

Preservación en frío y rechazo crónico, desarrollo de un modelo de trasplante de extremidad posterior en ratas

Cold preservation and chronic rejection, development of a rat hind limb transplantation model



Bonastre Juliá, J.

Bonastre-Juliá, J.*, Landín-Jarillo, L.*, Casado-Pérez, C.**

Resumen

Los trasplantes de tejidos compuestos son una realidad clínica con más de 150 casos realizados con éxito en los últimos 15 años. La vasculopatía crónica del aloinjerto es una causa de pérdida tardía del órgano observada en 3 trasplantes de tejidos compuestos. Histológicamente se caracteriza por estenosis de la luz vascular causada por hiperplasia de la íntima y fibrosis cicatricial de la adventicia. La vasculopatía está causada por factores inmunitarios y no inmunes, entre los que se encuentra el daño por frío.

Presentamos el desarrollo de un modelo experimental de vasculopatía crónica del aloinjerto en el contexto del trasplante de pata posterior entre ratas tipo Lewis Brown-Norway como donantes y ratas tipo Wistar-Lewis como receptoras, tras 7 horas de isquemia fría a 4°C. Todos los animales recibieron dosis infraterapéuticas de ciclosporina A y fueron sacrificados trascurridos 2 meses desde el trasplante. El análisis histológico permitió identificar los hallazgos característicos de la vasculopatía crónica del aloinjerto en los tercios musculares medio y distal de cada aloinjerto. Encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar el número de vasos patológicos de pequeño y mediano calibre observados por campo de aumento en el tercio medio y el tercio muscular distal ($P = 0,007$ y $0,004$ respectivamente).

El presente estudio establece un modelo experimental reproducible de vasculopatía crónica del aloinjerto en trasplante de tejidos compuestos. Pone en evidencia también la asociación entre la preservación en isquemia fría y la vasculopatía en diferentes segmentos vasculares de aloinjertos de pata posterior en ratas.

Palabras clave Alotrasplante vascularizado compuesto, Rechazo crónico, Isquemia fría.

Nivel de evidencia científica 5

Abstract

Composite tissue allotransplantation has become a clinical reality nowadays, with more than 150 transplants performed in the last 15 years. Chronic allograft vasculopathy has been detected in 3 cases of composite tissue allotransplantation, being responsible of late graft failure. Decreased vascular lumen caused by intimal hyperplasia and constrictive remodeling of the adventitia, are the main histological features of this entity. Immune and not immune factors are related with the development of the vasculopathy, being cold damage between the later.

We present the development of an experimental model of chronic allograft vasculopathy in a model of rat hind limb allotransplantation after 7 hours of cold ischemia at 4°C, between Lewis Brown-Norway rats as donors and Wistar-Lewis rats as receptors. All animals were under low dose immunosuppression with cyclosporine A and were sacrificed 2 months post transplantation. The characteristic changes of chronic vasculopathy were found in the middle muscular and distal thirds at the histological analysis. Statistically differences were found when comparing the number of pathological small and medium size vessels of the middle and distal muscular thirds ($P = 0,007$ and $0,004$ respectively).

The present study establishes a reproducible experimental model of chronic allograft vasculopathy in composite tissue allotransplantation. We have verified the association of cold ischemia preservation and chronic vasculopathy at different vascular segments of the rat hind limb.

Key words Vascularized composite allotransplantation, Chronic rejection, Cold ischemia.

Level of evidence 5

* Especialista en Cirugía Plástica.

** Jefe de Servicio.

Servicio de Cirugía Plástica y Quemados, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España

Introducción

Los trasplantes de tejidos compuestos (TTC) son ya una realidad clínica. En 1998 el Dr. Dubernard y su equipo realizaron el primer trasplante de mano del mundo. Desde la introducción de la ciclosporina (1) se han realizado 14 trasplantes faciales y más de 70 trasplantes de extremidad superior (2, 3). El empleo de terapias inmunosupresoras (IS) similares a las que se utilizan en trasplantes de órganos sólidos ha permitido lograr una supervivencia de alguno de ellos de más de 14 años (4).

En el trasplante de órganos sólidos, los cambios histopatológicos que experimenta el aloinjerto y que pueden provocar una pérdida tardía del órgano trasplantado se denominan vasculopatía fibroproliferativa, vasculopatía crónica del aloinjerto (VCA), disfunción crónica del aloinjerto o rechazo crónico (RC). La mayor parte de los fracasos tardíos presentan una estenosis progresiva de la luz vascular en el aloinjerto, ya sea por un engrosamiento difuso y concéntrico de la íntima, como en la hiperplasia intimal, o por una fibrosis cicatricial de la adventicia, como en la remodelación negativa (5, 6). La estenosis progresiva produce una isquemia en el aloinjerto que conduce a una fibrosis irreversible del parénquima del órgano trasplantado. Estos cambios se asocian al deterioro de la función y a la pérdida final del órgano trasplantado (7). La fibrosis progresiva en el contexto de los TTCs faciales encuentra paralelismos con los cambios degenerativos y evolución de la esclerodermia sistémica (8).

Los factores causantes de la VCA están aún por identificar. Se está estudiando una doble etiología, tanto inmunitaria (9) como no inmune (5, 10). Dentro de las causas de origen inmunitario, los episodios repetidos de rechazo agudo (RA) son un factor importante en la génesis del RC (11-13). Dentro del segundo grupo se encuentran el daño por isquemia reperusión, la hipertensión arterial, la hiperlipidemia y las infecciones (14). Estos factores podrían actuar de manera directa dañando el endotelio vascular, indirectamente modulando la respuesta inmunitaria, o de ambas formas.

La hipotermia reduce la velocidad de las reacciones enzimáticas y el metabolismo celular, disminuyendo los efectos lesivos de la isquemia (15). Recientemente se ha descrito en un modelo experimental de trasplante cardíaco que la preservación en frío puede ser un factor directamente implicado en el desarrollo de la VCA (16). En los TTCs clínicos se utiliza la preservación en frío del

aloinjerto antes de su transferencia al receptor con el objetivo de evitar el daño que la isquemia a temperatura ambiente causa en los tejidos.

Hasta donde conocemos, el efecto que la preservación en frío puede tener sobre los aloinjertos de tejidos compuestos no ha sido evaluado. El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar un modelo reproducible de rechazo crónico para estudiar qué efecto tiene la preservación en frío sobre el desarrollo de la VCA y valorar su aparición en comparación con el trasplante inmediato.

