

UTILIDAD DE LA ECMO SOBRE EL INJERTO PULMONAR DISFUNCIONANTE EN UN MODELO PORCINO ESTANDARIZADO DE TRASPLANTE UNIPULMONAR

F.J. González García¹, A. Álvarez Kindelán¹, M.M. Granados Machuca², S. Quirós Carmona², T. Caro Cuenca³, A. Sanz Zorrilla³, I. Carmen Rodríguez García⁴, A. Jurado Morata⁵, M.A. Calzado Canale⁶, P. Moreno Casado¹.

¹UGC Cirugía Torácica y Trasplante Pulmonar. Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba.

²Hospital Clínico Veterinario. Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales. Córdoba.

³UGC Anatomía Patológica. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

⁴UGC Anestesia y Reanimación. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

⁵Coordinación de Trasplantes. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

⁶GCO4 Inflamación y Cáncer. IMBIC. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba.

Proyecto financiado con la Beca Neumosur nº15/2015 y con la Beca de la Fundación Progreso y Salud nº0296-2014.

RESUMEN

Objetivo: Establecer un modelo de muerte encefálica y trasplante pulmonar y analizar el posible papel protector del oxigenador de membrana extracorpóreo (ECMO).

Métodos: Se emplearon 20 cerdos hembras, 10 donantes y 10 receptoras. Las receptoras del Grupo A (n = 5) fueron sometidas a un trasplante unipulmonar izquierdo (Tx-UPI) sin ECMO. Las receptoras del Grupo B (n = 5) se sometieron a un Tx-UPI con ECMO venoarterial (ECMO-VA). Se recopilaron datos funcionales e histológicos en situación basal, a los 10 minutos de clampar el hilio derecho (Tiempo 1) y a las 2 horas (Tiempo 2). Se analizó la expresión proteica de marcadores de inflamación y de la ruta de hipoxia.

Resultados: El modelo de muerte encefálica empleado, seguido de un tiempo de isquemia frío prolongado (20 horas) dio lugar a la aparición de un edema pulmonar severo. Tras el implante, 3 receptores del grupo A sobrevivieron hasta el Tiempo 2, falleciendo 2 por edema pulmonar masivo. Por el contrario, todos los animales del Grupo B sobrevivieron, siendo la PaO₂ en ese momento de 462,72 mmHg. Hubo un incremento de la expresión de IL6, TNF, PCR, AC IX y el VEGF, así como un descenso en la expresión de IL8 y GLUT1, al usar la ECMO.

Conclusiones: Se ha desarrollado un modelo porcino estandarizado y reproducible de muerte encefálica, que simula el proceso clínico de la donación pulmonar. Este modelo puede servir de plataforma para investigar posibles dianas terapéuticas.

Palabras clave: Trasplante pulmonar, disfunción primaria del injerto, circulación extracorpórea, oxigenador de membrana extracorpóreo (ECMO), muerte encefálica.

ABSTRACT

Objective: Establish a model of brain death and lung transplantation and analyze the possible protective role of extracorporeal membrane oxygenation (ECMO).

Methods: 20 female pigs were used, 10 donors and 10 recipients. Group A recipients (n = 5) underwent left-sided single-lung transplantation (LUCT-Tx) without ECMO. Group B recipients (n = 5) underwent ICU-Tx with venoarterial ECMO (VA-ECMO). Functional and histological data were collected at baseline, 10 minutes after clamping the right hilum (Time 1) and 2 hours (Time 2). Protein expression of inflammation markers and the hypoxia pathway was analyzed.

Results: The brain death model used, followed by a prolonged cold ischemia time (20 hours) gave rise to the appearance of severe pulmonary edema. After implantation, 3 group A recipients survived until Time 2, with 2 dying from massive pulmonary edema. In contrast, all the animals in Group B survived, with PaO₂ at that time being 462.72 mmHg. There was an increase in the expression of IL6, TNF α , CRP, AC IX and VEGF, as well as a decrease in the expression of IL8 and GLUT1, when using ECMO.

Conclusions: A standardized and reproducible porcine model of brain death has been developed, which simulates the clinical process of lung donation. This model can serve as a platform to investigate possible therapeutic targets.

Keywords: Lung transplant, primary graft dysfunction, extracorporeal circulation, extracorporeal membrane oxygenator (ECMO), brain death.

INTRODUCCIÓN

El trasplante pulmonar (TP) representa el único tratamiento eficaz para diversas patologías respiratorias crónicas en situación terminal. Los experimentos animales llevados a cabo por Vladimir Demikhov y Henri Metras¹ en

los años 40 y 50, permitieron demostrar que la técnica era posible. Sin embargo el primer TP clínico no se realizó hasta 1963. Aunque inicialmente la evolución clínica post-trasplante fue satisfactoria, el paciente finalmente falleció 18 días después por malnutrición y disfunción renal. Desde 1963 hasta 1978 apenas se realizaron algunos intentos más, con resultados desastrosos como

Recibido: 09.03.2021 Aceptado: 07.04.2021

Dr. Francisco Javier González García
haviergonzalez@outlook.com

consecuencia de la alta incidencia de complicaciones de la sutura de la vía aérea y a la aparición de rechazo. En el año 1972 se descubrió casualmente el efecto inmunosupresor de la ciclosporina y, paralelamente, se desarrolló la técnica de la circulación extracorpórea ("máquina corazón-pulmón"). Estos dos descubrimientos permitieron incrementar significativamente la supervivencia post-trasplante. Así, en el año 1981 se realizó con éxito el primer trasplante cardiopulmonar³; en 1983, el primer trasplante unipulmonar⁴; y en 1986, el primer bipulmonar en bloque⁵. A partir de entonces se produjo un incremento exponencial en el número de TP realizados en el mundo, hasta llegar a las cifras actuales que superan los 4500 procedimientos anuales⁶.

