

Valoración de la lesión de isquemia-reperfusión y del rechazo agudo precoz en el trasplante pulmonar experimental con tiempo de isquemia prolongado

Norberto Santana Rodríguez^{a,b}, José Luis Martín Barrasa^b, Miguel Ángel Ponce González^c, Ana López García^d, José Antonio Ruiz Caballero^e, Antonio Torres García^f y Jorge Freixinet Gilart^a

^aUnidad de Cirugía Torácica. Hospital Universitario de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas. España.

^bUnidad de Cirugía Experimental y Unidad de Investigación. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas. España.

^cUnidad de Hospitalización Domiciliaria. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas. España.

^dServicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro. Madrid. España.

^eDepartamento de Ciencias Clínicas. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas. España.

^fUnidad de Cirugía Torácica y Trasplante Pulmonar de Donante en Asistolia. Hospital Clínico San Carlos. Madrid. España.

OBJETIVO: Valorar la lesión de isquemia-reperfusión y el rechazo agudo precoz del pulmón sometido a un tiempo de isquemia de 10 h.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se han utilizado 30 ratas Sprague-Dawley, en 15 de las cuales se realizó un trasplante pulmonar izquierdo con tiempos de isquemia de 4 h (n = 5), 6 h (n = 5) y 10 h (n = 5). Del donante se extrajo el bloque cardiopulmonar, se disecó el pulmón izquierdo y se efectuó el implante con la técnica de manguitos (*cuffs*). A las 48 h se extrajo el bloque cardiopulmonar. Se valoraron la evolución postoperatoria, la lesión de isquemia-reperfusión y el rechazo agudo del χ^2 pulmón trasplantado y del contralateral. El análisis estadístico se realizó con el test de la χ^2 y el test exacto de Fisher para el cálculo de probabilidades.

RESULTADOS: Los animales trasplantados con un tiempo de isquemia de 10 h no tuvieron peor evolución clínica (p = 0,711). No se observaron diferencias significativas entre los parámetros histológicos de lesión de isquemia-reperfusión y de rechazo agudo con los distintos tiempos de isquemia, ni en la evolución clínica por la presencia y gravedad de éstos. Tampoco se observó que el rechazo agudo se relacionara con la lesión de isquemia-reperfusión (p > 0,05).

CONCLUSIONES: En nuestro estudio, el tiempo de isquemia pulmonar prolongado de 10 h no se asocia ni a lesiones de isquemia-reperfusión y rechazo agudo más graves ni a una peor evolución clínica. El rechazo agudo no se relaciona con la presencia ni con la gravedad de la lesión de isquemia-reperfusión.

Palabras clave: Trasplante pulmonar. Tiempo de isquemia. Cirugía experimental.

Assessment of Ischemia–Reperfusion Injury and Early Acute Rejection in Experimental Lung Transplantation After Prolonged Ischemia

OBJECTIVE: To assess ischemia–reperfusion injury and early acute rejection of the lung subjected to ischemia for 10 hours.

MATERIAL AND METHODS: Fifteen of 30 Sprague–Dawley rats underwent transplantation of a left lung that had been subjected to ischemic times of 4 (n=5), 6 (n=5), or 10 hours (n=5). The cardiopulmonary block was removed from the donor, the left lung was dissected, and the transplant was carried out using the cuff technique. The cardiopulmonary block was extracted after 48 hours. We assessed postoperative progress, ischemia–reperfusion injury and acute rejection of the transplanted and contralateral lungs. Statistical probabilities were analyzed using the χ^2 and Fisher exact tests.

RESULTS: Clinical course was not worse after an ischemic time of 10 hours (P=.711). No significant differences were observed in histological markers of ischemia–reperfusion injury and acute rejection or in clinical course in relation to the different ischemic times; nor was clinical course related to the presence or severity of lesions or rejection. Similarly, acute rejection was unrelated to ischemia–reperfusion injury (P>.05).

CONCLUSIONS: In this study, a prolonged ischemic time of 10 hours was not associated with ischemia–reperfusion injuries, with more severe acute rejection, or with a worse clinical course. Acute rejection was also unrelated to the presence or severity of ischemia–reperfusion injury.

Key words: Lung transplantation. Ischemic time. Experimental surgery.

Este proyecto se ha llevado a cabo gracias a la financiación del Fondo de Investigación Sanitaria Español (FIS), de la Fundación Canaria de Investigación y Salud (FUNCIS, proyecto 1.104), del Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC) y de la fundación MMA de Madrid.