Material y método

Todos los animales empleados en el estudio recibieron un trato digno de acuerdo con la Directiva del Consejo de Europa publicada el 22 de septiembre de 2010 (2010/63/UE). El estudio también contó con la aprobación del Comité Ético de Bienestar Animal del Hospital Universitario La Paz (Madrid, España), concedido el 28 de Abril de 2011.

Protocolo experimental.

Realizamos transferencias de patas traseras entre ratas (*Rattus Norvegicus*) cruzando el complejo mayor de histocompatibilidad (17). Utilizamos 50 ratas Wistar-Lewis (LEW RT11) como receptoras y 25 ratas Lewis Brown-Norway (LBN RT1n) como donantes, de 250-280 g de peso. Los animales se distribuyeron en 2 grupos de experimentación. Un grupo fue sometido a trasplante inmediato a temperatura ambiente tras la extracción del aloinjerto. En el otro grupo, el aloinjerto se sometió a un periodo de isquemia fría a 4°C durante 7 horas antes del trasplante (Tabla I). Los animales se mantuvieron con vida durante un periodo máximo de 2 meses tras la intervención (18, 19).

Realizamos los procedimientos bajo condiciones de asepsia. Durante la intervención los animales se mantuvieron calientes con manta eléctrica. La cirugía se realizó con anestesia inhalatoria, primero con inducción con isoflurano al 5% (Forane®, Abbott) y después con mantenimiento con mascarilla al 2%. El campo quirúrgico se preparó rasurando el pelo de la pata posterior y de la ingle, acondicionando la piel con povidona yodada en solución al 10% (Betadine®), y empleando pomada epitelizante (Oculos®, Novartis) para proteger los ojos del animal. Como suplemento de fluidos inyectamos 7 ml de

Tabla I. Esquema de los grupos de experimentación

	Técnica	N	Recuperación	Análisis
Grupo I	Trasplante inmediato a temperatura ambiente	6	2 meses tras el trasplante	Efecto del frío sobre la vasculopatía crónica
Grupo II	Trasplante tras 7 horas de isquemia fría a 4°C	6		

suelo salino fisiológico (SSF) por vía subcutánea, distribuidos de la siguiente forma: 2 ml antes de iniciar la intervención, 3 ml antes de la reperfusión del aloinjerto y 2 ml al finalizar la cirugía.

Tras la intervención, los animales fueron estabulados en celdas individuales en condiciones de aislamiento en un estante ventilado, con pienso y agua a demanda. La analgesia postoperatoria se realizó administrando tramadol 20 mg/kg/12h subcutáneo durante los primeros 2 días de postoperatorio. También se administró profilaxis antibiótica con enrofloxacin 5-10 mg/kg/24h subcutáneo durante 2 días.

Para reducir el número de animales a emplear extrajimos ambas patas de cada rata donante (20). Para ello, procedimos a anestesiarnos 3 animales simultáneamente en cada intervención: de una rata LBN extraíamos las 2 patas posteriores, sacrificábamos al animal donante y después realizábamos los trasplantes a ambas ratas receptoras. Las anastomosis fueron término-terminales en arteria y vena femorales a nivel inguinal en todas las ratas receptoras. No realizamos neurorrafia, miorrafia ni osteosíntesis de ningún tipo.

Protocolo de inmunosupresión

Todos los animales receptores recibieron terapia IS diaria con ciclosporina A (CsA) a dosis subterapéuticas durante el estudio (Sandimmun® solución inyectable; Novartis). Los primeros 7 días de postoperatorio (DPO); las dosis de inducción fueron de 2 mg/Kg/día; las dosis de

mantenimiento a partir de la primera semana y hasta finalizar los 60 DPO fueron de 1 mg/Kg/día (9, 10, 16).

Técnica quirúrgica en el donante, evolución del modelo experimental

Inicialmente, el aloinjerto incluyó el tercio distal del muslo, la pierna y el pie completos. Aquellos que precisaron un periodo de isquemia fría se perfundieron con 20 ml de SSF a 4°C a través de la arteria femoral. A continuación colocamos el aloinjerto en una bolsa estanca y ésta en un recipiente de agua con hielo a 3-4°C, hasta cumplir 7 horas. Los que no precisaron un tiempo de isquemia fría, fueron trasplantados de manera inmediata al animal receptor. Los resultados a corto plazo (1 o 2 semanas) fueron prometedores, mostrando los aloinjertos crecimiento del pelo que había sido rasurado para la intervención, y sin que los animales mostraran interés por éste (Fig. 1). Sin embargo, el empleo de dosis subterapéuticas de CsA asoció el desarrollo de episodios de RA principalmente en el componente cutáneo. El RA se manifestó como un aumento de la tumefacción de la extremidad trasplantada y con la aparición de lesiones cutáneas asociadas que abarcaron desde la epidermolisis de todo el aloinjerto, a úlceras exudativas focales (Fig. 2). Las ratas comenzaron a mostrar interés por el aloinjerto, con algún episodio de arrancamiento del mismo y canibalismo, por lo que se hizo preciso un cambio del modelo experimental inicial.

