

Estudio del aclaramiento bacteriano en el trasplante esplénico cervical en ratas

L. Gómez^a, L. Pérez^a, X. Gómez^b, S. Ros^a, A. Pelayo^a y M. García^c

^aServicio de Cirugía General. Facultad de Medicina. Lérida. ^bDepartamento de Medicina. Facultad de Medicina. Lérida.

^cServicio de Microbiología. Hospital Universitario Arnau de Vilanova. Lérida. España.

Resumen

Introducción. El objetivo de nuestro trabajo es estudiar el aclaramiento bacteriano en el trasplante esplénico cervical en ratas según nuestro modelo experimental.

Material y método. Distribución aleatoria de 100 ratas isogénicas tipo Lewis en 4 grupos: grupo control con laparotomía y preservación del bazo, grupo de esplenectomía, grupo de autotrasplante esplénico y grupo de trasplante esplénico heterotópico vascularizado en la región cervical. Se realizó un estudio del aclaramiento bacteriano mediante la determinación del número de colonias/ml de sangre tras infección por neumococos en una dosis de 1×10^7 .

Resultados. El grupo de trasplante esplénico presenta un efecto protector frente a la bacteriemia superior al de autotrasplante y esplenectomía; aunque inferior al de control. Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Conclusiones. Nuestro modelo experimental de trasplante esplénico cervical en ratas consigue, en el aclaramiento bacteriano, valores próximos a la normalidad y superiores a los del autotrasplante esplénico.

Palabras clave: Trasplante esplénico. Aclaramiento bacteriano. Neumococo.

BACTERIAL CLEARANCE IN RATS AFTER CERVICAL SPLEEN TRANSPLANTATION

Introduction. The aim of this study was to analyze bacterial clearance in rats after cervical spleen transplantation using our experimental model.

Material and method. One hundred isogenic Lewis rats were randomly distributed into four groups: control group with laparotomy and spleen preservation, splenectomy group, spleen autotransplantation group, and heterotopic spleen transplant group. Bacterial clearance was assessed by determination of the number of colonies per ml of blood after pneumococcus infection (1×10^7).

Results. The spleen transplantation group presented a higher protective effect against bacteremia than the autotransplant and splenectomy groups, although this effect was lower than in controls. The differences were statistically significant ($p < 0.05$).

Conclusions. Our experimental model of cervical spleen transplantation in rats maintains bacterial clearance at values that are close to normal levels and are higher than those obtained with spleen autotransplantation.

Key words: Splenic transplantation. Bacterial clearance. Pneumococcus.

Introducción

El primer modelo experimental de trasplante esplénico experimental en ratas fue descrito por Lee y Orloff¹ y Coburn² en 1969. Este modelo consiste en la realización

de una anastomosis vascular T-L en el segmento de la arteria aorta y la vena porta del donante con la arteria aorta y vena cava del receptor.

La región cervical fue utilizada por primera vez en cirugía experimental del trasplante cardíaco por Heron en 1971³. Olausson et al y otros autores propusieron un modelo experimental de trasplante esplénico en la región cervical utilizando una técnica sin sutura, es decir, mediante el uso de una prótesis endoluminal en la anastomosis vascular⁴⁻⁷. Nuestro grupo de trabajo ha publicado los buenos resultados obtenidos con la tutorización temporal de la anastomosis venosa, introducida como va-

Correspondencia: Dr. L. Gómez Quiles.
Joc de la Bola, 27, 1.º, 3.ª. 25003 Lérida. España.
Correo electrónico: lgq@menta.net

Manuscrito recibido el 26-2-2003 y aceptado el 21-10-2003.

riante técnica en nuestro modelo experimental de trasplante esplénico⁸.

La posibilidad de complicaciones graves en pacientes esplenectomizados justificó, en la década de los setenta, el desarrollo de la cirugía conservadora del bazo⁹⁻¹¹. Las diferentes opciones terapéuticas con la intención de preservación del bazo, como la esplenectomía parcial o incluso el autotrasplante esplénico, abrieron la puerta a la esperanza¹²⁻¹⁵. Sin embargo, la publicación de complicaciones graves infecciosas tras el autotrasplante esplénico en clínica humana^{16,17} y en trabajos con animales de experimentación^{18,19} ha puesto de manifiesto el posible déficit en la función inmunológica del bazo autotrasplantado.