La escasez de donantes pulmonares supone el principal freno al número de TP que se pueden realizar, de forma que los pacientes en lista de espera superan con creces a los donantes pulmonares válidos. Actualmente, la principal fuente de injertos pulmonares siguen siendo los donantes en muerte encefálica y, de estos, solo un 10-15% proporcionan pulmones válidos para el trasplante, comparado con otros órganos sólidos como el riñón o el hígado (88%) o el corazón (30%)⁷. La razón de disparidad reside en la especial vulnerabilidad del pulmón a los mecanismos fisiológicos y a los diferentes eventos que tienen lugar en los momentos previos a que tenga lugar la muerte encefálica, e inmediatamente después de producirse ésta.

La disfunción primaria del injerto (DPI) es una forma de distrés respiratorio/daño alveolar difuso que tiene lugar en las primeras horas-días tras el TP, y representa la primera causa de muerte en los primeros 30 días del TP^{8,9}. Se trata de un daño del injerto de origen multifactorial, en la que influyen tanto factores del donante como del receptor, y clínicamente se manifiesta como un empeoramiento de la oxigenación secundario a la aparición de infiltrados alveolares difusos¹⁰. Puesto que el tratamiento consiste solo en medidas de soporte, la clave en el manejo de la DPI es la prevención de su aparición¹¹. Entre las medidas preventivas destacan la reducción del tiempo de isquemia en frío, la reperfusión controlada del injerto^{12,13}, la ventilación protectora, o la administración de prostaglandinas junto con la solución de preservación. Se ha sugerido también que la utilización de soporte circulatorio extracorpóreo previo a la reperfusión pudiera ser beneficioso, al reducir el flujo por la circulación pulmonar. El oxigenador de membrana extracorpóreo (ECMO) es una modalidad de soporte mecánico cardiopulmonar que presenta como ventajas respecto a la circulación extracorpórea convencional menor necesidad de anticoagulación, menor desarrollo de respuesta inflamatoria sistémica, y menores necesidades

de transfusión^{14,15}.

La investigación con modelos experimentales es clave en el TP. El modelo de TP ortotópico porcino tiene como ventajas la semejanza anatómica con el pulmón humano, así como la simulación del sistema inmune, puesto que las células epiteliales bronquiales y endoteliales porcinas expresan constitutivamente antígenos de clase HLA-II, lo que potencia la traslacionalidad entre el modelo animal y la clínica. No obstante, cabe destacar que la mayoría de modelos de TP porcino empleados hasta la actualidad se han basado en el uso de 2 tipos de donantes: a) simplemente anestesiados, no en muerte cerebral; y b) donación en asistolia tipo III.

El pulmón es especialmente vulnerable a desarrollar un daño tras la reperfusión en el trasplante, debido a su rica vascularización y amplia superficie en la que los componentes sanguíneos pueden interactuar con el endotelio vascular. Tras la reperfusión se produce un notable incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias¹⁶. Por otro lado, se ha demostrado que la hipoxia puede contribuir a la patogénesis del daño pulmonar agudo¹⁷, y la DPI es una forma de distrés respiratorio.

Dadas las potenciales complicaciones pulmonares asociadas al uso de la circulación extracorpórea convencional (CEC), y al uso cada vez más extendido de la ECMO para el manejo del distrés respiratorio, se plantea el uso de la ECMO intraoperatoria en sustitución de la CEC como soporte durante el TP. Por tanto, el objetivo principal del presente trabajo fue analizar si existe algún beneficio en el uso de la ECMO intraoperatoria como soporte cardio-respiratorio, en un modelo porcino de muerte encefálica y trasplante unipulmonar izquierdo empleando un injerto pulmonar con un DPI severo. Como objetivos secundarios se planteó la posible identificación de biomarcadores indicadores de la gravedad de la DPI, con potencial uso como dianas terapéuticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales:

Se emplearon 20 cerdos hembras de unos 40 kg de peso, sometidos a un ayuno para sólidos de 12 horas y, para líquidos, de 2 horas, previamente a los experimentos. Los animales fueron mantenidos en condiciones óptimas de estabulación establecidas por el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba y la normativa legal vigente (R.D. 53/2013, de 1 de febrero). Asimismo, el proyecto fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba y por la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía.

Grupos experimentales:

Se utilizaron 20 cerdos hembras sanas. 10 se emplearon como donantes y, las otras 10, como receptoras. Transcurridos 90 minutos de la inducción de la muerte encefálica, se llevó a cabo la extracción del bloque cardiopulmonar y, tras realizar la cardiectomía y la perfusión pulmonar retrógrada, se preservó el bloque bipulmonar a 4°C durante 20 horas. En las receptoras, el trasplante consistió en un trasplante unipulmonar izquierdo, seguido de un clampaje en bloque del hilio pulmonar derecho 1 hora después de la reperfusión (**Figura 1**). Las cerdas receptoras se dividieron en 2 grupos, 5 animales que fueron sometidas a un trasplante sin soporte intraoperatorio con ECMO venoarterial (ECMO-VA) (Grupo 1), y las otras 5 a las que se les realizó el TP con soporte con ECMO-VA (Grupo 2). La estrategia de ventilación mecánica en ambos grupos fue la misma, consistente en una ventilación protectora empleando volúmenes corriente bajos (5 mL/kg). Se tomaron determinaciones funcionales al reperfundir el injerto (Basal) los 10 minutos del clampaje del hilio derecho (Tiempo 1, ambos grupos), y 2 horas después (Tiempo 2, sólo en el Grupo 2)

Modelo porcino de muerte encefálica:

Anestesia

Se colocó al animal en decúbito dorsal. Mediante arteriotomía se colocó un catéter arterial (Seldicath 4F, Prodimed; Le Plessis Armand, Francia) en la arteria femoral derecha para monitorizar la presión arterial de forma invasiva. En la vena yugular interna derecha se colocó una vía venosa para administración de fármacos y fluidos, así como un catéter Swan Ganz pediátrico de 5.5Fr (Swan-Ganz 631F55, Edwards Lifesciences Services GmbH; Unterdchleissheim, Alemania). Se monitorizó la diuresis mediante catéter vesical con sonda de Foley de 8-Fr (Palex Medical SA; Barcelona, España), y se monitorizó la profundidad anestésica mediante índice bispectral (BIS). La premedicación anestésica consistió en Ketamina 10 mg/Kg (Ketavet, Pharmacia&Upjohn Upsala, Suecia) + Midazolam 0,5 mg/Kg (Normon, Madrid-España) + Xilacina 1mg/kg intramuscular (Xilagesic. Para la inducción anestésica se empleó Propofol 2 - 6 mg/Kg (Diprivan®, AstraZeneca) y Fentanilo 5 mcg/Kg (Fentanest®, Kern Pharma; Barcelona-España) intravenosos, mientras que el mantenimiento se realizó con Sevoflurano vehiculado en oxígeno 100% mediante circuito cerrado y Fentanilo (0,004 mg/Kg/min). Los animales fueron intubados por vía endotraqueal empleando un tubo de 8 Ch (Rüsch, Kern-Alemania) y ventilados con presión positiva intermitente para mantener normocapnia. Los parámetros ventilatorios fueron: volumen tidal 6 - 8 ml/kg; Fracción inspirada de oxígeno (FiO2) 50 - 100%; relación inspiración-espирación 1: 2; presión positiva al final de la espiración (PEEP) 8-10 cm H2O; Presión parcial de oxígeno (PAO2); y se ajustó

la frecuencia respiratoria para mantener una PaCO2 <50 mmHg.

Muerte encefálica

Tras la inducción y mantenimiento de la anestesia, se procedió a realizar una esternotomía media. Tras abrir ambas pleuras y el pericardio, se procedió a ligar secuencialmente, en intervalos de 5 minutos, todos los troncos supraaórticos. Finalmente, se reemplazó el catéter de la vena yugular por otro en la vena cava inferior, y se ligó la vena cava superior, logrando así la interrupción completa del flujo sanguíneo a la cabeza. Esto se constató en todos los casos mediante la caída abrupta en el voltaje del BIS. 30 minutos tras la ligadura en bloque de los troncos supraaórticos, se realizó un test de atropina para constatar el estado de muerte encefálica. Para ello, se administró un bolo de atropina por vía intravenosa, tras lo cual se comprobó una ausencia de incremento de la frecuencia cardíaca superior al 10% respecto a la frecuencia basal.

Extracción bloque cardiopulmonar

A los 90 minutos de la inducción de la muerte encefálica, se procedió a realizar la extracción cardiopulmonar. Para ello, se colocó una cánula de 18 F en el tronco de la arteria pulmonar. Seguidamente, se administró heparina en bolo a través de la vía central (20000 UI), así como 250 ug de Prostaglandina E1 (PGE1) (Alprostadi® 500 mcg/ml, Pfizer Manufacturing Belgium NV/SA, Bélgica) lentamente y a través de la cánula pulmonar. Tras clampar la aorta ascendente y la vena cava inferior, se seccionó la orejuela izquierda para drenar la solución de preservación y se inició la perfusión pulmonar por vía anterógrada con 50mL/kg de Perfadex® (Vitrolife, Gotenburgo-Suecia) suplementado con 0,3 mL/L de buffer Tris/THAM. Se abrieron ambas pleuras y se rellenaron de hielo pilé, manteniendo en todo momento la ventilación mecánica con una FiO2 al 50%. Al finalizar la perfusión pulmonar, se procedió a extraer el bloque cardiopulmonar según la técnica habitual, dejando los pulmones insuflados aproximadamente a la mitad. Posteriormente, en una mesa auxiliar, se realizó una perfusión pulmonar por vía retrógrada, administrando unos 200 mL por cada vena pulmonar. Finalmente, se cubrieron los pulmones con un paño y se introdujeron en una bolsa de plástico rellena de Perfadex®, almacenándolos a 4°C durante 20 horas.

Técnica del trasplante unipulmonar en el receptor:

La preanestesia y la inducción anestésica de los receptores se realizó de la misma forma que con los cerdos donantes. En el cerdo receptor, se practicó una incisión de Clamshell, se disecó el hilio pulmonar izquierdo y se aisló cada estructura vascular (tronco de

la arteria pulmonar, venas pulmonares superior e inferior izquierda) con ligadura de lino del n. 1 (Linatrix, B. Braun Surgical SA; España). Se procedió entonces a explantar el pulmón izquierdo nativo, tras seccionar el bronquio principal y reemplazando la ventilación orotraqueal por una traqueotomía, recolocando el tubo traqueal en el bronquio principal derecho bajo visión directa, con cuidado de no ocluir el bronquio traqueal derecho. Seguidamente se procedió a realizar las 3 anastomosis, siguiendo el orden 1º Bronquio; 2º Arteria Pulmonar; 3º Aurícula izquierda. La sutura bronquial se realizó de forma continua con PDS de 4/0 (PDSTM II, Ethicon® LLC; Johnson&Johnson International. Hamburgo, Alemania); Las anastomosis tanto de la arteria pulmonar como de la aurícula izquierda se hicieron de forma continua con polipropileno (Prolene™, Ethicon® LLC; Johnson&Johnson International. Hamburgo, Alemania) de 5/0 y 4/0 respectivamente. Para la reperusión del injerto, se abrió el clamp de la arteria pulmonar, seguido del de la aurícula izquierda, a través de la cual se realizó la purga de aire. Se llevó a cabo una reperusión controlada, manteniendo el clamp de la arteria pulmonar abierto al 50% durante 10 minutos. La ventilación del injerto comenzó durante la reperusión del mismo, empleando una estrategia ventilatoria estándar. Una hora después de la reperusión, se clampó en bloque el hilio pulmonar derecho, para provocar un edema del injerto por hiperflujo. Finalizado el procedimiento, se procedió a eutanasiar a los animales mediante la administración de cloruro potásico intracardiaco.