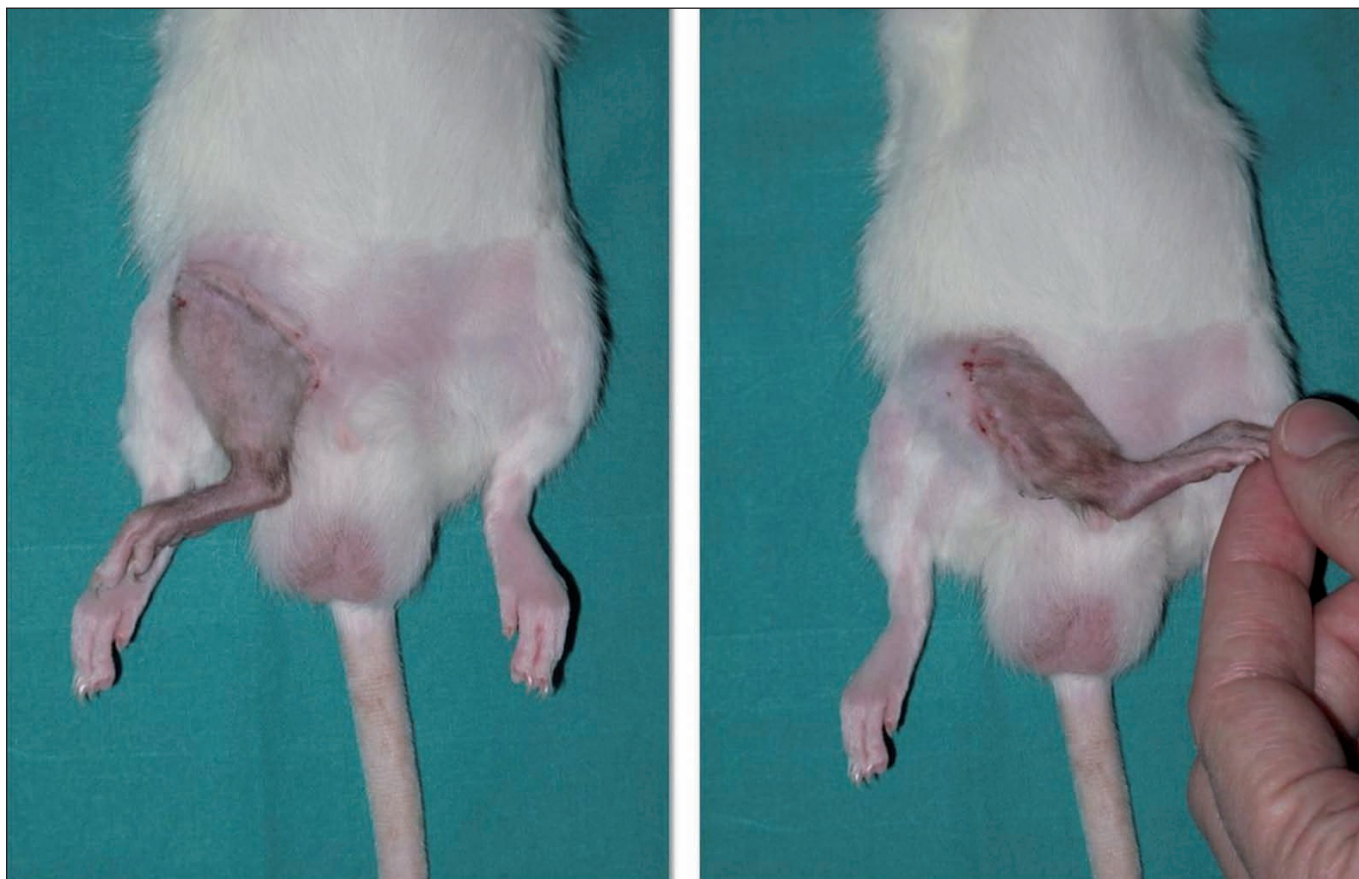


Fig. 1. Postoperatorio del modelo inicial de trasplante a la semana y media. A destacar el crecimiento del pelo en el aloinjerto, así como la ausencia de tumefacción.



Fig. 2. Manifestaciones cutáneas del rechazo agudo. Izquierda: epidermolisis de la totalidad del aloinjerto con pérdida de anejos cutáneos y formación de sinequias entre los dedos de la pata. Derecha: lesiones ulceradas exudativas con importante tumefacción distal de la pata trasplantada.



Fig. 3. Modificación del modelo experimental inicial con isla cutánea en muslo y enterramiento parcial a nivel inguinal. Izquierda: postoperatorio inmediato. Derecha: evolución a las dos semanas del trasplante, con epidermolisis parcial del testigo cutáneo del aloinjerto

Diseñamos un nuevo modelo con modificaciones en el aloinjerto, disminuyendo el componente cutáneo con el objetivo de disminuir así la carga antigénica y comprobar si se lograba mantener una pequeña isla de piel sin signos de RA. Para ello, desepidermizamos la casi totalidad de la pata donante dejando un testigo cutáneo en muslo, y amputamos el aloinjerto a nivel del tobillo para facilitar su enterramiento parcial en ingle. Mantuvimos sin alteraciones las anastomosis vasculares y el protocolo en 2 grupos experimentales. Sin embargo, los resultados fueron los mismos, manifestándose el RA cutáneo y como consecuencia la manipulación del aloinjerto por el animal (Fig. 3).

Finalmente, tras 20 trasplantes realizados durante la evolución del modelo experimental, desarrollamos el modelo definitivo. Eliminamos completamente el componente cutáneo de los aloinjertos de pata de LBN desepidermizándolos en su totalidad, amputamos la pieza a nivel del tobillo y enterramos el aloinjerto por completo en posición heterotópica en ingle (Fig. 4). Con este diseño, y siguiendo el resto del protocolo anteriormente

descrito en cuanto a separación de los animales en 2 grupos de experimentación, realizamos 30 trasplantes más de LBN a LEW para lograr las 12 muestras que se estimaron necesarias para realizar el trabajo (Tabla I).

Protocolo de extracción

Pasados 2 meses de postoperatorio, los animales fueron anestesiados con la misma técnica descrita para la recuperación y posterior análisis de los aloinjertos (Fig. 4). Tras la extracción, sacrificamos al animal receptor con una inyección intracardiaca de 1ml de cloruro potásico, y confirmamos la ausencia de pulso y respiración.

Todas las muestras fueron conservadas por separado en formaldehído al 10% antes de su preparación histológica. Incluimos independientemente en parafina las muestras del tercio medio, del tercio distal y de los vasos femorales. De cada muestra se realizaron 20 ó 30 cortes seriados con el micrótopo. En 4 cortes, a distintas alturas de cada muestra, se realizaron tinciones de orceína nítrica y hematoxilina-eosina (16).

