

# Trasplante pulmonar en ratas. Un modelo viable de estudio experimental

N. Santana Rodríguez<sup>a</sup>, J.L. Martín Barrasa<sup>b</sup>, A. López García<sup>c</sup>, P. Rodríguez Suárez<sup>b</sup>, M. Ponce González<sup>b</sup> y J. Freixinet Gilart<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Cirugía Torácica. Clínica San Roque. Las Palmas de Gran Canaria.

<sup>b</sup>Unidad de Cirugía Torácica. Unidad de Investigación. Hospital Universitario Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria. España.

<sup>c</sup>Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid. España.

**OBJETIVOS:** Desarrollar el modelo experimental de trasplante pulmonar (TP) con *cuffs* (técnica de manguito), inicialmente descrito por Mizuta, como medio de estudio del TP en nuestro medio incorporando un nuevo protocolo anestésico rápido, seguro y reversible.

**MATERIAL Y MÉTODO:** Se han utilizado ratas Sprague-Dawley (n = 88) para el desarrollo del modelo experimental y se han logrado realizar 30 TP izquierdos (n = 60). En el animal donante se han efectuado una esternotomía media y extracción del bloque cardiopulmonar con disección del pulmón izquierdo y colocación de los *cuffs* (catéteres de venopunción cortados en cilindros de 3 mm). En el receptor, a través de una toracotomía lateral, se ha llevado a cabo el implante del pulmón izquierdo mediante las anastomosis con *cuffs*. Se han valorado el tiempo quirúrgico y las complicaciones postoperatorias, así como la presencia de signos de lesión de isquemia-reperfusión y rechazo agudo en el pulmón trasplantado.

**RESULTADOS:** Durante el desarrollo del modelo experimental rechazamos a 8 animales en la extracción. Tras completarla satisfactoriamente, no se pudo realizar el implante en 10 ratas por problemas técnicos. De los animales trasplantados, 4 fallecieron en las primeras 24 h y 26 ratas sobrevivieron hasta las 48 h, momento en que fueron sacrificadas. Hallamos un buen estado de las anastomosis y signos de lesión de isquemia-reperfusión y rechazo agudo en el parénquima pulmonar del pulmón trasplantado.

**CONCLUSIONES:** El TP con *cuffs* en ratas es un modelo válido, fiable, reproducible y económico para el estudio del TP y de los fenómenos de isquemia-reperfusión y rechazo. La técnica quirúrgica es compleja, tiene una larga curva de aprendizaje y requiere personal con experiencia quirúrgica. Además, es subsidiaria de modificaciones que hagan que se asemeje más a la técnica quirúrgica utilizada en clínica humana para interpretar mejor y poder extrapolar los resultados al humano con más fiabilidad.

**Palabras clave:** Trasplante pulmonar. Cirugía experimental. Trasplante experimental.

## Lung Transplantation in Rats: a Viable Experimental Model

**OBJECTIVES:** To incorporate a new fast, safe, and reversible anesthetic procedure into the experimental model of lung transplantation (LT) using a cuff technique originally described by Mizuta.

**MATERIAL AND METHOD:** Eighty-eight Sprague-Dawley rats were used in the experimental model. Thirty left LTs were performed, using 60 rats. The donor heart-lung block was excised by median sternotomy with dissection of the left lung and cuffs (intravenous catheters cut into 3-mm sections) were put in place. The left lung was implanted in the recipient by lateral thoracotomy using the cuffs for anastomoses. The duration of surgery and postoperative complications were recorded. Also noted were signs of ischemia-reperfusion injury, and acute rejection of the transplanted lung.

**RESULTS:** We discarded lungs excised from 8 animals when developing the experimental model. Transplants could not be completed in 10 rats due to technical problems, despite satisfactory excision. Of the rats who received a transplant, 4 died in the first 24 hours and 26 survived to 48 hours. They were then killed and examined. The state of the anastomoses was good and signs of ischemia-reperfusion injury, as well as acute rejection were observed in the parenchyma of the transplanted lung.

**CONCLUSIONS:** LT with cuffs in rats is a valid, reliable, reproducible, and cheap model for studying ischemia-reperfusion injury and rejection in LT. The surgical technique is complex, requiring experienced surgeons and a long learning process. Modification of the technique to more closely resemble the surgical procedure in humans is possible, thus facilitating interpretation and allowing more reliable extrapolation to humans.

**Key words:** Lung transplant. Experimental surgery. Experimental transplant.

Este proyecto se ha realizado gracias a la financiación del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS).