Manejo de la ECMO

A los animales del Grupo 2 se les realizó un trasplante unipulmonar izquierdo con soporte intraoperatorio con ECMO venoarterial (ECMO-VA), empleando el sistema de bypass Rotaflow de Maquet (Getinge AB, Gotemburgo-Suecia), con el oxigenador de fibra hueca Quadrox PLS (Getinge AB, Gotemburgo-Suecia) con calentador de gases incorporado. Tras la toracotomía tipo Clamshell y la sección del pericardio, se canularon la aorta ascendente (Maquet HLS 22F, punta curva) y la vena cava inferior (Maquet HLS 32Fr, Single Stage). Para el cebado de la máquina se empleó Ringer Lactato (200 mL), estableciendo un flujo del 50% del gasto cardiaco. Para el ajuste de las dosis de heparina se empleó el ACT (activating clotting time), que se midió periódicamente y se ajustó según el flujo del circuito. El soporte con ECMO-VA se realizó durante el implante y se prolongó en el post-trasplante durante 2 horas más. Transcurrido este tiempo, se obtuvieron determinaciones funcionales (Tiempo 2) y se procedió a sacrificar al animal, retirando en primer lugar la oxigenación a través de la ECMO, y posteriormente reduciendo el flujo de forma gradual.

Determinaciones:

Se comparó la función del injerto en ambos grupos mediante la medición de la oxigenación, la presión arterial pulmonar, y el contenido pulmonar de agua extravascular (cociente húmedo/seco). Todas las muestras gasométricas se obtuvieron de la vía arterial femoral. Se monitorizaron de forma continua la frecuencia cardiaca, el gasto cardiaco, la presión arterial sistémica, la oxigenación, la presión venosa central y la presión arterial pulmonar, así como la diuresis. Las muestras tisulares se obtuvieron del borde libre del lóbulo inferior izquierdo. Para el cálculo del ratio húmedo-seco se empleó un fragmento del injerto obtenido igualmente de borde libre del mismo; las muestras fueron pesadas y después introducidas en una estufa a -60°C. El contenido pulmonar de agua se calculó a las 24 horas y 96 horas aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Agua tisular} = [(Peso \text{ húmedo} - Peso \text{ seco}) / Peso \text{ húmedo}] \times 100$$

Se registraron igualmente la presión media de la vía aérea (cmH₂O) y la presión pico de la vía aérea (cmH₂O), en función del volumen tidal (mL/Kg) y PEEP aplicadas. El lóbulo cardiaco del pulmón derecho se preservó a 80°C para el estudio de la expresión proteica de los marcadores de inflamación e hipoxia, así como para el estudio histopatológico. Los fragmentos del injerto pulmonar procedentes de los 3 tiempos de estudio se preservaron a -80°C para el estudio de la expresión proteica de los marcadores de inflamación e hipoxia. Para los estudios de expresión proteica, las muestras pulmonares preservadas a -80°C se compararon con los fragmentos de pulmón derecho no implantados (controles). A cada fragmento de unos 60 mg de peso se le añadieron 300 ml del buffer de extracción de proteínas (50mM Tris-HCl pH7,5, 150mM NaCl, 10% Glicerol, 10% NP-40, 10% ortovanadato de sodio) conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasa. Tras homogenizar las muestras (Ultraturrax T10), fueron incubadas 15 minutos en hielo, siendo centrifugadas a continuación durante otros 15 minutos a 12.000 revoluciones por minuto (r.p.m). Las proteínas obtenidas en el sobrenadante fueron cuantificadas mediante espectrofotometría (Genesis 10uv, Thermo Scientific). Seguidamente, se añadió buffer laemli y se incubaron 2 min a 95°C. Para realizar los western blot se incubaron las membranas con el anticuerpo primario a 4°C durante toda una noche; tras 3 lavados breves, se incubaron con el anticuerpo secundario. Finalmente, después de otros 3 lavados breves, se detectó la expresión proteica empleando el Alpha Innotech detection system (Alpha Innotech Corp., San Leandro-CA, USA). Se analizó la intensidad de las bandas utilizando el software Image J 1.46r software (National Institutes of Health, Estados Unidos), comparando la expresión proteica en el pulmón

implantado en cada grupo y respecto a los controles. Para la ruta de inflamación se emplearon como anticuerpos el factor de transcripción tumoral alfa (TNF α), la interleuquina 6 (IL6), la interleuquina 8 (IL8) y la proteína C reactiva (PCR); para estudiar la ruta de hipoxia, se emplearon los anticuerpos Factor 1 inducible por hipoxia alfa (HIF1 α), el transportador de glucosa cerebral de tipo 1 (GLUT1), la anhidrasa carbónica IX (AC IX) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Estadística:

Para el estudio estadístico se empleó el programa GraphPad Prism 8 para Mac. Los resultados numéricos se expresaron como medias \pm DE. Para variables de estudio tipo proporciones se muestran las diferencias, que se presentaron en forma de porcentajes. Se consideraron como significativos valores de $p < 0,05$. Se empleó el test de Mann-Whitney no paramétrico para comparar variables numéricas y el test exacto de Fischer para comparar variables categóricas.

Abreviaturas y acrónimos:

- ACT-Activating clotting time
- AC-IX-Anhidrasa carbónica IX
- BIS-Índice biespectral
- CEC-Circulación extracorpórea
- cmH2O-centímetros de agua
- DPI-Disfunción primaria del injerto
- ECMO-Oxigenador de membrana extracorpóreo
- FiO2-Fracción inspirada de oxígeno
- GLUT1-Transportador de glucosa 1
- HCL-ácido clorhídrico
- HIF1 α - Factor 1 inducible por hipoxia alfa
- HLAII-Antígenos de histocompatibilidad clase II
- IL6-Interleuquina 6
- IL8-Interleuquina 8
- mM-milimolar
- mmHg-milímetros de mercurio
- NaCl-Cloruro sódico
- NP40-detergente NP40
- PaCO2-Presión arterial de dióxido de carbono
- PaO2-Presión arterial de oxígeno
- PCR-Proteína C Reactiva
- PEEP-Presión positiva al final de la espiración
- PGE1-Prostaglandina E1
- Rpm-revoluciones por minuto
- TNF α -Factor de necrosis tumoral alfa
- TP-Trasplante pulmonar
- VEGF α -Factor de crecimiento endotelial alfa

RESULTADOS

Se emplearon un total de 10 cerdos hembras como donantes, y 10 como receptoras, como se muestra en la **Figura 1**. Un animal donante falleció inmediatamente tras la inducción de la muerte cerebral por inestabilidad hemodinámica severa, desarrollando una taquicardia ventricular sostenida, por lo que no fue posible extraer el bloque bipulmonar, así como tampoco llevar a cabo el análisis hemodinámico ni los estudios expresión proteica.