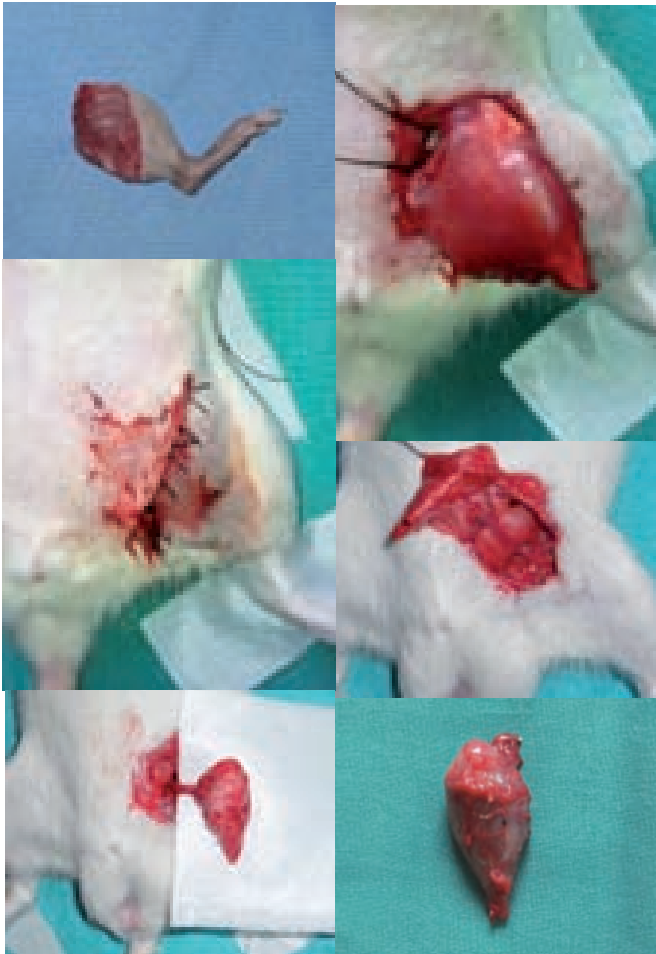


Fig. 4. Superior izquierda: aloinjerto de pata trasera de Lewis Brown-Norway, inmediatamente tras su extracción de la rata donante. Superior derecha: colocación del aloinjerto desepidermizado y amputado a nivel del tobillo, en posición heterotópica a nivel inguinal en la rata Wistar-Lewis. Medio izquierda: cierre directo de la zona receptora tras las anastomosis microquirúrgicas. Medio derecha: detalle del pedículo vascular y de la zona receptora a los 2 meses de la cirugía. Inferior izquierda: aloinjerto de pata trasera de Lewis Brown-Norway tras su extracción de la rata receptora a los 2 meses. Inferior derecha: aloinjerto de pata trasera antes de su procesamiento histológico.

Valoración de la VCA

Estudiamos primero las muestras de tercio medio y distal, así como los vasos femorales con hematoxilina-eosina para identificar la presencia de vasculopatía, y los cambios en la íntima con una tinción habitual (Fig. 5). Dada la afinidad de la orceína nítrica por las fibras elásticas, hicimos la identificación de los vasos patológicos de una manera más sencilla, al quedar perfectamente delimitadas sus láminas elásticas interna y externa. En ambos tercios, y de forma separada, escogimos 5 niveles al azar de manera enmascarada y realizamos la media de vasos sanos y de vasos con vasculopatía en cada tercio. Esta valoración afectó a los vasos de pequeño-mediano calibre ($<120 \mu\text{m}$) y se realizó en 5 campos microscópicos ($\times 200$) al azar en cada nivel muestreado, para valorar la afectación en los distintos niveles (Fig. 6) (9).

Análisis estadístico

Procesamos los datos informáticamente mediante una base de datos en formato Microsoft Excel que más tarde

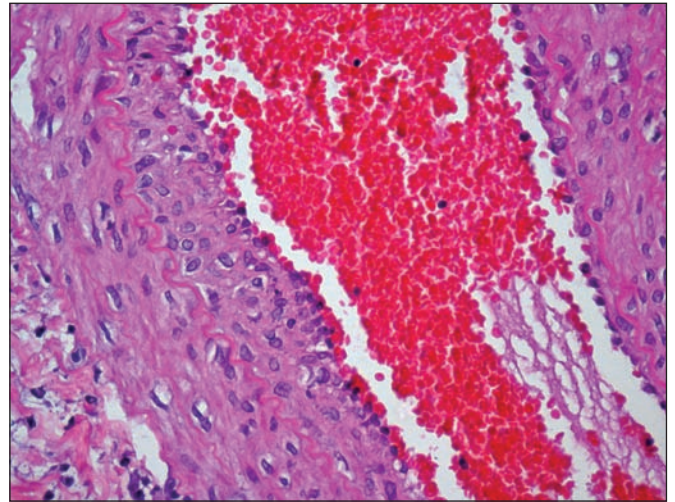


Fig. 5. Detalle de un corte axial ($\times 400$) en un vaso de gran calibre ($>120 \mu\text{m}$). Se identifican las láminas elásticas externa e interna y en la pared izquierda del vaso la hipertrofia de la íntima, que ya no es mono/bicapa como en la pared vascular del lado derecho.

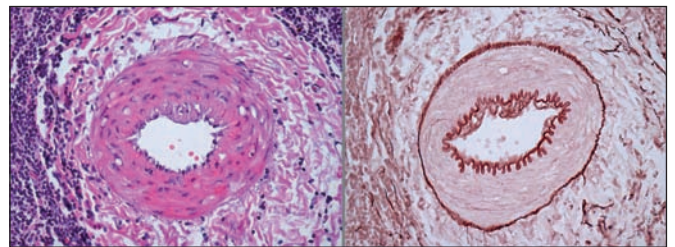


Fig. 6. Detalle de unos cortes transversales ($\times 400$) en un vaso de pequeño-mediano calibre ($<120 \mu\text{m}$). Izquierda: en la tinción con hematoxilina-eosina se identifica la lámina elástica interna y una zona de hipertrofia de la íntima en la zona superior. Derecha: en la tinción con orceína nítrica se identifica con mayor facilidad la lámina elástica interna y la zona con vasculopatía de la íntima.

fue importada para su tratamiento estadístico en el programa SPSS versión 11.5. Consideramos diferencias estadísticamente significativas aquellas que presentaron una probabilidad de error menor del 5% ($P < 0,05$).

Las variables cuantitativas continuas se describieron como media y desviación estándar. Las variables cualitativas se describieron mediante frecuencias absolutas y frecuencias relativas expresadas en porcentaje. El análisis descriptivo de variables cualitativas se representó de forma gráfica como sectores, barras o BoxPlot.

Las comparaciones entre variables cuantitativas continuas se realizaron mediante pruebas no paramétricas utilizando el test de la U de Mann-Whitney. Se realizó un estudio pareado junto con un análisis de tendencia. Para el primero se utilizó el test no-paramétrico de Wilcoxon (o test de los signos) y para el segundo el ANOVA de medidas repetidas, junto con el test de Greenhouse-Geisser.