Correspondencia: Dr. N. Santana Rodríguez.  
 Unidad de Cirugía Torácica. Clínica San Roque.  
 Juan E. Doreste, 11. 35001 Las Palmas de Gran Canaria. España.  
 Correo electrónico: norbesr@terra.es

Recibido: 13-11-2003; aceptado para su publicación: 23-3-2004.

## Introducción

El trasplante pulmonar (TP) es una opción terapéutica para algunas enfermedades respiratorias terminales. Sus indicaciones más importantes son el enfisema pulmonar avanzado, la fibrosis quística, la enfermedad intersticial difusa y la hipertensión pulmonar. La técnica

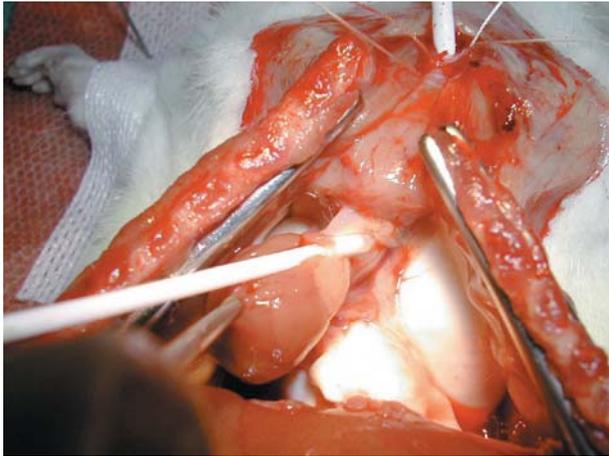


Fig. 1. Perfusión anterógrada en el donante.

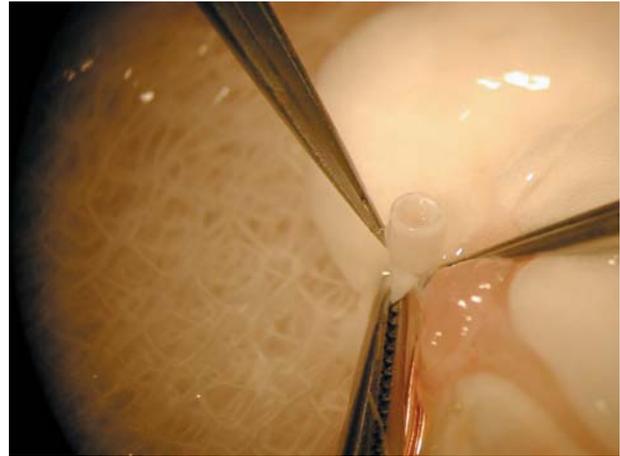


Fig. 2. Colocación del cuff en la arteria pulmonar durante la fase de extracción.

quirúrgica más utilizada en la actualidad es el trasplante bipulmonar, seguido del unipulmonar<sup>1</sup>. La necesidad de mejorar ciertos aspectos como la preservación, los tiempos de isquemia y la lesión de isquemia-reperfusión hace necesario continuar con programas de TP experimental.

Los modelos experimentales que se han utilizado hasta la actualidad han sido muy variados. En un principio, el modelo preferido fue el canino<sup>2,3</sup>. Con posterioridad se inició, como modelo experimental, el TP en ratas, primero en 1971<sup>4</sup> y luego, en 1982<sup>5</sup>. La técnica microquirúrgica mejoró en 1989 gracias a Mizuta et al<sup>6</sup>, que realizaron los TP con manguitos (*cuffs*). En 1995 Reis et al<sup>7</sup> presentaron otras mejoras significativas de la técnica quirúrgica. Desde entonces el TP experimental con *cuffs*, con algunas modificaciones, ha venido realizándose de forma electiva por algunos grupos para el estudio de diversos aspectos del TP<sup>8-11</sup>.

En este trabajo evaluamos nuestros resultados y la eficacia de la técnica basada en la descripción inicial de Mizuta et al y las modificaciones de los otros autores que han estudiado el TP experimental mediante la técnica de *cuffs*, incorporando un nuevo protocolo anestésico rápido, seguro y reversible, no usado hasta el momento en este modelo experimental.

## Material y método

Se han utilizado 88 ratas macho de la raza Sprague-Dawley para el desarrollo del modelo experimental, con pesos entre 300 y 400 g, y en condiciones óptimas de estabulación. Se han logrado realizar 30 TP. Todos los animales han recibido un tratamiento de acuerdo con la normativa legal establecida a escala internacional.