Correspondencia: Dr. N. Santana Rodríguez.
 Unidad de Cirugía Torácica. Unidad de Investigación.
 Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.
 Barranco de la Ballena, s/n. 35010 Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas. España.
 Correo electrónico: norbesr@terra.es

Recibido: 24-4-2006; aceptado para su publicación: 26-9-2006.

Introducción

En la actualidad se desconoce en la práctica clínica cuál es el tiempo de isquemia máximo del injerto pulmonar y, aunque se acepta que está entre las 6 y 8 h¹, no es de extrañar que tolere tiempos de isquemia superiores². Mientras que para algunos autores la isquemia superior a las 5 h determina una peor supervivencia de los pacientes trasplantados², para otros los tiempos de is-

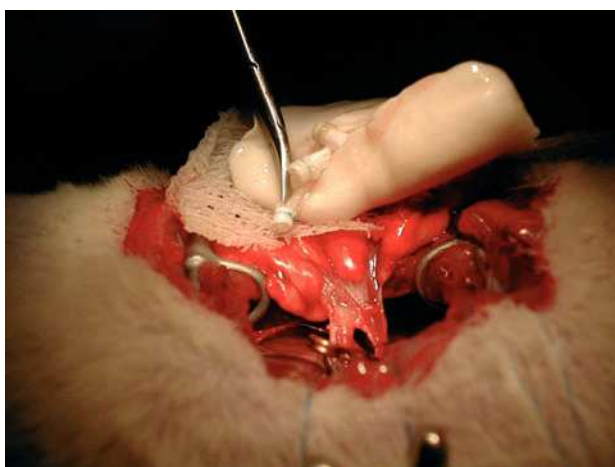


Fig. 1. Anastomosis con manguitos y fijación con ligaduras de 6/0.

quemia de hasta 6 h no influyen de forma significativa en la supervivencia. Algunos autores constataron que era posible una buena preservación durante 4 h y que un mayor tiempo de isquemia (hasta 6 h) determinaba una respuesta del implante aceptable pero peor³. Los tiempos de isquemia superiores (8 h) se han relacionado con una peor función pulmonar en el período postoperatorio inmediato⁴.

Estos hallazgos, sin embargo, no han tenido un re-ferendo unánime, y autores como Novick et al⁵ han relacionado la supervivencia tras el trasplante pulmonar (TP) con otros parámetros como la edad del donante. Estos autores comprobaron que la mortalidad precoz después del trasplante estaba relacionada con la conjunción de la edad del donante y el tiempo de isquemia mayor de 6 h. Por otro lado, Glanville et al⁶ comprobaron, al comparar 20 trasplantes unipulmonares de donante único (pulmones compartidos), en los que el tiempo de isquemia fue significativamente menor en el primer pulmón implantado –media \pm desviación estándar de 164 ± 53 min– que en el segundo (377 ± 53 min), que éste no condicionó el tiempo de intubación, el intercambio gaseoso precoz, la estancia hospitalaria ni la supervivencia a un año. Sin embargo, encontraron un mayor número de episodios de rechazo agudo (RA) en los primeros 3 meses en el grupo con menor tiempo de isquemia, así como un mayor número de infecciones.

Dada la falta de acuerdo entre los autores que han estudiado el tiempo de isquemia del pulmón donante y su relación con complicaciones como la lesión de isquemia-reperfusión (LIR) y RA, es difícil tener una visión clara del problema. En los grupos trasplantadores, no obstante, continúa existiendo la lucha contra el tiempo. Este trabajo pretende dar alguna respuesta a la implicación del tiempo de isquemia en los fenómenos de LIR y RA.

Material y métodos

Se han utilizado 30 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, 15 donantes y 15 receptores, con pesos entre 300 y 400 g. Las condiciones de humedad, temperatura, luz y ventilación fueron constantes y controladas en todo momento en el biote-

rio. Los animales se dividieron aleatoriamente en 3 grupos en función del tiempo de isquemia del injerto: grupo 1, con tiempo de isquemia de 4 h; grupo 2, con tiempo de isquemia de 6 h, y grupo 3, con tiempo de isquemia de 10 h. Cada grupo estuvo constituido por 5 animales donantes y 5 receptores.