La necesidad de esplenectomía en algunas enfermedades hematológicas, cirugía oncológica y cirugía traumática, y la posible aparición de complicaciones graves en pacientes esplenectomizados tras la alteración de la función inmunológica justifican el interés de los trabajos sobre el trasplante esplénico experimental y su posible desarrollo y aplicación en clínica humana. De hecho, en la literatura médica se han publicado recientemente los buenos resultados del trasplante esplénico en clínica humana y su aplicación en enfermedades hematológicas, como la hemofilia A²⁰⁻²³.

Uno de los dos puntos más importantes para determinar la respuesta inmunológica en el modelo experimental es la determinación del aclaramiento bacteriano. Éste consiste en realizar el montaje del número de colonias formadas/ml de sangre después de provocar una infección en el animal de experimentación.

Existen numerosos trabajos de autotrasplante esplénico donde se comparan los resultados del aclaramiento bacteriano con un grupo control y un grupo de esplenectomía parcial o total. Sin embargo, ningún trabajo experimental de trasplante esplénico publicado realiza el aclaramiento bacteriano para determinar la funcionalidad inmunológica del bazo trasplantado.

Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un modelo experimental con el objetivo de estudiar la determinación del aclaramiento bacteriano en el trasplante esplénico cervical en ratas. Nuestro trabajo consiste en estudiar la viabilidad del trasplante esplénico en la región cervical y la determinación del aclaramiento bacteriano de neumococos en comparación con un grupo control, un grupo de ratas esplenectomizadas y un grupo de autotrasplante.

El estudio ha sido realizado con la autorización de la Comisión de Experimentación Animal de nuestro centro.

Material y método

Para el estudio se han utilizado 100 ratas tipo Lewis (LETICA S.A.) de la misma línea genética (isogénicas, LEW/Rj) y consanguíneas de 10 semanas de edad, con un peso medio de 250 ± 50 g. Fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos de 25 ratas cada uno: a) grupo control, en el que se realizó laparotomía con preservación íntegra del bazo (*sham operated*); b) grupo de ratas esplenectomizadas; c) grupo de ratas autotrasplantadas según la técnica del *pouch* en el epiplón mayor, mediante la sección de la pieza en cortes transversales para conseguir tres fragmentos de 2-3 mm de espesor y un peso aproximado de 70 mg

(60-80 mg), y d) grupo de ratas trasplantadas según un nuevo modelo experimental de trasplante esplénico en la región cervical.

En nuestro modelo de trasplante esplénico cervical se realiza la preparación del donante según el modelo de Bitter-Sheurmann²⁴. Se llevó a cabo la preparación del receptor mediante esplenectomía y cervicotomía para la disección de la arteria carótida y vena yugular externa. A continuación se procedió a la anastomosis terminolateral del *cuff* de aorta del donante con la carótida del receptor mediante sutura continua (Ethicon 10/0) y a la anastomosis venosa tutorizada terminoterminal del *cuff* de la vena porta del donante con la vena yugular externa del receptor mediante la utilización del catéter endoluminal; se realizó una sutura continua (Ethicon 10/0) y se retiró parcialmente el catéter. Tras la inyección de suero salino se comprobó la estanqueidad de la anastomosis y su permeabilidad.

Para el estudio y la determinación del aclaramiento bacteriano se procedió, después de la extracción de sangre, a la inoculación por vía peritoneal de 1×10^7 neumococos (*Streptococcus pneumoniae* tipo 3 del Centro Nacional de Virología e Inmunología Sanitaria de Majadahonda, Madrid) a cada rata. La determinación del número de bacterias a inocular se establece según el método de turbidez de McFarland:

1. Extracción de 0,2 ml de sangre periférica a los 30, 60, 120 y 180 min de la inoculación de neumococos.
2. Siembra en 4 placas de agar-sangre por cada rata en función del tiempo transcurrido tras la inoculación.
3. Cultivo de las colonias en estufa de CO₂.
4. Lectura del resultado a las 48 h mediante el recuento del número total de colonias por placa.

Para conseguir los objetivos planteados y la comprobación de las hipótesis del estudio se han empleado los siguientes métodos estadísticos: comprobación de las variables cualitativas mediante la prueba de la χ^2 y la prueba exacta de Fisher. Para las comprobaciones entre variables cuantitativas entre grupos se ha empleado el test de la t de Student y el análisis de la varianza (ANOVA), realizando la estimación del intervalo de confianza (IC) del 95% de las diferencias. También se han empleado pruebas no paramétricas para realizar estas comparaciones. Para el estudio de correlación se han empleado modelos de regresión lineal simple y múltiple.

