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5 de diciembre de 2000;97(25):13625-30.

137. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 1 de junio de 2006;119(Pt 11):2204-13.
138. Hensler T, Heinemann B, Sauerland S, Lefering R, Bouillon B, Andermahr J, et al. Immunologic alterations associated with high blood transfusion volume after multiple injury: effects on plasmatic cytokine and cytokine receptor concentrations. *Shock Augusta Ga.* diciembre de 2003;20(6):497-502.
139. Giannoudis PV, Smith MR, Evans RT, Bellamy MC, Guillou PJ. Serum CRP and IL-6 levels after trauma. Not predictive of septic complications in 31 patients. *Acta Orthop Scand.* abril de 1998;69(2):184-8.
140. Maier B, Lefering R, Lehnert M, Laurer HL, Steudel WI, Neugebauer EA, et al. Early versus late onset of multiple organ failure is associated with differing patterns of plasma cytokine biomarker expression and outcome after severe trauma. *Shock Augusta Ga.* diciembre de 2007;28(6):668-74.
141. Bogner V, Keil L, Kanz K-G, Kirchhoff C, Leidel BA, Mutschler W, et al. Very early posttraumatic serum alterations are significantly associated to initial massive RBC substitution, injury severity, multiple organ failure and adverse clinical outcome in multiple injured patients. *Eur J Med Res.* 22 de julio de 2009;14(7):284-91.
142. Zilow G, Sturm JA, Rother U, Kirschfink M. Complement activation and the prognostic value of C3a in patients at risk of adult respiratory distress syndrome. *Clin Exp Immunol.* febrero de 1990;79(2):151-7.
143. Hecke F, Schmidt U, Kola A, Bautsch W, Klos A, Köhl J. Circulating complement proteins in multiple trauma patients--correlation with injury severity, development of sepsis, and outcome. *Crit Care Med.* diciembre de 1997;25(12):2015-24.
144. Burk A-M, Martin M, Flierl MA, Rittirsch D, Helm M, Lampl L, et al. Early complementopathy after multiple injuries in humans. *Shock Augusta Ga.* abril de 2012;37(4):348-54.
145. Carrero R, Cerrada I, Lledó E, Dopazo J, García-García F, Rubio M-P, et al. IL1 $\beta$  induces mesenchymal stem cells migration and leucocyte chemotaxis through NF- $\kappa$ B. *Stem Cell Rev.* septiembre de 2012;8(3):905-16.
146. Hyvelin J-M, Howell K, Nichol A, Costello CM, Preston RJ, McLoughlin P.

Inhibition of Rho-kinase attenuates hypoxia-induced angiogenesis in the pulmonary circulation. *Circ Res.* 22 de julio de 2005;97(2):185-91.

147. Annabi B, Lee Y-T, Turcotte S, Naud E, Desrosiers RR, Champagne M, et al. Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2003;21(3):337-47.

148. Ben-Yosef Y, Lahat N, Shapiro S, Bitterman H, Miller A. Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circ Res.* 19 de abril de 2002;90(7):784-91.

149. Ottino P, Finley J, Rojo E, Ottlecz A, Lambrou GN, Bazan HEP, et al. Hypoxia activates matrix metalloproteinase expression and the VEGF system in monkey choroid-retinal endothelial cells: Involvement of cytosolic phospholipase A2 activity. *Mol Vis.* 17 de mayo de 2004;10:341-50.

150. Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma.* diciembre de 2005;19(10 Suppl):S4-6.

151. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.* diciembre de 2005;36(12):1392-404.

152. Devine MJ, Mierisch CM, Jang E, Anderson PC, Balian G. Transplanted bone marrow cells localize to fracture callus in a mouse model. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* noviembre de 2002;20(6):1232-9.

153. Shirley D, Marsh D, Jordan G, McQuaid S, Li G. Systemic recruitment of osteoblastic cells in fracture healing. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* septiembre de 2005;23(5):1013-21.

154. Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Ishikawa M, Mifune Y, Iwasaki H, et al. Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing. *Am J Pathol.* octubre de 2006;169(4):1440-57.

155. Kumagai K, Vasanji A, Drazba JA, Butler RS, Muschler GF. Circulating cells with osteogenic potential are physiologically mobilized into the fracture healing site in the parabiotic mice model. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* febrero de 2008;26(2):165-75.

156. Tadokoro M, Kanai R, Taketani T, Uchio Y, Yamaguchi S, Ohgushi H. New bone



formation by allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in a patient with perinatal hypophosphatasia. *J Pediatr.* junio de 2009;154(6):924-30.

157. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone.* diciembre de 2003;33(6):919-26.

158. Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, Goff JP, Adler C, Leboff MS, et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell.* junio de 2008;7(3):335-43.

159. Li D, Wang C, Chi C, Wang Y, Zhao J, Fang J, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Inhibit Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Reactions in Macrophages and Endothelial Cells. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:2631439.

160. Zhou Z, Guo F, Dou Y, Tang J, Huan J. Guanine nucleotide exchange factor-H1 signaling is involved in lipopolysaccharide-induced endothelial barrier dysfunction. *Surgery.* septiembre de 2013;154(3):621-31.

161. Bae J-S, Lee W, Rezaie AR. Polyphosphate elicits pro-inflammatory responses that are counteracted by activated protein C in both cellular and animal models. *J Thromb Haemost JTH.* junio de 2012;10(6):1145-51.

162. Shelton JL, Wang L, Cepinskas G, Sandig M, Inculet R, McCormack DG, et al. Albumin leak across human pulmonary microvascular vs. umbilical vein endothelial cells under septic conditions. *Microvasc Res.* enero de 2006;71(1):40-7.

163. Tianzhu Z, Shumin W. Esculin Inhibits the Inflammation of LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice Via Regulation of TLR/NF- $\kappa$ B Pathways. *Inflammation.* agosto de 2015;38(4):1529-36.

164. Liu Q-S, Cheng Z-W, Xiong J-G, Cheng S, He X-F, Li X-C. Erythropoietin pretreatment exerts anti-inflammatory effects in hepatic ischemia/reperfusion-injured rats via suppression of the TLR2/NF- $\kappa$ B pathway. *Transplant Proc.* marzo de 2015;47(2):283-9.

165. Chen Y, Liu T, Langford P, Hua K, Zhou S, Zhai Y, et al. *Haemophilus parasuis* induces activation of NF- $\kappa$ B and MAP kinase signaling pathways mediated by toll-like receptors. *Mol Immunol.* junio de 2015;65(2):360-6.

166. Gore AV, Bible LE, Song K, Livingston DH, Mohr AM, Sifri ZC. Mesenchymal

stem cells increase T-regulatory cells and improve healing following trauma and hemorrhagic shock. *J Trauma Acute Care Surg.* julio de 2015;79(1):48-52; discussion 52.

167. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* julio de 2008;8(7):523-32.

168. Hannoush EJ, Elhassan I, Sifri ZC, Mohr AA, Alzate WD, Livingston DH. Role of bone marrow and mesenchymal stem cells in healing after traumatic injury. *Surgery.* enero de 2013;153(1):44-51.

169. Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin North Am.* abril de 1995;75(2):257-77.

170. Venet F, Chung C-S, Monneret G, Huang X, Horner B, Garber M, et al. Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leukoc Biol.* marzo de 2008;83(3):523-35.

171. Kavanagh H, Mahon BP. Allogeneic mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation by inducing murine regulatory T cells. *Allergy.* abril de 2011;66(4):523-31.

172. Amann EM, Groß A, Rojewski MT, Kestler HA, Kalbitz M, Brenner RE, et al. Inflammatory response of mesenchymal stromal cells after in vivo exposure with selected trauma-related factors and polytrauma serum. *PloS One.* 2019;14(5):e0216862.

173. Hobisch-Hagen P, Jelkmann W, Mayr A, Wiedermann FJ, Fries D, Herold M, et al. Low platelet count and elevated serum thrombopoietin after severe trauma. *Eur J Haematol.* marzo de 2000;64(3):157-63.

174. Stensballe J, Christiansen M, Tønnesen E, Espersen K, Lippert FK, Rasmussen LS. The early IL-6 and IL-10 response in trauma is correlated with injury severity and mortality. *Acta Anaesthesiol Scand.* abril de 2009;53(4):515-21.

175. Sears BW, Stover MD, Callaci J. Pathoanatomy and clinical correlates of the immunoinflammatory response following orthopaedic trauma. *J Am Acad Orthop Surg.* abril de 2009;17(4):255-65.

176. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet Lond Engl.* 1 de mayo de 2004;363(9419):1439-41.

177. Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 27 de mayo de 2006;81(10):1390-7.
178. Pérez-Simon JA, López-Villar O, Andreu EJ, Rifón J, Muntion S, Díez Campelo M, et al. Mesenchymal stem cells expanded in vitro with human serum for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease: results of a phase I/II clinical trial. *Haematologica*. julio de 2011;96(7):1072-6.
179. Muntión S, Sánchez-Guijo FM, Carrancio S, Villarón E, López O, Díez-Campelo M, et al. Optimisation of mesenchymal stromal cells karyotyping analysis: implications for clinical use. *Transfus Med Oxf Engl*. abril de 2012;22(2):122-7.
180. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hovs J, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant*. junio de 1995;15(6):825-8.
181. Goldberg JD, Giralt S. Assessing response of therapy for acute and chronic graft-versus-host disease. *Expert Rev Hematol*. febrero de 2013;6(1):103-7.
182. Pérez-Ilzarbe M, Díez-Campelo M, Aranda P, Tabera S, Lopez T, del Cañizo C, et al. Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. *Transfusion (Paris)*. septiembre de 2009;49(9):1901-10.
183. Zheng G, Huang L, Tong H, Shu Q, Hu Y, Ge M, et al. Treatment of acute respiratory distress syndrome with allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells: a randomized, placebo-controlled pilot study. *Respir Res*. 4 de abril de 2014;15:39.
184. Qayyum AA, Haack-Sørensen M, Mathiasen AB, Jørgensen E, Ekblond A, Kastrup J. Adipose-derived mesenchymal stromal cells for chronic myocardial ischemia (MyStromalCell Trial): study design. *Regen Med*. mayo de 2012;7(3):421-8.
185. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev*. junio de 2009;18(5):683-92.
186. Weiss DJ, Casaburi R, Flannery R, LeRoux-Williams M, Tashkin DP. A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD. *Chest*. junio de 2013;143(6):1590-8.
187. de la Portilla F, Alba F, García-Olmo D, Herrerías JM, González FX, Galindo A.

Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn's disease: results from a multicenter phase I/IIa clinical trial. *Int J Colorectal Dis.* marzo de 2013;28(3):313-23.

188. Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, Maccario R, Avanzini MA, Ubezio C, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut.* junio de 2011;60(6):788-98.

189. Sun L, Wang D, Liang J, Zhang H, Feng X, Wang H, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* agosto de 2010;62(8):2467-75.

190. Liang J, Zhang H, Hua B, Wang H, Lu L, Shi S, et al. Allogenic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. *Ann Rheum Dis.* agosto de 2010;69(8):1423-9.

191. Wang D, Akiyama K, Zhang H, Yamaza T, Li X, Feng X, et al. Double allogenic mesenchymal stem cells transplantations could not enhance therapeutic effect compared with single transplantation in systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:273291.

192. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehniger G, Bornhäuser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2004;22(3):377-84.

193. Martens TP, See F, Schuster MD, Sondermeijer HP, Hefti MM, Zannettino A, et al. Mesenchymal lineage precursor cells induce vascular network formation in ischemic myocardium. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* marzo de 2006;3 Suppl 1:S18-22.

194. Ishigatsubo Y, Ihata A, Kobayashi H, Hama M, Kirino Y, Ueda A, et al. Therapeutic angiogenesis in patients with systemic sclerosis by autologous transplantation of bone-marrow-derived cells. *Mod Rheumatol.* junio de 2010;20(3):263-72.

195. Nevskaya T, Ananieva L, Bykovskaia S, Eremin I, Karandashov E, Khrennikov J, et al. Autologous progenitor cell implantation as a novel therapeutic intervention for ischaemic digits in systemic sclerosis. *Rheumatol Oxf Engl.* enero de 2009;48(1):61-4.

196. Guiducci S, Porta F, Saccardi R, Guidi S, Ibba-Manneschi L, Manetti M, et al.

Autologous mesenchymal stem cells foster revascularization of ischemic limbs in systemic sclerosis: a case report. *Ann Intern Med.* 16 de noviembre de 2010;153(10):650-4.

197. Peng L, Xie D, Lin B-L, Liu J, Zhu H, Xie C, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes. *Hepatology Baltim Md.* 2 de septiembre de 2011;54(3):820-8.

198. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med.* abril de 2006;12(4):459-65.

199. Smith HS. Activated microglia in nociception. *Pain Physician.* junio de 2010;13(3):295-304.

200. Loane DJ, Byrnes KR. Role of microglia in neurotrauma. *Neurother J Am Soc Exp Neurother.* octubre de 2010;7(4):366-77.

201. Walker PA, Bedi SS, Shah SK, Jimenez F, Xue H, Hamilton JA, et al. Intravenous multipotent adult progenitor cell therapy after traumatic brain injury: modulation of the resident microglia population. *J Neuroinflammation.* 28 de septiembre de 2012;9:228.