Se realizaron 15 TP izquierdos con la técnica del manguito (*cuffs*)⁷, 5 TP por grupo. Todos los experimentos, manipulaciones e intervenciones quirúrgicas se llevaron a cabo de acuerdo con la guía para el manejo y cuidados del animal de experimentación (Real Decreto 223/1988) y la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio del Consejo Nacional de Investigación de EE.UU., 1996.

Extracción del pulmón donante

Se anestesió al animal donante con tiopental sódico (60 mg/kg) intraperitoneal. Se realizó una traqueostomía y se ventiló al animal con un volumen corriente de 1 ml/100 g. A través de laparotomía media se inyectaron 100 U/100 g de heparina sódica en la vena cava inferior y a continuación se realizó una esternotomía media. Tras extirpar el timo se seccionaron la aorta abdominal, la vena cava inferior torácica y ambas aurículas. En ese momento se produjo la parada cardiorrespiratoria del animal donante y se inició el tiempo de isquemia. A través de la arteria pulmonar se perfundieron los pulmones con suero fisiológico a 4 °C. Como último paso de esta fase se ligó y seccionó la tráquea con el pulmón en semiinsuflación y se extrajo el bloque cardiopulmonar. En éste se disecaron la arteria, la vena y el bronquio izquierdo con sección distal al hilio de éstos. A continuación se colocaron los manguitos y catéteres de venopunción (Abbocath®, Sligo, República de Irlanda) cortados en cilindros de 3 mm con una base y una lengüeta posterior de 1,5 mm. Se mantuvo el pulmón a 4 °C en suero fisiológico frío hasta el momento del implante.

Implante en el receptor

Se anestesió al receptor con medetomidina (0,25 mg/kg) subcutánea, ketamina (50 mg/kg) intraperitoneal y atropina (0,7 mg/kg) intramuscular. Mediante intubación orotraqueal se ventiló al animal con el mismo volumen corriente que en la extracción. A través de una toracotomía posterolateral izquierda se disecó el hilio pulmonar y se identificaron la arteria, el bronquio y las venas pulmonares. Se colocaron ligaduras y pinzas microvasculares, se seccionaron los vasos y se realizó un lavado intravascular con suero heparinizado. Con posterioridad se cortó el bronquio y se llevaron a cabo las anastomosis con los manguitos (fig. 1). Por último, tras ventilar y reperfundir de forma lenta el pulmón implantado, se colocó un drenaje pleural y se cerró la toracotomía. Se administraron atipamezol intramuscular (1,25 mg/kg), antagonista de la medetomidina y buprenorfina intramuscular (0,05 mg/kg). Se aspiró a través del drenaje para devolver a la cavidad pleural su presión negativa y, cuando el animal presentó respiración espontánea, se procedió a retirarlo.

Determinaciones

Todos los animales se sacrificaron a las 48 h. Se extrajo el bloque cardiopulmonar, que se perfundió con formaldehído al 1% a través de la tráquea. El pulmón se incluyó en parafina y se realizaron cortes longitudinales que se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se observaron al microscopio óptico las muestras y se determinó la presencia de signos de LIR –edema peribronquial y perivascular, congestión vascular, infiltrado inflamatorio agudo (neutrófilos) y hemorragia–, así como la presencia de RA mediante la clasificación internacional del rechazo pulmonar postrasplante.

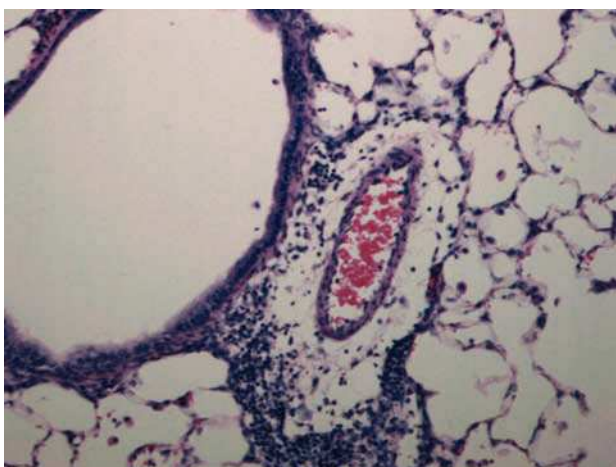


Fig. 2. Infiltrado inflamatorio linfocitario perivascular (rechazo agudo A2) en un pulmón trasplantado con 4 h de isquemia y con escaso edema.