El estudio estadístico se ha efectuado con el programa SPSS 7.5 para Windows. Todas las pruebas se han considerado bilaterales y el nivel de significación se ha establecido en 0,05.

Resultados

El número de complicaciones relacionadas con la técnica quirúrgica del trasplante esplénico experimental según nuestro nuevo modelo experimental ha sido del 8% (2/25): un caso de hemorragia y un caso de trombosis. La comprobación de éstas se ha realizado mediante autopsia en el postoperatorio inmediato de las ratas afectadas. El tiempo quirúrgico total de trasplante en nuestro trabajo ha sido de 80 ± 10 min.

En el aclaramiento bacteriano, a los 30 min el resultado del valor medio del recuento en el grupo control es de 97 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de sangre; en el grupo de esplenectomía, el valor medio es de 311 UFC/ml; en el grupo de autotrasplante, el valor es de 243 UFC/ml y en el grupo de trasplante de 169 UFC/ml. A los 60 min, el recuento alcanza los valores máximos. A los 120 min, el aclaramiento presenta el mismo orden de resultados entre los grupos de estudio (tabla 1).

En este diagrama de cajas (fig. 1) podemos observar que, a los 30 min, el valor medio del número de colonias/ml de sangre en el grupo control presenta el valor más bajo (< 100 UFC/ml). Le siguen, en orden de frecuencia, los grupos de trasplante, autotrasplante y esple-

TABLA 1. Cálculo de la media, valor máximo y mínimo del número de colonias por ml de sangre (UFC/ml) a los 30, 60, 120 y 180 min, en los grupos de estudio

| | Recuento | Media | Mínimo | Máximo | Error típico de la media |
|-------------------|----------|--------|--------|--------|--------------------------|
| A. Control | | | | | |
| AC30 | 25 | 97,80 | 60 | 185 | 5,63 |
| AC60 | 25 | 155,60 | 85 | 425 | 13,43 |
| AC120 | 25 | 26,20 | 10 | 140 | 4,97 |
| AC180 | 25 | 12,80 | 5 | 45 | 1,85 |
| B. Esplenectomía | | | | | |
| AC30 | 25 | 311,60 | 170 | 420 | 13,82 |
| AC60 | 25 | 610,00 | 325 | 945 | 33,68 |
| AC120 | 25 | 329,80 | 110 | 555 | 26,21 |
| AC180 | 25 | 103,60 | 55 | 210 | 7,41 |
| C. Autotrasplante | | | | | |
| AC30 | 25 | 243,60 | 55 | 450 | 20,29 |
| AC60 | 25 | 436,80 | 225 | 725 | 25,76 |
| AC120 | 25 | 240,80 | 110 | 450 | 18,26 |
| AC180 | 25 | 74,20 | 15 | 125 | 6,84 |
| D. Trasplante | | | | | |
| AC30 | 25 | 169,00 | 75 | 260 | 11,05 |
| AC60 | 25 | 329,80 | 165 | 480 | 18,12 |
| AC120 | 25 | 152,80 | 35 | 310 | 13,16 |
| AC180 | 25 | 35,60 | 10 | 55 | 2,73 |

nectomía. Este último presenta una media superior a 300 UFC/ml. A los 60 min, los valores alcanzan los mayores resultados en los 4 grupos de estudio. A los 180 min, los grupos de estudio presentan los valores de UFC/ml más bajos. En general, el grupo control presenta los valores medios más bajos en las 4 unidades de tiempo estudiadas. Le sigue, en orden, los grupos de trasplante y autotrasplante y, por último, el grupo de esplenectomía (fig. 2).

Discusión

El trasplante esplénico experimental en ratas supone un reto para el cirujano debido a la dificultad de la técnica quirúrgica y al alto porcentaje de complicaciones: hemorragias y trombosis^{25,26}. La dificultad técnica está condicionada por el pequeño calibre de los vasos a anastomosar y la facilidad de colapso de las paredes venosas, debido a su falta de rigidez. Estas características han dado lugar a la aparición de diferentes técnicas quirúrgicas. La región cervical fue utilizada por primera vez por Heron en 1971 para la realización de un trasplante cardíaco.