Inducción de la muerte cerebral y manejo del donante

En la **Tabla 1** se muestran los principales resultados de la inducción de la muerte cerebral. La ligadura en bloque de los troncos supraaórticos se acompañó de una caída dramática en el registro del BIS, situándose por debajo de 20 en todos los casos. El test de atropina fue negativo igualmente 9 de los 10 donantes, de forma que la administración de un bolo iv de atropina no se acompañó de una modificación de la frecuencia cardiaca superior al 10%.

Extracción pulmonar y preservación

No ocurrieron complicaciones debidas a la perfusión pulmonar, extracción del bloque bipulmonar ni la preparación del injerto en el trabajo de banco. La temperatura del injerto se mantuvo en todos los casos por debajo de 8°C durante la preservación en frío.

En cuanto al contenido pulmonar de agua, como se puede comprobar en la **Tabla 2**, todos los animales desarrollaron edema pulmonar tras la inducción de la muerte cerebral, estando el contenido tisular de agua por encima del 80% en todos los casos. Morfológicamente, todas las muestras pulmonares analizadas presentaron un edema pulmonar significativo (**Figura 2**).

Parámetros funcionales y supervivencia

El procedimiento quirúrgico del implante pulmonar se llevó a cabo sin desarrollarse complicaciones mayores, en ambos grupos. Tras el implante, 3 receptores del grupo A sobrevivieron hasta el Tiempo 2, falleciendo los otros 2 por edema pulmonar masivo. Por el contrario, todos los animales del Grupo B sobrevivieron, siendo la PaO2 en ese momento de 462,72 mmHg. Los parámetros respiratorios y hemodinámicos de los receptores se muestran en la **Figura 3**. En el Grupo B, la presión pico de la vía aérea y la presión plateau fueron inferiores respecto al Grupo A, mientras que hubo una tendencia hacia un mayor GC y EtCO2, aunque estas diferencias no fueron significativas.

Expresión pulmonar de parámetros inflamatorios y de la ruta de hipoxia

En la **Figura 4** se muestran los resultados del análisis de la expresión proteica de los parámetros inflamatorios

y de la ruta de hipoxia. En cuanto al estado inflamatorio, el empleo intraoperatorio de la ECMO se asoció a un incremento de la expresión de IL6, TNF α y la proteína C reactiva, así como a un descenso en la expresión de IL8. Respecto a la ruta de hipoxia, el empleo de ECMO se asoció a un descenso en la expresión de GLUT1, y a un incremento en la expresión de la AC IX y el VEGF. No se detectó expresión de HIF1 α en ninguna de las muestras analizadas.

Figura 1. Esquema global del protocolo experimental. Para cada procedimiento, se emplearon dos animales (donante pulmonar y receptor de trasplante pulmonar). Al animal donante se le indujo la muerte encefálica mediante ligadura en bloque de los troncos supraaórticos, seguido de un mantenimiento durante 90 minutos, tras lo cual se extrajo el bloque bipulmonar que se preservó en frío durante 20 horas. El cerdo receptor fue sometido a una neumonectomía izquierda, seguida de un trasplante unipulmonar ipsilateral (TX UPI). Tras la reperusión del injerto, se llevó a cabo un mantenimiento durante las siguientes 2 horas. Las flechas representan los principales tiempos del estudio. Muerte cerebral se refiere al momento final del manejo del donante; Isquemia indica el final del periodo de preservación en frío; Tiempo 1 es a los 10 minutos de la reperusión del injerto; Tiempo 2, a los 10 minutos del clampaje del hilio derecho; Tiempo 3, a las 2 horas del soporte con ECMO-VA (en el Grupo 3, exclusivamente).

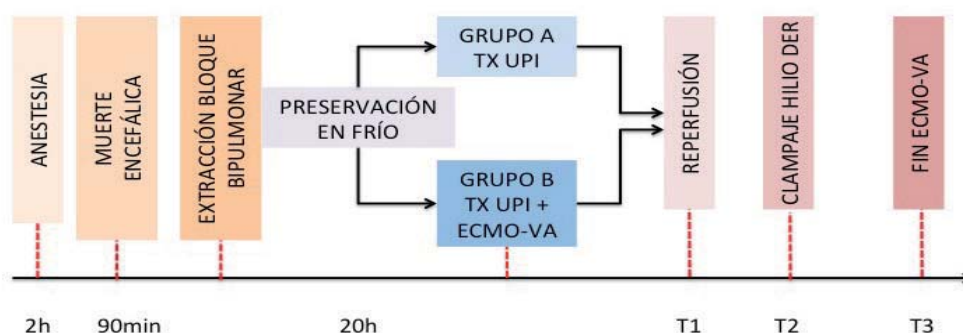


Tabla 1. Datos de los donantes: inducción de la muerte cerebral y mantenimiento del donante pulmonar.

Donante	Clampaje	BIS-pre	BIS-post	TS-pre	TS-post	ICS-pre	ICS-post	FC-pre	FC-post	Inicio extracción pulmonar
1	12:35	64	2	6	94	94	86	88	87	14:25
2	11:15	51	0	0	100	94	100	141	141	13:13
3	11:50	70	0	0	99	100	100	100	97	14:00
4	12:05	33	9	25	92	100	100	198	195	13:57
5	12:02	63	1	0	97	90	89	136	104	14:00
6	11:48	56	20	2	53	91	100	135	137	13:51
7	11:30	77	0	0	100	95	100	106	108	13:40
8	12:30	83	0	2	55	100	90	149	149	14:08
9	12:30	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	94	92	14:35

BIS: Análisis biespectral; TS: Tasa de supresión; ICS: Índice de calidad de señal del monitor del BIS. FC: Frecuencia cardiaca.

Tabla 2. Cociente húmedo/seco de las muestras pulmonares de los donantes.