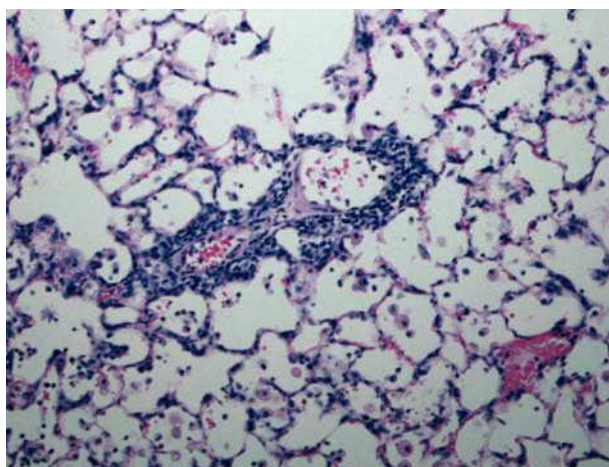


Fig. 3. Infiltrado inflamatorio linfocitario peribronquiolar y perivascular (rechazo agudo A2) en un pulmón trasplantado con 10 h de isquemia y con edema moderado.

Desde el punto de vista clínico se valoró por inspección durante el período postoperatorio la presencia de taquipnea (> 100 respiraciones/min), vocalizaciones o estridor, posturas anómalas u ortopneicas, hemoptisis e infección de la herida quirúrgica. Se realizó en todos los casos una radiografía de tórax (Mobilett II, Siemens, Madrid; 55 KV y 3,2 mAs) inmediatamente después de la intervención y a las 48 h, antes del sacrificio de los animales.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante el programa informático SPSS. Se aplicaron el test de la χ^2 y el test exacto de Fisher para el cálculo de probabilidades.

Resultados

Efecto del tiempo de isquemia sobre la evolución clínica

Todos los animales del grupo 1 (tiempo de isquemia de 4 h) presentaron una evolución clínica satisfactoria hasta el momento del sacrificio, salvo uno que presentó taquipnea y estridor. Un animal del grupo 2 (tiempo de isquemia de 6 h) tuvo taquipnea y hemoptisis aislada, que atribuimos a una deficiente preservación del injerto durante la perfusión, pero sobrevivió hasta el momento del sacrificio. El resto de los animales de dicho grupo tuvo una buena evolución clínica. Un animal del grupo 3 (tiempo de isquemia de 10 h) presentó taquipnea y estridor tras el implante, que también relacionamos con una deficiente preservación del pulmón donante, y otro animal presentó una taquipnea bien tolerada. Ambos animales sobrevivieron hasta el momento del sacrificio. El resto de los animales del grupo 3 evolucionó de forma satisfactoria (tabla I). No observamos ninguna infección de la herida quirúrgica.

En el estudio radiológico observamos un caso de neumotórax izquierdo basal en el animal del grupo 3 con taquipnea leve. En todos los casos apreciamos un aumento de densidad difuso del pulmón trasplantado, no presente en el pulmón derecho, que relacionamos con una LIR.

Efecto del tiempo de isquemia sobre la lesión pulmonar

No se observaron diferencias significativas entre los valores de los parámetros histológicos indicadores de lesión pulmonar con los distintos tiempos de isquemia —4 h (fig. 2), 6 y 10 h (fig. 3)— a los que se sometieron los pulmones a implantar (tabla I).

Los pulmones implantados con un tiempo de isquemia de 10 h se asociaron a una tendencia menor, no estadísticamente significativa, a presentar hemorragia pulmonar e infiltrado inflamatorio agudo. No presentaron LIR y RA más graves. En cuanto a la afectación del pulmón contralateral, hallamos un infiltrado inflamatorio agudo en el animal del grupo de 4 h con mala evolución clínica y con edema pulmonar grave en el pulmón trasplantado.

Hubo 5 casos de RA tipo A2 (2 animales del grupo 1; uno del grupo 2, y 2 del grupo 3) y 2 casos de RA tipo A1 (un animal del grupo 1 y otro del grupo 3).