En nuestro trabajo, el número de complicaciones relacionadas con la técnica quirúrgica, es decir, incidencia de trombosis y hemorragias, ha sido inferior al de los modelos experimentales clásicos^{1,2}. Hemos tenido un fallo por hemorragia y un fallo por trombosis (8% de complicaciones), es decir, un buen resultado en comparación con el resto de las publicaciones, que presentan una incidencia superior (10-30%) de complicaciones^{27,28}. Además, el tiempo quirúrgico total de trasplante en nuestro trabajo ha sido inferior (80 ± 10 min) a la media de los modelos que utilizan la cavidad abdominal ($90-110 \pm 10$ min), debido a la utilización del tutor endoluminal y a la realización de suturas continuas en las microanastomosis venosa y arterial. Esta disminución media de 20 min conseguida es importante, debido al menor tiempo de isquemia

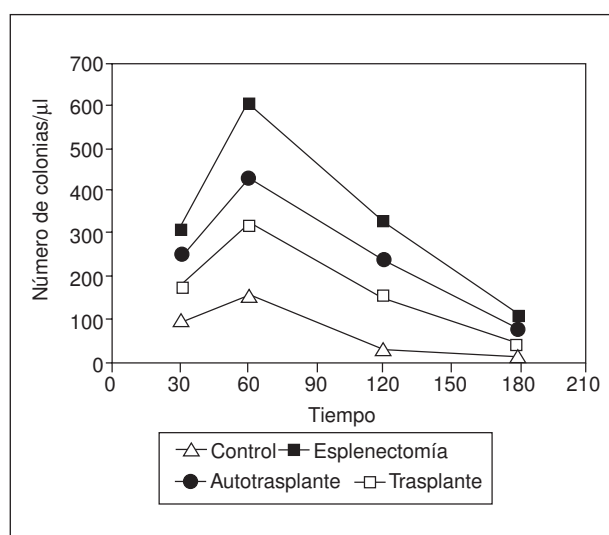


Fig. 1. Diagrama de cajas del aclaramiento bacteriano (n.º colonias/μl) en los grupos de estudio, en función del tiempo.

del bazo a trasplantar. En resumen, nuestro modelo experimental basado en la utilización de la región cervical y la microanastomosis venosa tutorizada consigue disminuir el tiempo quirúrgico respecto a la técnica clásica de trasplante esplénico en la cavidad abdominal, reducir el número de complicaciones y simplificar la técnica quirúrgica al utilizar el tutor endoluminal en la microanastomosis venosa²⁹.

Al analizar la lectura de los resultados obtenidos en el aclaramiento bacteriano, observamos que el mayor número de colonias por tiempo corresponde a los 60 min en los 4 grupos de estudio, y el menor número de colonias a los 180 min, también en todos los grupos. Estos resultados obtenidos son comunes a los del resto de los trabajos, debido a que el tiempo mínimo necesario de la respuesta inmunológica frente a las infecciones se inicia a

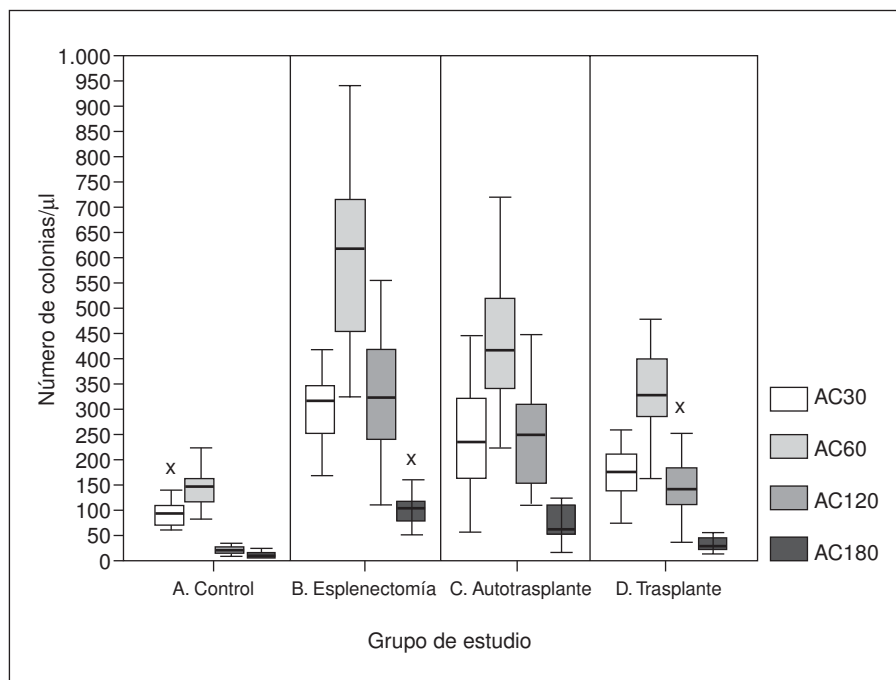


Fig. 2. Cinética del aclaramiento bacteriano en los grupos de estudio, en función de las unidades de tiempo (30, 60, 120 y 180 min).

los 60 min; el aclaramiento es mayor cuanto más tiempo transcurre desde la inoculación.