RESULTADOS

Logramos una supervivencia del 40% de las ratas intervenidas (12 viables de 30 operadas con el modelo experimental definitivo). El tiempo medio de intervención fue de 164 minutos (120-255 minutos). El tiempo medio de microcirugía, entendido desde que se iniciaba la anas-

tomosis venosa hasta que se daba como buenas ambas anastomosis, fue de 106 minutos (60-195 minutos). No encontramos diferencias significativas entre el tiempo de microsutura y la viabilidad de los animales intervenidos ($P = 0,075$). Entre los animales que no superaron la intervención quirúrgica, el 69,2% presentó alguna incidencia mientras que entre los que sí la superaron, sólo el 25% presentó algún tipo de complicación intraoperatoria. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($P = 0,047$). Las incidencias quirúrgicas intraoperatorias no se asociaron ni con el número de orden de intervención ($P = 0,411$) ni con las distintas técnicas de preservación ($P = 0,695$). Respecto a la viabilidad del aloinjerto, ni el distinto método de preservación de los aloinjertos (trasplante inmediato frente a 7 horas de isquemia fría) ni el orden de la intervención quirúrgica (primer o segundo trasplante realizado en el mismo día), presentaron diferencias significativas ($P = 0,695$ y $P = 0,411$ respectivamente). Los animales intervenidos en primer lugar fueron trasplantes inmediatos en un 62,5% de los casos, y los intervenidos en segundo lugar correspondían al grupo de isquemia fría en un 88,9%, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,033$). Se realizó un análisis estratificado para controlar el orden como posible factor de confusión y comprobar si la técnica de preservación afectaba a la viabilidad del modelo quirúrgico y experimental. Los resultados no fueron significativos ni para los animales intervenidos en primer lugar ($P = 0,633$), ni para los intervenidos en segundo lugar ($P = 0,333$).

En el grupo de aloinjertos trasplantados de manera inmediata, observamos la presencia de VCA en los vasos femorales en el 93,33% de los cortes estudiados. En los vasos femorales de los aloinjertos sometido a 7 horas de isquemia fría comprobamos la presencia de VCA en el 100% de los cortes estudiados, siendo las diferencias entre ambos grupos no estadísticamente significativas ($P = 0,699$). En el tercio medio de los aloinjertos trasplantados de manera inmediata encontramos VCA en los vasos de pequeño y mediano calibre en el 6,66% de las muestras valoradas, mientras que en el grupo sometido a isquemia fría, el 66,66% de las muestras presentó signos de VCA, siendo la diferencia significativa ($P = 0,004$). En el tercio distal de los aloinjertos trasplantados sin frío, el 20% de las muestras presentó signos de VCA en los vasos de $<120 \mu\text{m}$, mientras que el grupo sometido a isquemia fría presentó signos de vasculopatía el 76,66% de las muestras de manera significativa ($P = 0,004$).

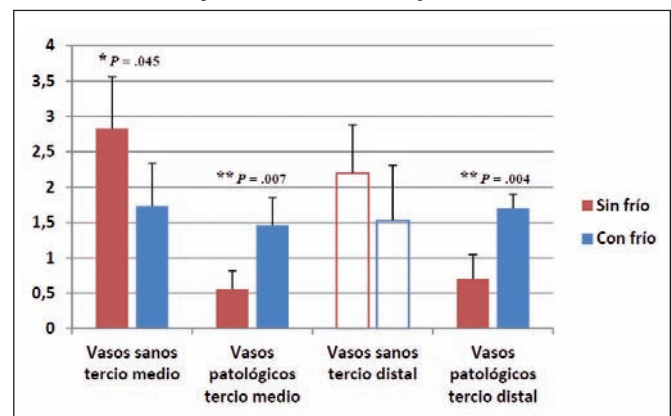
La media del número de vasos sanos observados por campo en el tercio medio de los aloinjertos en el grupo sometido a trasplante inmediato fue de $2,83 (\pm 0,73)$, y de $1,73 (\pm 0,61)$ en los animales sometidos a preservación fría. El número de vasos patológicos detectados por campo en el mismo tercio presentó una media de $0,56 (\pm 0,26)$ para el grupo sin frío, y de $1,46 (\pm 0,39)$ en el grupo con isquemia fría de 7 horas. Las diferencias ob-

servadas entre los dos grupos, tanto en la media de vasos sanos como en la media de vasos con vasculopatía, fue estadísticamente significativa ($P = 0,045$ y $P = 0,007$ respectivamente). Para el tercio distal, la media del número de vasos sanos en el grupo sin frío fue de $2,20 (\pm 0,68)$, y de $1,53 (\pm 0,78)$ en los trasplantes realizados con isquemia fría. Los vasos patológicos observados presentaron una media de $0,70 (\pm 0,35)$ en el grupo del trasplante inmediato, y de $1,70 (\pm 0,20)$ en las muestras sometidas al frío. No encontramos diferencias para la media de vasos sanos entre los dos grupos ($P = 0,142$), pero sí hubo diferencias estadísticamente significativas en la media de vasos patológicos entre ambos grupos para el tercio distal ($P = 0,004$) (Gráfica 1). Al comparar la media de vasos sanos y patológicos observados entre el tercio proximal y el tercio distal dentro del grupo de los aloinjertos sometidos a trasplante inmediato, no encontramos diferencias significativas entre los distintos tercios ($P = 0,683$ y $P = 0,197$ respectivamente). Al realizar la misma comparación en el grupo sometido a las 7 horas de preservación fría, tampoco encontramos diferencias significativas entre el tercio proximal y el distal, ni para la media de vasos sanos ($P = 0,115$), ni para la media de vasos con vasculopatía ($P = 0,257$).

Discusión

A pesar del número de rechazos agudos observados en los TTCs, hasta 2009 no se había visto ni un solo caso de VCA. En 1 paciente intervenido en 2008 por trasplante unilateral de mano, se identificó en los vasos del aloinjerto una vasculopatía con hiperplasia de la íntima que condujo a un rechazo que requirió finalmente amputación (21). En modelos experimentales se ha demostrado que la VCA afecta también a los TTCs. En un modelo de trasplante de extremidad posterior en rata a dosis infraterapéuticas de IS se provocó el RC al presentar el animal episodios de RA repetitivos. Las dosis infraterapéuticas de IS evitan el desarrollo de episodios de RA severo, pero permiten que se desarrolle la VCA (9, 10).

Gráfica 1.
Representación de las medias del número de vasos sanos y patológicos observados en los tercios medios y distales de los aloinjertos.



El presente trabajo muestra un modelo reproducible de trasplante de pata posterior en rata en posición heterotópica a nivel inguinal tras 7 horas de isquemia fría. Este modelo logra provocar la VCA en los animales de experimentación y permite el estudio del frío como factor inductor de la VCA en los tejidos del TTC.