TABLA I
Efecto del tiempo de isquemia en la evolución clínica, la lesión de isquemia-reperfusión y el rechazo agudo

Variable	Tiempo de isquemia			p
	4 h	6 h	10 h	
Evolución clínica				0,711
Buena	4	4	3	
Mala o fallecimiento	1	1	2	
Edema				0,711
Nulo o leve	4	3	4	
Moderado-grave	1	2	1	
Congestión vascular				0,343
Nula o leve	2	2	4	
Moderada-grave	3	3	1	
Hemorragia				0,036
No	3	1	5	
Sí	2	4	0	
Rechazo agudo				0,343
No	2	4	2	
Sí	3	1	3	
Infiltración neutrófila				0,099
No	3	5	5	
Sí	2	0	0	

TABLA II
Efecto de la lesión de isquemia-reperfusión y del rechazo agudo en la evolución clínica

Variable	Evolución		p
	Buena	Mala-fallecimiento	
Edema			> 0,05
Nulo o leve	8	3	
Moderado-grave	3	1	
Congestión			> 0,05
Nula o leve	6	2	
Moderada-grave	5	2	
Hemorragia			0,604
No	6	3	
Sí	5	1	
Rechazo agudo			0,282
No	7	1	
Sí	4	3	
Infiltración neutrófila			0,476
No	10	3	
Sí	1	1	

TABLA III
Relación del edema con la gravedad de la lesión pulmonar

Variable	Edema		p
	Nulo o leve	Moderado-grave	
Congestión			> 0,05
Nula o leve	6	2	
Moderada-grave	5	2	
Hemorragia			0,235
No	8	3	
Sí	1	3	
Rechazo agudo			> 0,05
No	6	2	
Sí	5	2	
Infiltración neutrófila			0,476
No	10	3	
Sí	1	1	

TABLA IV
Relación del rechazo agudo con la lesión de isquemia-reperfusión

Variable	Rechazo agudo		p
	No	Sí	
Edema			> 0,05
Nulo o leve	6	5	
Moderado-grave	2	2	
Congestión			0,619
Nula o leve	5	3	
Moderada-grave	3	4	
Hemorragia			0,608
No	4	5	
Sí	4	2	
Infiltración neutrófila			> 0,05
No	7	6	
Sí	1	1	

Efecto de la lesión de isquemia-reperfusión y del rechazo agudo en la evolución clínica

No hubo modificaciones significativas en la evolución clínica de los animales trasplantados por la gravedad del edema ni por la presencia y gravedad de los otros signos de LIR y RA (tabla II).

Relación de la lesión de isquemia-reperfusión y del rechazo agudo

No observamos que la gravedad del edema se relacionara significativamente con un grado más grave de congestión vascular, infiltrado inflamatorio y RA, aunque se apreció una tendencia no significativa a acompañarse de hemorragia (tabla III). El RA no se relacionó con la presencia y gravedad del resto de los parámetros indicadores de LIR (tabla IV).

Discusión

El daño pulmonar ocasionado por la LIR y el RA sigue siendo una causa significativa de morbilidad y mortalidad precoces tras el TP^{2,8}. Uno de los aspectos más controvertidos del TP en la clínica humana es el tiempo de isquemia máximo que puede soportar el órgano hasta ser trasplantado^{2,6}. En la actualidad se acepta que éste debe estar entre las 6 y 8 h^{1,3-6}. No obstante, existen dudas razonables de que estos valores no puedan ser superados^{2,5,6}. Los datos que aquí presentamos, si bien los calificamos de preliminares, indican que el pulmón podría soportar tiempos de isquemia superiores a los considerados en la actualidad como límites. Al igual que en otros estudios, hemos realizado TP experimentales con éxito sin que hayamos evidenciado una LIR y un RA más graves^{9,10}.

El edema pulmonar se considera el máximo exponente del daño tisular producido por la LIR. Es el responsable de la disfunción del pulmón trasplantado, y la evolución clínica tras el TP se relaciona con el tiempo de isquemia. En estudios experimentales en ratas, a partir de las 48 h del TP puede observarse un grado variable de edema y congestión alveolar, infiltrado leucocitario de predominio mononuclear, hemorragia y necrosis, además de los correspondientes signos de RA¹¹.

En nuestro estudio no observamos que la gravedad de la LIR se haya relacionado con una peor evolución clínica de los animales trasplantados. Esto podría deberse a que hemos realizado trasplantes unilaterales izquierdos, y el pulmón derecho tiene una importante reserva funcional respiratoria en estos animales. Esta circunstancia podría ser una limitación a la hora de valorar los aspectos clínicos de nuestro trabajo.