### Extracción del pulmón donante

Se le ha aplicado al animal donante anestesia general profunda con tiopental sódico (60 mg/kg) intraperitoneal, previa inducción con éter. Una vez anestesiado, se ha rasurado la parte anterior del tórax, se ha realizado una traqueostomía y se ha ventilado al animal con un volumen corriente (VC) de 1 ml/100 g de peso.

Con la rata en posición decúbito supino se ha realizado una laparotomía media y se han inyectado 100 U/100 g de heparina sódica en la vena cava inferior. A continuación se ha realizado una esternotomía media y se ha abierto el tórax ampliamente con 2 pinzas de Kocher.

Se ha procedido a la sección del timo y, a continuación, de la aorta abdominal, de la vena cava inferior torácica, de las aurículas izquierda y derecha. Mediante sección del cono de la arteria pulmonar y con un catéter de venopunción, se han perfundido los pulmones con solución de preservación pulmonar a 4 °C (fig. 1), en nuestro caso, suero fisiológico. Si la perfusión fue homogénea, se ha procedido a la ligadura y sección de la tráquea con el pulmón en semiinsuflación y a la extracción del bloque cardiopulmonar mediante tracción, separándolo del esófago, con sección de los troncos supraórticos, aorta, venas cavas y ligamento pulmonar.

Una vez extraído el bloque, con microscopio, se han diseccionado la arteria, vena y bronquio izquierdos con sección distal al hilio de éstos y separación del pulmón izquierdo, pinzando el bronquio con un pinza microvascular para mantener el pulmón en semiinsuflación. A continuación se han colocado los *cuffs*, catéteres de venopunción (Abbocath<sup>®</sup>) cortados en cilindros de 3 mm con una base y una lengüeta posterior de 1,5 mm (fig. 2). Se ha mantenido el pulmón a 4 °C en suero fisiológico frío hasta el momento del implante.

### Implante en el receptor

En esta fase al animal receptor se le ha aplicado anestesia general con medetomidina (0,25 mg/kg) subcutánea, ketamina (50 mg/kg) intraperitoneal y atropina (0,7 mg/kg) intramuscular. Una vez anestesiado, se ha rasurado el hemitórax izquierdo, se ha realizado la intubación orotraqueal con un catéter de venopunción y se ha ventilado al animal con el mismo volumen corriente que en la extracción.

Se ha efectuado una toracotomía posterolateral izquierda sobre el cuarto espacio intercostal. Se ha sacado el pulmón de la cavidad torácica y se ha cauterizado una arteriola próxima a la vena pulmonar y el plexo arteriolar peribronquial.

Se ha realizado la disección del hilio pulmonar con identificación de la arteria, bronquio y vena pulmonar. Se han colocado ligaduras y pinzas microvasculares, a cada una de ellas, próximas al corazón (fig. 3).

Se han seccionado, próximas al pulmón, la arteria y la vena, y se ha realizado un lavado intravascular con suero heparinizado.

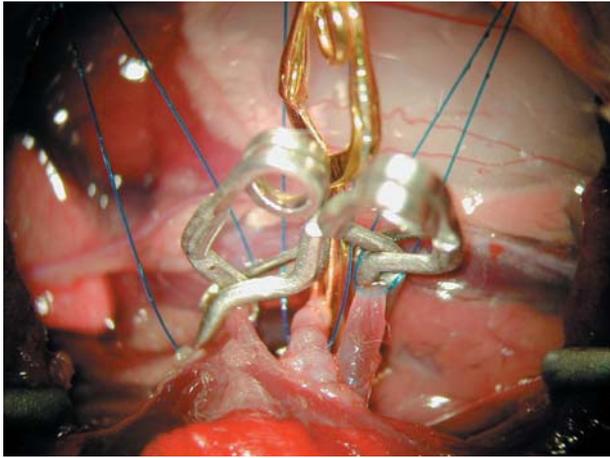


Fig. 3. Colocación de pinzas microvasculares y ligaduras en el receptor para proceder a realizar las anastomosis (de derecha a izquierda: arteria, bronquio y vena pulmonar).



Fig. 4. Aspecto final del pulmón implantado. Puede observarse el aspecto del pulmón tras la reperfusión y las anastomosis con los cuffs.



Fig. 5. Radiografía anteroposterior de tórax a las 48 h del trasplante. Se aprecia un aumento de densidad del pulmón izquierdo en relación con una lesión de isquemia-reperfusión.