El modelo experimental que presentamos es un modelo microquirúrgico de ejecución difícil con una mortalidad que alcanza el 60% de incidencia. Esto obliga a un refinamiento en la técnica y a una hemostasia rigurosa para lograr que los animales de experimentación sobrevivan, ya que los cambios de volemia son importantes. Una rata de aproximadamente 250-280 mg de peso tiene un volumen sanguíneo aproximado de 50-70 ml/Kg, lo cual supone una volemia estimada de 12,5-19,6 ml aproximadamente. Teniendo en cuenta que se trasplanta un tejido adicional de gran tamaño que se ha de perfundir con la misma volemia, y las pérdidas hemáticas durante la intervención, se justifica la elevada mortalidad postoperatoria de los animales trasplantados. En la fase de desarrollo del modelo experimental probamos distintos modelos de reposición de la volemia, incluyendo transfusiones por vía canalizada en la arteria de la cola de la rata, aunque finalmente obtuvimos los mejores resultados con la pauta de reposición definitiva, 7ml de SSF distribuidos a lo largo de la intervención (2 ml antes de la cirugía, 3 ml antes de reperfundir el aloinjerto y 2 ml al finalizar la cirugía).

El hecho de realizar 2 trasplantes seguidos, con un total de 4 anastomosis microquirúrgicas, y la necesidad de supervivencia posterior de los animales, es otro rasgo técnico a tener en cuenta. La realización de 2 trasplantes seguidos con un mismo animal como donante de ambos aloinjertos responde a varios aspectos. El primero y esencial es disminuir el número de animales de experimentación emplear, ya que en EE.UU. se emplean anualmente entre 17 y 23 millones de animales de laboratorio (22). El 95% de los mismos son ratas y ratones, que son pequeños, relativamente baratos, fáciles de estabular y alimentar y tienen una vida media corta (de 2 a 3 años). Sólo en el año 2000, en EE.UU. se emplearon más de 69.516 perros y 25.560 gatos de experimentación (23). Obviamente, disminuir el número de animales de experimentación también disminuye la necesidad de espacio para estabularlos y el coste global del trabajo. En segundo lugar, también disminuimos la variabilidad inmunológica entre los trasplantes, aumentando así la homogeneidad intergrupala (20). A pesar de que de manera estadísticamente significativa ($P = 0,033$) los animales intervenidos en primer lugar se asignaron principalmente al grupo de trasplante inmediato (62,5%), y los operados en segundo lugar fueron en su mayoría (88,9%) sometidos al trasplante tras las 7 horas de isquemia fría, no asociamos el número de orden de intervención con la presencia de un mayor número de incidencias intraoperatorias ni afectó a la viabilidad del modelo experimental ($P = 0,411$

en ambos casos). De todas formas, llevamos a cabo un análisis posterior estratificado para comprobar que el número de orden no se comportase como un posible factor de confusión respecto a estos parámetros, y los resultados no fueron significativos para ninguna de las dos posiciones. Todo esto nos indica que a pesar de la mayor complejidad del modelo, que requiere la realización de 2 microcirugías en un mismo día, cuando se alcanza el nivel de perfeccionamiento técnico necesario, el realizar 2 trasplantes seguidos no es un factor a tener en cuenta, y por tanto el modelo sigue siendo válido.

Los tiempos medios de intervención (120-255 minutos, con una media de 164 minutos) y de microsutura (60-195 minutos, con una media de 106 minutos) fueron elevados y con una amplia variabilidad. Esto se debe a la necesaria curva de aprendizaje del modelo experimental. A medida que alcanzábamos el perfeccionamiento tanto en el manejo quirúrgico general del animal como en la técnica microquirúrgica, desarrollamos la cirugía con mayor agilidad y disminuyeron los tiempos de intervención. Cabe destacar que identificamos una tendencia entre un menor tiempo de microcirugía, y por tanto de intervención quirúrgica, y una mayor viabilidad del aloinjerto, pero sin llegar a la significación estadística ($P = 0,075$). Este dato está en consonancia con la literatura médica actual en la que un mayor tiempo de intervención microquirúrgica se asocia a una mayor pérdida de fluidos, al establecimiento del vasoespasmo y a la hipotermia por exposición, y por tanto a un peor pronóstico de la cirugía (24).

La preservación del aloinjerto en isquemia fría a 4°C se debe a que ésta es la temperatura estándar de preservación de los aloinjertos cardiacos (0-4°C). Salvando las lógicas diferencias entre los cardiomiocitos y los rhabdomiocitos, el aloinjerto cardiaco es el único TOS que posee un componente muscular mayoritario, al igual que en nuestro modelo experimental, donde el aloinjerto desepidermizado de pata posterior de rata presenta un componente mayoritario de músculo esquelético. De ahí la elección de esa temperatura de conservación. La elección del tiempo de isquemia se basa en estudios previos en TOS y con colgajos alogénicos. Los tiempos de isquemia fría en modelos experimentales de trasplante cardíaco y VCA oscilan entre los 30 minutos y las 10 horas (10, 25, 26). Modelos de trasplante renal que también trabajan con isquemia fría como posible desencadenante de respuestas inmunes, someten el órgano trasplantado a 16 horas de isquemia fría (27). En un trabajo sobre aloinjertos inguinales trasplantados a distintos tiempos de isquemia fría (0, 6, 12, 18 y 24 horas), detectaron que pasadas las 18 horas de preservación en frío se veía comprometida la viabilidad del colgajo fasciocutáneo (28). Realizar el trasplante tras someter al aloinjerto a 10-12 horas de isquemia fría, no es una realidad representativa en nuestro medio, donde los TTC son escasos y muy bien planificados, y por tanto nunca se dan estos tiempos de is-

quemia fría tan largos. Elegimos por tanto las 7 horas como un valor necesariamente alto para favorecer el desarrollo de la VCA, pero no dentro de valores irreales, y que diese tiempo a la realización de los 2 trasplantes simultáneos de la misma rata donante por los motivos anteriormente descritos. La preservación del aloinjerto en isquemia fría durante 7 horas no afectó al éxito o fracaso de la intervención quirúrgica, tanto evaluando el frío como un factor independiente ($P = 0,695$), como cuando se realizó un análisis estratificado para intentar controlar posibles factores de confusión ($P = 0,333$). Esto se corresponde con los conocimientos actuales sobre los marcadores de isquemia y sus tiempos de isquemia (29-31). En nuestro modelo experimental, el único factor asociado significativamente ($P = 0,047$) al éxito de la intervención quirúrgica fue la presencia de incidencias durante la cirugía que se asoció a una mayor mortalidad de los animales (69,2%). La presencia de incidencias intraoperatorias tampoco se asoció al grupo sometido al trasplante tras isquemia fría ($P = 0,695$), donde los aloinjertos presentaban un manejo más complicado debido a los cambios tisulares (edema, tumefacción, etc) que necesariamente aparecen tras el periodo de isquemia a 4°C.