El tiempo máximo de recuento está limitado a los 180 min debido a que, a partir de las 3 h, las diferencias en el recuento del número de colonias es escaso en los 4 grupos, sin que existan diferencias en la curva de aclaramiento bacteriano en los minutos siguientes. Los estudios obtienen resultados utilizando diferentes unidades de tiempo, aunque ninguno realiza recuentos después de los 240 min por el motivo ya comentado. Realizar recuentos con unidades de tiempo más breves no está justificado, por la ausencia de resultados que puedan variar la cinética de la curva de aclaramiento bacteriano.

La curva del aclaramiento bacteriano según el número de colonias formadas por unidad de tiempo presenta los mejores resultados en el grupo control, seguido de los grupos de trasplante, autotrasplante y esplenectomía. Los resultados obtenidos en los trabajos publicados son muy diversos. Existen trabajos donde no hay diferencias en el aclaramiento bacteriano entre el grupo de esplenectomía y el grupo de autotrasplante³⁰⁻³²; sin embargo, en otros trabajos, el autotrasplante sí presenta efecto protector³³⁻³⁷. Sólo los trabajos de Patel y Scher presentan diferencias estadísticamente significativas a favor del grupo de autotrasplante. En conclusión, en nuestro estudio, el trasplante esplénico determina un efecto protector en el aclaramiento bacteriano superior al grupo de autotrasplante y esplenectomía, aunque inferior al grupo control. Estos resultados presentan diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos de estudio ($p < 0,05$).

En resumen, nuestro modelo experimental de trasplante esplénico cervical mediante anastomosis venosa tutorizada es una técnica quirúrgica viable que consigue, en el estudio del aclaramiento bacteriano de neumococos,

obtener valores próximos a la normalidad y superiores al autotrasplante esplénico.

Bibliografía

1. Lee S, Orloff MJ. A technique for splenic transplantation. *Surgery* 1969;65:436.
2. Coburn RJ. Spleen transplantation in the rat. *Transplantation* 1969; 8:86.
3. Heron I. A technique for accessory cervical heart transplantation in rabbits and rats. *Acta Path Microbiol Scand* 1971;79:366.
4. Olausson M, Mjornstedt L, Lindholm L, Bryinger H. Non-suture organ grafting to the neck vessels in rats. *Acta Chir Scand* 1984; 150:463-7.
5. Kobayasi E, Favila-Castillo L, Kamada N. Antibody formation in the transplanted spleen: a simple method of splenic transplantation in the rat using the cuff technique. *Microsurgery* 1996;17:221-5.
6. Li X-H, Suzuki H, Li X-K, Zhang X, Kawabe A, Miyamoto M, et al. Simplified cervical spleen transplantation in rats using the cuff technique. *Transplant Proc* 1994;26:2274-6.
7. Cong Z, Nongxuan T, Changfu Z, Yuanwei X, Tongde W. Experimental study on microvascular anastomosis using a dissolvable stent support in the lumen. *Microsurgery* 1991;12:67-71.
8. Pérez L, Marco L, Gómez L. Microanastomosis venosa guiada por una colateral venosa tutorizada. *Cir Esp* 1994;55:83-4.
9. Morris DH, Bullock FD. The importance of the spleen in resistance to infection. *Ann Surg* 1919;70:153-60.
10. Horan M, Colebatch JH. Relation between splenectomy and subsequent infection: a clinical study. *Arch Dis Child* 1962;37:398.
11. Singer DB. Postesplenectomy sepsis. *Perspect Pediatr Pathol* 1973; 1:285.
12. Eraklis AJ, Filler RM. Splenectomy in childhood: a review of 1413 cases. *J Pediatr Surg* 1972;7:38.
13. Fabri PJ, Metz EN, Nick WV, Zollinger RM. A quarter century with splenectomy: changing concepts. *Arch Surg* 1974;108:569.
14. Cooney DR, Dearth JC, Swanson SE. Relative merits of partial splenectomy, splenic reimplantation, and immunization in preventing postesplenectomy infection. *Surgery* 1979;86:561-9.
15. Aznar A, Moratino P, López A, Prieto A, García A, Casimiro C, et al. Tratamiento conservador de los traumatismos esplénicos. *Rev Quir Esp* 1986;13:87-92.