Con posterioridad, se ha cortado el bronquio y se ha llevado a cabo la anastomosis mediante la introducción de los cuffs dentro de cada una de las estructuras correspondientes. Se han fijado las anastomosis anudando sobre ellas con las ligaduras.

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

Una vez implantado el pulmón (fig. 4) se ha seccionado el pulmón nativo del receptor, se ha colocado un drenaje pleural conectado a una jeringa y se ha cerrado la toracotomía. Una vez cerrada la piel, se ha administrado atipamezol, antagonista de la medetomidina, y buprenorfina intramuscular. Se ha aspirado a través del drenaje para devolver a la cavidad pleural su presión negativa y, cuando el animal ha presentado respiración espontánea, se ha retirado el drenaje.

#### Determinaciones

Todos los animales que han sobrevivido a la intervención han sido sacrificados a las 48 h. Se ha extraído el bloque cardiopulmonar, que se ha perfundido con formaldehído al 1% a través de la tráquea. El pulmón trasplantado se ha incluido en

parafina y se han realizado cortes longitudinales que se han teñido con hematoxilina-eosina. Se han observado al microscopio óptico las muestras y se ha determinado la presencia de signos de lesión de isquemia-reperfusión: edema peribronquial y perivascular, congestión vascular, infiltrado inflamatorio agudo (neutrófilos) y hemorragia, así como la presencia de rechazo agudo mediante la clasificación internacional del rechazo pulmonar postrasplante.

Desde el punto de vista clínico, se ha valorado por inspección durante el período postoperatorio la presencia de taquipnea (> 100 respiraciones/min), hemoptisis e infección de la herida quirúrgica. Se ha realizado en todos los casos una radiografía de tórax (Siemens Mobilett II- 55 KV y 3,2 mAs) inmediatamente después de la intervención y a las 48 h (fig. 5), antes del sacrificio de los animales.

#### Resultados

Durante el desarrollo de la técnica quirúrgica rechazamos el pulmón de 8 ratas para el trasplante en la fase de extracción y no pudimos completar el implante, después de haber realizado una correcta extracción, en 10 animales por problemas técnicos que se describen en la tabla I. El tiempo quirúrgico de extracción y de implan-

TABLA I  
Problemas técnicos en la extracción y el implante que no han permitido realizar el trasplante

Extracción	Realizada en su totalidad	(n = 40)
	No realizada	(n = 8)
	Tumor hiliar	(n = 1)
	Perfusión no homogénea	(n = 5)
	Mala sección de la vena en la disección del bloque cardiopulmonar	(n = 2)
Implante	Realizado en su totalidad	(n = 30)
	No realizado	(n = 10)
	Lesión vascular durante la disección hiliar	(n = 2)
	Desgarro de la arteria en la anastomosis	(n = 3)
	Desgarro de la vena en la anastomosis	(n = 5)
Total		(n = 88)

te de los animales, en función de la curva de aprendizaje, se indica en la tabla II.

Las complicaciones clínicas y radiológicas tras el trasplante se reflejan en la tabla III. El resto de los animales que sobrevivieron a la intervención no presentó problemas. De las ratas trasplantadas, 2 fallecieron tras la extubación por edema agudo de pulmón y otras 2 en las primeras 24 h por estenosis completa de la vena pulmonar debido a una inadecuada anastomosis del *cuff*.

Se sacrificó a 26 ratas a las 48 h del trasplante. Los estudios histológicos demostraron una luz vascular y bronquial correcta, sin signos de estenosis ni trombosis. En el parénquima del pulmón trasplantado se apreciaron signos de lesión de isquemia-reperfusión en grados moderado y grave, y rechazo agudo en grados leve y moderado que confirman que había habido reperfusión y ventilación del implante.

### Discusión

En sus inicios, el TP experimental tuvo como modelo animal preferido el perro<sup>2,3</sup>. Los problemas éticos y económicos que implicaba este modelo hicieron que los investigadores buscaran otros como el conejo y la rata. Este último es el animal de experimentación más utilizado en investigación por su pequeño tamaño, resistencia, facilidad de mantenimiento y alimentación.

Los primeros intentos por desarrollar la técnica del TP en ratas chocaron con la complejidad técnica de las suturas microquirúrgicas vasculares y bronquiales. Los tiempos quirúrgicos prolongados y la alta mortalidad postoperatoria la convertían en una técnica quirúrgica con pocos adeptos<sup>4,5</sup>. El desarrollo, 8 años más tarde, del modelo experimental de TP en ratas mediante la técnica de *cuffs* descrita por Mizuta et al<sup>6</sup> supuso un avance.