Donantes	Peso basal (muestra - 80°C)	Peso 24h	Peso 96h	Contenido pulmonar agua 24h	Contenido pulmonar agua 96h
1	132,2	19,5	20,3	85,25%	84,64%
2	172,3	14,7	13,8	91,4%	92%
3	143,7	5,8	5,1	95,96%	96,45%
4	290,9	16,7	15,5	94,25%	94,67%
5	117,4	2,8	1,9	97,55%	98,33%
6	117,4	6,6	5,9	94,37%	94,97%
7	139,8	7,1	5,2	94,92%	96,28%

Los pesos se expresan en miligramos. Peso basal: a -80°C. Para el cálculo del contenido tisular de agua se empleó la fórmula: % Agua tisular = [(Peso húmedo-Peso seco)/Peso húmedo] x 100. Se determinó el contenido tisular de agua a +60°C tanto a las 24 horas como a las 96 horas.

Figura 2. Parámetros respiratorios y hemodinámicos de los receptores de trasplante pulmonar. EtCO₂: Concentración de CO₂ espirado; GC: gasto cardiaco; RVP: resistencias vasculares periféricas; SatO₂: saturación de oxígeno; PAP: presión arterial pulmonar (s=sistólica, m=media, d=diastólica).

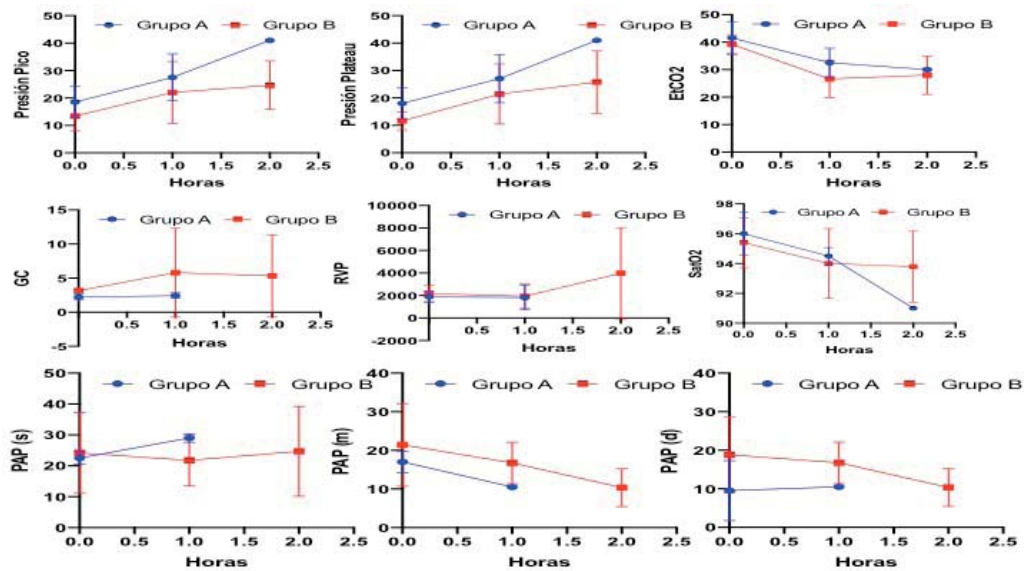


Figura 3. Imágenes representativas del estudio histológico del pulmón del donante n.4. Tinción hematoxilina-eosina. **A:** a 100 aumentos. **B:** a 200 aumentos. Edema alveolar, acúmulo de material discretamente eosinófilo, principalmente intraalveolar e intersticial focal. Engrosamiento fibrosos de tabiques alveolares.

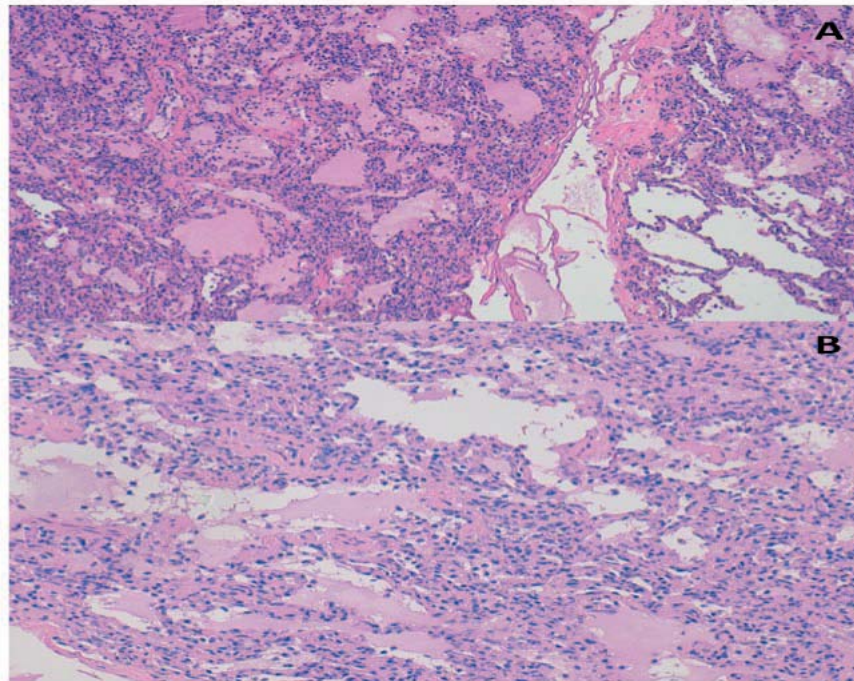
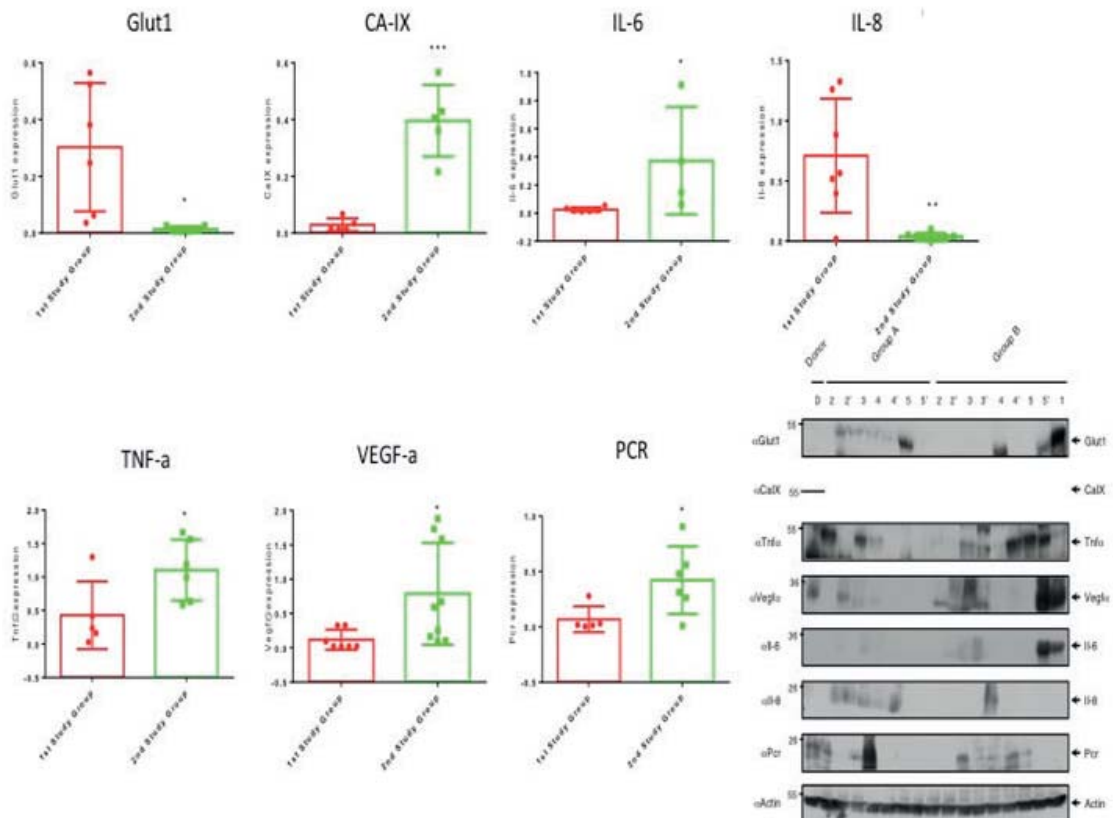