La rata es un buen modelo para el estudio del RA y su relación con la LIR, dado que el RA aparece de forma más precoz que en otros mamíferos¹¹, como el perro o el humano. Se ha descrito reiteradamente que la presencia y el grado de RA podían estar relacionados con la gravedad de la LIR. En el estudio de Shiraishi et al¹² se observó que, si bien la LIR predispone a la aparición del RA, la gravedad de éste no se relaciona con la LIR. Nuestros datos apoyan estas afirmaciones, puesto que no hemos hallado una relación entre la LIR y la presencia y gravedad del RA. La tendencia a acompañarse de hemorragia indica que la lesión tisular en estos casos de LIR grave es importante y se asocia a una alteración vascular del coeficiente de filtración capilar^{13,14}.

La afectación del pulmón contralateral es un hallazgo frecuente en los TP unilaterales o en los estudios de reperfusión unilateral¹⁵. Nosotros no hemos hallado esa

relación en nuestra serie. Sólo hemos podido observar que, cuando se presenta esta afectación contralateral, hay un edema grave en el pulmón trasplantado.

Los pulmones implantados con un tiempo de isquemia prolongado (10 h) no sólo no han presentado un mayor grado de lesión pulmonar, sino que además se han asociado a una tendencia menor, aunque no estadísticamente significativa, a presentar hemorragia pulmonar e infiltrado inflamatorio agudo.

Concluimos que, en nuestro estudio, el tiempo de isquemia pulmonar prolongado, de 10 h, no se asocia a LIR ni RA más graves, ni a una peor evolución clínica. El RA no se relaciona con la presencia y la gravedad de la LIR. Serán necesarios más estudios que determinen cuál es el tiempo de isquemia máximo que pueden soportar los pulmones. Esto podría ayudar a aumentar la oferta de donantes de regiones periféricas a centros transplantadores de referencia.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento al Dr. José Carlos Rodríguez, jefe de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín; a D. Heriberto Grosso, técnico del bioterio de dicho hospital; a Dña. Clara Martel, secretaria de la Unidad de Investigación, y a D. Juan Ramírez y D. Ramón Saavedra, del Servicio de Ilustración e Iconografía del mismo hospital, por su ayuda técnica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Snell GI, Rabinov M, Griffiths A. Pulmonary allograft ischemic time: an important predictor of survival after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 1996;15:160-8.
2. Thabut G, Mal H, Cerrina J, Darteville P, Dromer C, Velly JF. Graft ischemic time and outcome of lung transplantation: a multicenter analysis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:786-91.
3. Bund M, Struber H, Heine J. Effect of lung allograft ischemia duration on post reperfusion graft function and postoperative course. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1998;46:93-6.
4. Ueno T, Snell GI, Williams TJ. Impact of graft ischemic time on outcomes after bilateral sequential single-lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 1999;67:1577-82.
5. Novick RJ, Benneth LE, Meyer DM. Influence of graft ischemic time and donor age on survival after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 1999;18:425-31.
6. Glanville AR, Marshman D, Keogh A. Outcome in paired recipients of single lung transplants from the same donor. *J Heart Lung Transplant.* 1995;14:878-82.
7. Santana Rodríguez N, Martín Barrasa JL, López García A, Rodríguez Suárez P, Ponce González M, Freixinet Gilart J. Trasplante pulmonar en ratas. Un modelo viable de estudio experimental. *Arch Bronconeumol.* 2004;40:438-42.
8. De Perrot M, Liu M, Waddell T. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am Resp J Crit Care Med.* 2003;167:490-511.
9. Sasaki S, McCully JD, Palombo JD. Lung preservation threshold in a compromised septic lung injury model. *Ann Thorac Surg.* 1995;60:958-63.
10. Serrick C, Giaid A, Reis A. Prolonged ischemia is associated with more pronounced rejection in the lung allograft. *Ann Thorac Surg.* 1997;63:202-8.
11. Marck KW, Prop J, Wildevuur CR. Lung transplantation in the rat: histopathology of left lung iso- and allografts. *J Heart Transplant.* 1985;4:263-6.
12. Shiraishi T, Mizuta T, DeMeester S. Effect of ischemic injury on subsequent rat lung allograft rejection. *Ann Thorac Surg.* 1995;60:947-51.
13. Kawaguchi AT, Mizuta T, Shirai M. Right lung transplantation followed by left pneumonectomy in the rat. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1996;10:1011-4.
14. Paik HC, Hoffmann SC, Egan TM. Pulmonary preservation studies: effects on endothelial function and pulmonary adenine nucleotides. *Transplantation.* 2003;75:439-44.
15. Watanabe A, Kawaharada N, Kusajima K, Komatsu S, Takahashi H. Contralateral lung injury associated with single-lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 1996;62:1644-9.