La técnica quirúrgica es compleja y requiere una considerable curva de aprendizaje. Durante su realización el cirujano debe familiarizarse con la peculiar anatomía de la rata y con el uso del material de microcirugía y el microscopio para llevar a cabo las disecciones. La preparación de los *cuffs* se realiza a partir de Abbocaths<sup>®</sup> de 16 g (1,7 mm de diámetro) o 14 g (2,2 mm). Preferimos los *cuffs* número 16<sup>7</sup> porque con ellos se minimiza el riesgo de desgarro de las estructuras hiliares, en particular la vena pulmonar. Su permeabilidad se ha demostrado adecuada y, por lo tanto, los consideramos de elección para los animales de 300-400 g de peso.

La extracción del pulmón donante la realizamos, a diferencia de otros autores<sup>6</sup>, a través de esternotomía media<sup>7</sup>. No hemos tenido ningún accidente con esta técnica. La laparotomía que se realiza de forma simultánea da lugar a un fácil acceso a la vena cava inferior infrafragmática. Con ello se puede administrar la heparina, sin necesidad de tener que alargar el procedimiento de extracción para obtener otro acceso vascular. Esta maniobra requiere un especial cuidado para no lesionarla y producir una hemorragia masiva que inestabilice al animal o embolias respiratorias.

La perfusión es un paso crucial en la extracción pulmonar. El volumen y la velocidad del flujo deben ser los adecuados para conseguir una perfusión homogénea.

TABLA II  
Tiempos medios de extracción e implante (min) durante 12 meses

	Extracción	Implante
1-6 meses	70,2 ± 4,3	100,0 ± 3,5
6-12 meses	65,0 ± 10,0	75,0 ± 13,7
Actual	45,0 ± 5,2	65,0 ± 7,5

Los datos se expresan como media ± desviación estándar.

TABLA III  
Complicaciones clínicas y radiológicas postoperatorias de los animales trasplantados

Complicaciones	N.º de animales
Taquipnea	4
Hemoptisis	2
Infección	0
Neumotórax homolateral	2
Neumotórax contralateral	1
Fallecimiento	4

Debe realizarse con los pulmones en ventilación para evitar zonas mal perfundidas por las atelectasias<sup>12</sup>. La forma óptima de perfundir la hemos logrado con un Abbocath<sup>®</sup> de 16 g, 20 ml de volumen y con el extremo superior de la columna de perfusión a 25 cm de altura. En este trabajo hemos utilizado suero fisiológico a 4 °C y no otra solución de preservación pulmonar para disminuir los costes y porque también lo han usado otros autores que han trabajado con este modelo experimental<sup>7</sup>. En este estudio hemos realizado la perfusión anterógrada. No hemos efectuado la perfusión retrógrada<sup>13</sup>, muy utilizada en la actualidad en el TP clínico, porque no se ha efectuado en los modelos experimentales anteriormente descritos, pero pensamos desarrollarla en próximos estudios de TP.

La extracción del bloque cardiopulmonar la hemos efectuado con ligadura de la tráquea con los pulmones en semiinsuflación<sup>14</sup>, a diferencia de los otros autores<sup>6,7</sup>. La disección de las estructuras hiliares pulmonares, sobre todo la vena y el bronquio, debe practicarse con el microscopio. Las estructuras deben cortarse lo más largas que sea posible para facilitar la colocación de los *cuffs* y el implante. Hay que pinzar el bronquio por debajo del nivel de sección para conservar el pulmón semiinsuflado y evitar las atelectasias que se producen en el período previo al implante<sup>10</sup>.

La correcta colocación de los *cuffs* es fundamental. En este paso son recomendables unas pinzas de Adson, para no desgarrar las estructuras, lo que inutilizaría el pulmón para el implante. Es muy importante que la lengüeta del *cuff* se oriente hacia el borde posterior del pulmón para que no haya torsiones de las estructuras en el implante.

La intubación orotraqueal del receptor debe realizarse con extremo cuidado. Es recomendable utilizar un Abbocath<sup>®</sup> número 14 porque impide la pérdida de aire alrededor de la tráquea y asegura una mejor ventilación de la rata durante el trasplante.