Figura 4. Resultados del análisis de expresión proteica por western-blot. Se utilizó un donante como control de ambos grupos de receptores. En los receptores, se emplearon varias muestras del mismo receptor (número con superíndice). GLUT1: Transportador de glucosa 1; CA-IX: anhidrasa carbónica IX; IL6: interleuquina 6; IL8: interleuquina 8; TNF α : factor de necrosis tumoral alfa; VEGF α : Factor de crecimiento endotelial alfa, PCR: proteína C reactiva. 1st study group: Grupo A. 2nd study group: Grupo B. El uso de ECMO (Grupo B) se asoció a un incremento significativo en la expresión de marcadores de inflamación (IL6, AC-IX, TNF α , VEGF α y la PCR, así como a una menor expresión de IL8 y GLUT1.



DISCUSIÓN

Este trabajo describe un modelo porcino de muerte encefálica, con donación pulmonar, preservación estática fría y trasplante unipulmonar, que simula de forma fiable el entorno clínico. Además, se trata de un modelo traslacional, en el que se han investigado posibles nuevos biomarcadores del daño pulmonar.

Históricamente, los modelos experimentales de trasplante pulmonar empleaban como donantes animales simplemente anestesiados, con lo que no se podían extrapolar conclusiones clínicas en cuanto al proceso de muerte cerebral. Por otro lado, la mayoría de estudios que han abordado la investigación del proceso de muerte cerebral en animales, se han basado en el incremento de presión intracraneal mediante una expansión del tejido supratentorial¹⁸⁻²⁰, la decapitación²¹, o la inducción de una hemorragia intracraneal²². Por otro lado, Nuestro trabajo es el primero en la literatura en describir un modelo de inducción de muerte encefálica mediante la ligadura en bloque de los troncos supraaórticos, simulando un accidente vascular cerebral tipo isquémico y masivo. Los signos clínicos de muerte encefálica se hicieron evidentes desde el mismo instante de la interrupción del flujo sanguíneo al cerebro, tal y como se constató en el registro del análisis biespectral y el test de atropina.

Al igual que otros autores, el procedimiento quirúrgico en los receptores consistió en un trasplante unipulmonar izquierdo. El pulmón derecho posee peculiaridades anatómicas que añaden excesiva complejidad a la cirugía. Se monitorizaron parámetros hemodinámicos y respiratorios inmediatamente tras la reperusión del injerto, puesto que la disfunción primaria del injerto puede ser causada por una deficiente preservación pulmonar. Por este motivo, se realizó una reperusión controlada durante 10 minutos, manteniendo la perfusión del pulmón al 50% aproximadamente gracias a una apertura parcial del clamp de la arteria pulmonar. Se reinició la ventilación del injerto empleando una estrategia de ventilación protectora, para evitar el daño pulmonar asociado a la ventilación mecánica. Además, el Grupo B fue asistido durante el trasplante con el oxigenador de membrana extracorpóreo en modalidad veno-arterial (ECMO-VA). Con ello, se llevó a cabo una reperusión controlando el flujo a través de la arteria pulmonar de forma gradual, puesto que parte del flujo es derivado al circuito de la ECMO.

Se analizó la función del injerto pulmonar tras ligar el hilio contralateral. Con esta maniobra, el pulmón recién implantado es sometido a la totalidad del gasto cardiaco. Esto dio lugar al fallecimiento de todos los animales del grupo control (Grupo A), en línea con lo publicado por otros autores²³⁻²⁵.