16. Rice HM, James PD. Ectopic splenic tissue failed to prevent fatal pneumococcal septicemia for trauma. *Lancet* 1980;15:565-6.
17. Holdsworth RJ. Regeneration of the spleen and splenic autotransplantation. *Br J Surg* 1991;78:270-8.
18. Tang WH, Wu FL, Huang MK, Fries H. Splenic tissue autotransplantation in rabbits; no restoration of host defense. *Langerbecks Arch Surg* 2003;387:379-85.
19. Maques RG, Petroiam A, Coehlo JM, Portella MCV. Regeneration of splenic autotransplants. *Ann Hematol* 2002;81:622-6.
20. Norman JC, Covelli VH, Sise HS. Transplantation of the spleen: experimental cure of hemophilia. *Surgery* 1968;64:1-16.
21. Liu L, Suisheng X. Splenic whole organ transplantation in a patient with classical hemophilia A. *Natl Med J China* 1987;67:470-1.
22. Liu L, Suisheng X, Seifert J. Transplantation of spleen cells in patients with hemophilia A. *Transpl Int* 1994;7:201-6.
23. Dor FJ, Gollackner B, Cooper DR. Can spleen transplantation induce tolerance? A review of the literature. *Transpl Int* 2003;16:451-60.
24. Bitter-Sheurmann H. Surgical aspects of spleen grafting in rats. *Eur Surg Res* 1975;7:34.
25. Moore MTF, Leong ASY, Drew PA, Kiroff GK, Jamison GG. Heterotopic autologous splenic grafts in rat. *Virchows Arch* 1986;409:693.
26. Cooley BC, Land M, Gould JS. Rat femoral vein to vein grafts as a microvascular practice model: factors that influence patency. *Microsurgery* 1991;12:43-5.
27. Suzuki H, Li X-H, Miyamoto M, Sano T, Hattori Y, Yamashita A. Induction of transplantation tolerance in adult rats by vascularized spleen transplantation. *Transplantation* 1997;64:650-65.
28. Muller GH, Wunderlich A. Spleen and vascularized skin flap transplantation. Heidelberg: A. Thiede, 1985.
29. Gómez L, Pérez L, Gómez X. Nuevo modelo experimental de trasplante esplénico en la región cervical mediante anastomosis venosa tutorizada. *Cir Esp* 2000;68:7-10.
30. Schwartz AD, Dadash-Zadeh M, Goldstein R, Luck S, Conway JJ. Antibody response to intravenous immunization following splenic tissue autotransplantation in Sprawe-Dawley rats. *Blood* 1977;49:779-83.
31. Izbicki JR, Ziegler-Heitbrock HW, Raedler C. Splenectomy does not influence outcome of pneumococcal septicemia in a porcine model. *J Trauma* 1991;31:189-95.
32. Tesluk GC, Thomas CG. Prevention of postesplenectomy pneumococcal sepsis in rats. *Surg Forum* 1979;30:35-7.
33. Grosfeld JL, Malagnoni MA. Blunt splenic trauma: a reassessment of surgical therapy based on laboratory and clinical observations. *Surg Annu* 1980;12:123.
34. Horton JA, Ogden ME, Williams S, Coln D. The importance of splenic blood flow in clearing pneumococcal organisms. *Ann Surg* 1982;195:172-6.
35. Patel JM, Williams JS, Naim JO, Hinshaw JR. The effect of site and technique of splenic tissue reimplantation on pneumococcal clearance from the blood. *J Pediatr Surg* 1986;21:877-88.
36. Moxon ER, Schwartz AD. Heterotopic splenic autotransplantation in the prevention of *Haemophilus influenzae* meningitis and fatal sepsis in Sprawe-Dawley rats. *Blood* 1980;56:842-5.
37. Fasching MC, Cooney DR. Reinmunization and splenic autotransplantation: a long-term study of immunologic response and survival following pneumococcal challenge. *J Surg Res* 1980;28:449-59.