A diferencia de otros autores que utilizan el quinto espacio intercostal<sup>7</sup>, nosotros preferimos abordar la cavidad torácica por el cuarto<sup>6</sup>. Esto nos proporciona una mejor disposición del hilio pulmonar para la disección. Ésta debe ser cuidadosa, sobre todo con la vena pulmonar, que se lesiona con facilidad. Las pinzas microvasculares las colocamos sobre cada estructura hilar lo más cerca posible del corazón y su sección debe realizarse, en la cara anterior<sup>6</sup>, lo más lejos posible para obtener unos cabos largos donde efectuar las anastomosis. En este paso, la técnica que empleamos se diferencia de las anteriores<sup>6,7</sup>, que seccionan completamente las estructuras cerca del corazón dejando un cabo corto. Debe prestarse especial atención a la pinza de la vena para no obstruir la aurícula izquierda, lo que sería fatal para el animal.

La heparinización de las estructuras vasculares es útil para eliminar posibles trombos en los cabos, pero hay que prestar especial atención para que no pasen inadvertidas pequeñas burbujas de aire que en la reperfusión producen una embolia respiratoria, con el consiguiente fallecimiento del animal. Durante el implante es importante mantener el pulmón en hipotermia, para lo cual lo irrigamos continuamente con suero a 4 °C.

Las mayores ventajas de este modelo son su reproducibilidad, capacidad para generar LIR y rechazo, su bajo coste económico y el acortamiento de los tiempos quirúrgicos. Sus inconvenientes son la larga curva de aprendizaje y la necesidad de personal con experiencia quirúrgica. Desde el punto de vista técnico, los mayores problemas tienen lugar con la vena pulmonar, por lo que deben extremarse las precauciones cuando se trabaja con ella.

En nuestra opinión, son necesarios modelos experimentales de TP consensuados. La técnica quirúrgica del TP con *cuffs* en ratas es subsidiaria de modificaciones que hagan que se asemeje más a la utilizada en clínica humana para interpretar mejor los resultados y poder extrapolarlos al humano con más fiabilidad.

## Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a D. Heriberto Grosso, técnico del animalario, y D.<sup>a</sup> Sandra García, secretaria de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Dr. Negrín, por su apoyo técnico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Grupo de Trabajo de Trasplante Pulmonar SEPAR. Trasplante pulmonar. Normativa SEPAR. Arch Bronconeumol 2001;37:307-15.
2. Demikov V. Experimental transplantation of vital organ. New York: Consultants Bureau Enterprises, Inc., 1962.
3. Blumenstock DA, Otte HP, Grosjean OV, Mulder MA. Lung allografts in dogs treated with methotrexate and antilymphocyte serum. Ann Thorac Surg 1968;6:33-9.
4. Asimacopoulos PJ, Molokhia FAS, Pegg CAS, Norman JC. Lung transplantation in the rat. Transplant Proc 1971;3:583-5.
5. Marck KW, Wildevuur CR. Lung transplantation in the rat: I. Technique and survival. Ann Thorac Surg 1982;34:74-80.
6. Mizuta T, Kawaguchi A, Nakahara K, Kawashima Y. Simplified rat lung transplantation using a cuff technique. J Thorac Cardiovasc Surg 1989;97:578-81.
7. Reis A, Giaid A, Serrick C. Improved outcome of rat lung transplantation with modification of the non suture external cuff technique. J Heart Lung Transplant 1995;14:274-9.
8. De Perrot M, Keshavjee S, Tabata T, Liu M, Downey GP, Waddell TK. A simplified model for en bloc double lung xenotransplantation from hamster to rat. J Heart Lung Transplant 2002;21:286-9.
9. Fehrenbach A, Wittwer T, Meyer D, Von Vietinghoff S, Viehovec M, Fehrenbach H, et al. Nitroglycerin alters alveolar type II cell ultrastructure after ischemia and reperfusion. J Heart Lung Transplant 2001;20:876-88.
10. Sano Y, Maruyama S, Aoe M, Date H, Shimizu N. Effect of a single injection of highdose FK506 on lung transplantation in rats. Surg Today 1996;26:999-1005.
11. Shiraishi T, Mizuta T, DeMeester SR, Ritter JH, Swanson PE, Wick MR, et al. Effect of ischemic injury on subsequent rat lung allograft rejection. Ann Thorac Surg 1995;60:947-51.
12. De Perrot M, Liu M, Waddell T. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. Am Resp J Crit Care Med 2003;167:490-511.
13. Varela A, Montero CG, Córdoba M. Improved distribution of pulmonary flush solution to the tracheobronchial wall in pulmonary transplantation. Eur Surg Res 1997;29:1-4.
14. De Campos KN, Keshavjee S, Liu M. Optimal inflation volume for hypothermic preservation of rat lungs. J Heart Lung Transplant 1998;17:599-609.