El principal objetivo de este estudio era demostrar que la preservación en frío puede ser un factor agravante en el desarrollo de la VCA a largo plazo. La presencia de signos de RC tanto en el 93,33% de las femorales de los aloinjertos trasplantados de manera inmediata, como en el 100% de las femorales del grupo de isquemia fría, está en relación al modelo experimental empleado. Estudios previos han demostrado la importancia del RA como factor desencadenante de la VCA (12, 13). Nuestro modelo experimental se basa en la presencia de episodios de RA leve-moderados para poder alcanzar un desarrollo temprano del RC (9), estando ambos grupos sometidos a un potente inductor de la VCA. Sin embargo, en las muestras de tejido muscular, la presencia de la VCA se hace más difusa en los vasos de pequeño y mediano calibre (<120 μm), y pese a estar presente en ambos grupos (sin frío y con frío), existe una mayor afectación en el grupo sometido a las 7 horas de isquemia a 4°C, tanto en el tercio medio (6,66% frente a 66,66%, $P = 0,004$) como en el tercio distal (20% frente a 76,66%, $P = 0,004$). Este dato sugiere que el calibre de los vasos, y por tanto sus características histológicas, puede afectar al impacto de los diversos factores relacionados con el RC, tanto inmunológicos como no inmunológicos (5).

Detectamos un mayor número de vasos patológicos en el grupo de preservación en frío en ambos tercios musculares, medio y distal (1,46 y 1,70 respectivamente), frente al grupo de trasplante inmediato (0,56 y 0,70), y en ambos casos los resultados fueron significativos ($P = 0,007$ y $P = 0,004$ respectivamente). El mayor número de vasos sanos sólo fue significativo en el tercio medio para el grupo de trasplante inmediato (2,83; $P = 0,045$), pero no en el tercio distal (Fig. 1). Estos datos

se engloban dentro de la línea de la hipótesis del estudio, donde hay una relación frío-dependiente en cuanto a la mayor presencia de la VCA en los aloinjertos, encontrando más vasos con hiperplasia intimal en el grupo sometido a las 7 horas de isquemia fría y más vasos sanos en el grupo del trasplante inmediato, aunque esto último sólo fue demostrable en el tercio medio. No pudimos demostrar valorando el número de vasos afectados la relación de incremento de intensidad de la vasculopatía con la progresión distal, ni para el tercio medio ($P = 0,197$) ni para el tercio distal ($P = 0,257$). Estos datos también apoyan la teoría de que la VCA se distribuye a lo largo de todo el árbol vascular del aloinjerto.

Creemos necesarios más estudios, para aclarar si la distribución de la hiperplasia intimal en el aloinjerto se produce de manera continua a lo largo de todo el eje vascular, o si por el contrario, la estenosis vascular se distribuye de manera parcheada.

Aunque se ha descrito recientemente la presencia de vasculopatía en las arterias radial y cubital de un aloinjerto de mano amputado tras un episodio de rechazo, muchos de los cambios histopatológicos en el resto de tejidos siguen siendo una incógnita, ya que la mayoría de datos de los TTCs se refieren a biopsias cutáneas (4). Nuestro modelo experimental impide la valoración a nivel cutáneo, ya que los episodios repetidos de RA provocaban ulceraciones cutáneas que obligaron a modificar el modelo experimental en 2 ocasiones debido a los problemas éticos que representaba mantener a los animales vivos con úlceras crónicas durante 2 meses.

Este estudio presenta unas limitaciones que hay que tener en cuenta. La limitación en el número de animales impidió detectar con suficiente potencia algunas diferencias que, con un mayor tamaño muestral, puede que alcanzasen significación estadística. Para acelerar la expresión de la VCA optamos por un modelo a dosis infraterapéuticas de IS, lo cual no se corresponde con la realidad de un TTC en la práctica clínica habitual. Serían necesarios más estudios que valorasen la intensidad y extensión de la vasculopatía a niveles terapéuticos de IS, pero dada la baja incidencia (2,98%) observada en los TTCs clínicos (2 casos de 67 TTCs) (2) harían necesaria una población experimental mucho mayor.

Conclusiones

El modelo experimental de vasculopatía crónica en el trasplante de pata en rata a dosis infraterapéuticas de inmunosupresión es un modelo viable a pesar de su complejidad y de la alta mortalidad del diseño. Con este estudio demostramos la asociación entre la preservación en isquemia fría de los aloinjertos de tejidos compuestos y la vasculopatía crónica. No hemos podido relacionar de manera significativa la extensión y progresión distal de las lesiones con el frío.

Declaración

Este trabajo se pudo desarrollar gracias a la “Convocatoria IdiPaz/FIBHULP de ayudas a grupos de investigación emergentes” del año 2011.

Agradecimientos

Al personal del Servicio de Cirugía Experimental por su ayuda en la realización de este trabajo. A la Dra. Carlota Largo Aramburu en la anestesia y cuidado de los animales y a la Dra. Mayte Vallejo en el procesado de las muestras.

Dirección del autor

Dr. Jorge Bonastre Juliá.
Servicio de Cirugía Plástica y Quemados
Hospital Universitario La Paz
Pº de la Castellana 261
28046 Madrid. España.
correo electrónico: drbonastre@hotmail.com

Bibliografía

- Dubernard JM, Owen E, Herzberg G, Lanzetta M, Martin X, Kapila H, et al.: Human hand allograft: report on first 6 months. *Lancet*. 1999;353(9161):1315-1320. Epub 1999/04/28.
- Petruzzo P, Lanzetta M, Dubernard JM, Landin L, Cavadas P, Margreiter R, et al.: The International Registry on Hand and Composite Tissue Transplantation. *Transplantation*. 2010. Epub 2010/11/06.
- Morelon E, Kanitakis J, Petruzzo P.: Immunological issues in clinical composite tissue allotransplantation: where do we stand today? *Transplantation*. 2012;93(9):855-859. Epub 2012/04/28.
- Kaufman CL, Blair B, Murphy E, Breidenbach WB.: A new option for amputees: transplantation of the hand. *J Rehabil Res Dev*. 2009; 46 (3): 395-404. Epub 2009/08/14.
- Libby P, Pober JS.: Chronic rejection. *Immunity*. 2001;14 (4):387-97. Epub 2001/05/05.
- Diefenbeck M, Nerlich A, Schneeberger S, Wagner F, Hofmann GO.: Allograft vasculopathy after allogeneic vascularized knee transplantation. *Transpl Int*. 2011;24(1):e1-5. Epub 2010/10/21.
- Mathew JM, Ruiz P.: Immunopathology of Organ Transplantation. In: Ruiz P, editor. *Transplantation Pathology*. 1st ed. New York: Cambridge University Press; 2009. Pp. 1-25.
- Sivakumar B, Haloob N, Puri A, Latif A, Ghani S, Brough V, et al.: Systemic sclerosis as a model of chronic rejection in facial composite tissue transplantation. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010;63 (10):1669-1676. Epub 2009/09/22.
- Unadkat JV, Schneeberger S, Horibe EH, Goldbach C, Solari MG, Washington KM, et al.: Composite tissue vasculopathy and degeneration following multiple episodes of acute rejection in reconstructive transplantation. *Am J Transplant*. 2010;10 (2):251-61. Epub 2010/01/01.
- Wang CY, Aronson I, Takuma S, Homma S, Naka Y, Alshafie T, et al.: cAMP pulse during preservation inhibits the late development of cardiac isograft and allograft vasculopathy. *Circ Res*. 2000;86 (9):982-988. Epub 2000/05/16.
- Kouwenhoven EA, JN IJ, de Bruin RW.: Etiology and pathophysiology of chronic transplant dysfunction. *Transpl Int*. 2000;13 (6):385-401. Epub 2001/01/05.
- Lindholm A, Ohlman S, Albrechtsen D, Tufveson G, Persson H, Persson NH.: The impact of acute rejection episodes on long-term graft function and outcome in 1347 primary renal transplants treated by 3 cyclosporine regimens. *Transplantation*. 1993;56 (2):307-315. Epub 1993/08/01.
- Basadonna GP, Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Dunn DL, Sutherland DE, et al.: Early versus late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection. *Transplantation*. 1993;55 (5):993-995. Epub 1993/05/01.
- Akioka K, Takahara S, Ichikawa S, Yoshimura N, Akiyama T, Ohshima S.: Factors predicting long-term graft survival after kidney transplantation: multicenter study in Japan. *World J Surg*. 2005;29(2):249-256. Epub 2005/01/18.
- Mendler N.: The meta-physiology of organ preservation. *J Heart Lung Transplant*. 1992;11(4 Pt 2):S192-195. Epub 1992/07/01.
- Syrjala SO, Keranen MA, Tuuminen R, Nykanen AI, Tammi M, Krebs R, et al.: Increased Th17 rather than Th1 alloimmune response is associated with cardiac allograft vasculopathy after hypothermic preservation in the rat. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29(9):1047-1057. Epub 2010/07/02.
- Doi K.: Homotransplantation of limbs in rats. A preliminary report on an experimental study with nonspecific immunosuppressive drugs. *Plast Reconstr Surg*. 1979; 64(5): 613-621. Epub 1979/11/01.
- Siemionow M, Kulaheci Y.: Experimental models of composite tissue allograft transplants. *Semin Plast Surg*. 2007;21(4):205-212. Epub 2007/11/01.
- Hautz T, Zelger B, Grahmmer J, Krapf C, Amberger A, Brandacher G, et al.: Molecular markers and targeted therapy of skin rejection in composite tissue allotransplantation. *Am J Transplant*. 2010;10(5):1200-1209. Epub 2010/04/01.
- Ozmen S, Ulusal AE, Siemionow M.: Proposal to reduce the number of animals used in transplantation research. *Plast Reconstr Surg*. 2003;112(5):1488-1489. Epub 2003/09/25.
- Kaufman C.L., Ouseph R., Blair B., et al.: Graft vasculopathy in clinical hand transplantation. *Am. J. Transplant*. 2012; 12(4): 1004-1016. Epub 2012/02/14.
- Alternatives to Animal Use in Research, Testing, and Education. US Congress Office of Technology Assessment 1986.
- Animal Care Report. US Department of Agriculture. 2000.
- Wei FC, Mardini, S.: Avoiding complications. Flaps and reconstructive surgery. China: W. B. Saunders; 2009. Pp. 117-124.
- Schneeberger S, Amberger A, Mandl J, Hautz T, Renz O, Obrist P, et al.: Cold ischemia contributes to the development of chronic rejection and mitochondrial injury after cardiac transplantation. *Transpl Int*. 2010; 23(12): 1282-1292. Epub 2010/06/22.

26. **Tanaka M, Mokhtari GK, Terry RD, Gunawan F, Balsam LB, Hoyt G, et al.:** Prolonged cold ischemia in rat cardiac allografts promotes ischemia-reperfusion injury and the development of graft coronary artery disease in a linear fashion. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24(11):1906-1914. Epub 2005/11/22.
27. **Solini S, Aiello S, Cassis P, Scudeletti P, Azzollini N, Mister M, et al.:** Prolonged cold ischemia accelerates cellular and humoral chronic rejection in a rat model of kidney allotransplantation. *Transpl Int.* 2012;25(3):347-356. Epub 2012/01/14.
28. **Xiao B, Xia W, Zhang J, Liu B, Guo S.:** Prolonged cold ischemic time results in increased acute rejection in a rat allotransplantation model. *J Surg Res.* 2010;164(2):e299-304. Epub 2010/10/12.
29. **Medling BD, Bueno RA, Jr., Russell RC, Neumeister MW.:** Replantation outcomes. *Clin Plast Surg.* 2007; 34(2): 177-185. Epub 2007/04/10.
30. **Sabapathy SR, Venkatramani H, Bharathi RR, Bhardwaj P.:** Replantation surgery. *J Hand Surg Am.* 2011;36(6):1104-1110. Epub 2011/06/04.
31. **Tantry TP, Kadam D, Shenoy SP, Bhandary S, Adappa KK.:** Perioperative evaluation and outcomes of major limb replantations with ischemia periods of more than 6 hours. *J Reconstr Microsurg.* 2013;29(3):165-172. Epub 2013/01/29