El análisis de la expresión proteica sugiere la activación de un estado pro-inflamatorio con el uso de la ECMO durante el trasplante pulmonar. Así, se detectó un incremento en la expresión del TNF α , VEGF α , la PCR y la CA-IX así como una menor expresión de Glut1 e IL8. El TNF α es una citoquina proinflamatoria que amplifica la inflamación y juega un papel central tanto en la defensa como en el rechazo del pulmón trasplantado. Por otro lado, se ha demostrado que la expresión de VEGF α y la ruta de hipoxia mediada por HIF1 α se asocian a la aparición de rechazo crónico pulmonar²⁶. Aunque los circuitos actuales de ECMO poseen claras ventajas respecto a la CEC, el inicio del soporte con ECMO se asocia a una respuesta inflamatoria inmediata y compleja, similar a la que ocurre en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)²⁷.

Este trabajo presenta algunas limitaciones. La primera, el tamaño muestral. Este tipo de trabajos experimentales son costosos, lo cual restringe el acceso a los mismos. Se emplearon 20 animales para reproducir el entorno clínico, puesto que casi todo el importe del presupuesto fue destinado a los animales y al material fungible de la ECMO. Además, aunque el modelo es reproducible y posee escasa variabilidad, no deja de ser un modelo animal, de forma que existen diferencias entre los animales (un donante falleció por inestabilidad hemodinámica y arritmias severas).

En conclusión, el modelo animal de inducción de muerte encefálica mediante ligadura en bloque de los troncos supraaórticos es el primero en publicarse hasta la fecha. Se trata de un modelo que simula perfectamente el entorno de la donación pulmonar en muerte encefálica. El empleo de la ECMO como soporte intraoperatorio se asocia a una activación de la cascada inflamatoria, pero permite la supervivencia de los animales respecto al grupo control. Esto puede servir de plataforma para investigar posibles dianas terapéuticas en el futuro.

Agradecimientos: los autores quieren reconocer el excelente trabajo realizado por las anestesistas Valle Blázquez Ruiz y Agustina Jiménez Castilla, los cirujanos Francisco Javier Algar Algar y Carlos Baamonde Laborda, y los perfusionistas Agustín Elías Fuentes y Bibián Ortega Lopera, en su inestimable ayuda técnica y apoyo material para este proyecto.

Conflicto de intereses: los autores declaran no haber recibido ningún tipo de financiación económica por parte de la industria farmacéutica para la elaboración del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Venuta F, Van Raemdonck D. History of lung transplantation. *J Thorac Dis.* 2017; 9(12): 5.458-5.471.
- Hardy JD, Webb WR, Dalton ML et al. Lung Homotransplantation in Man. *JAMA.* 1963; 186: 1.065-1.074.
- Reitz BA, Wallwork JL, Hunt SA et al. Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. *N Engl J Med.* 1982; 306(10): 557-564.
- Cooper JD, Pearson FG, Patterson GA et al. Technique of successful lung transplantation in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987; 93(2): 173-181.
- Patterson GA, Cooper JD, Goldman B et al. Technique of successful clinical double-lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 1988; 45(6): 626-633.
- Chambers DC, Cherikh WS, Harhay MO et al. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult lung and heart-lung transplantation Report-2019; Focus theme: Donor and recipient size match. *J Heart Lung Transplant.* 2019; 38(10): 1.042-1.055.
- Marks WH, Wagner D, Pearson TC et al. Organ donation and utilization, 1995-2004: entering the collaborative era. *Am J Transplant.* 2006; 6(5 Pt 2): 1.101-1.110.
- Christie JD, Sager JS, Kimmel SE et al. Impact of primary graft failure on outcomes following lung transplantation. *Chest.* 2005; 127(1): 161-165.
- Trulock EP, Edwards LB, Taylor DO et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-second official adult lung and heart-lung transplant report--2005. *J Heart Lung Transplant.* 2005; 24(8): 956-967.
- Christie JD, Carby M, Bag R et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part II: definition. A consensus statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2005; 24(10): 1.454-1.459.
- Dominguez-Gil B, Delmonico FL, Shaheen FA et al. The critical pathway for deceased donation: reportable uniformity in the approach to deceased donation. *Transpl Int.* 2011; 24(4): 373-378.
- Halldorsson A, Kronon M, Allen BS et al. Controlled reperfusion after lung ischemia: implications for improved function after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998; 115(2): 415-424; discussion 424-415.
- Bhabra MS, Hopkinson DN, Shaw TE, Hooper TL. Critical importance of the first 10 minutes of lung graft reperfusion after hypothermic storage. *Ann Thorac Surg.* 1996; 61(6): 1.631-1.635.
- lus F, Kuehn C, Tudorache I et al. Lung transplantation on cardiopulmonary support: venoarterial extracorporeal membrane oxygenation outperformed cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012; 144(6): 1.510-1.516.
- Biscotti M, Yang J, Sonett J et al. Comparison of extracorporeal membrane oxygenation versus cardiopulmonary bypass for lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2014; 148(5): 2.410-2.415.
- Laubach VE, Kron IL. Pulmonary inflammation after lung transplantation. *Surgery.* 2009; 146(1): 1-4.
- Vohwinkel CU, Hoegl S, Eltzschig HK. Hypoxia signaling during acute lung injury. *J Appl Physiol (1985).* 2015; 119(10): 1.157-1.163.
- Barklin A, Larsson A, Vestergaard C et al. Does brain death induce a pro-inflammatory response at the organ level in a porcine model? *Acta Anaesthesiol Scand.* 2008; 52(5): 621-627.
- Lyons JM, Pearl JM, McLean KM et al. Glucocorticoid administration reduces cardiac dysfunction after brain death in pigs. *J Heart Lung Transplant.* 2005; 24(12): 2.249-2.254.
- Purins K, Enblad P, Wiklund L et al. Brain tissue oxygenation and cerebral perfusion pressure thresholds of ischemia in a standardized pig brain death model. *Neurocrit Care.* 2012; 16(3): 462-469.
- Steen S, Sjoberg T, Liao Q et al. Pharmacological normalization of circulation after acute brain death. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2012; 56(8): 1.006-1.012.
- Hvas CL, Nielsen TK, Barklin A et al. Brain death induced by cerebral haemorrhage - a new porcine model evaluated by CT angiography. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2012; 56(8): 995-1.005.
- Wittwer T, Franke UF, Fehrenbach A et al. Experimental lung transplantation: impact of preservation solution and route of delivery. *J Heart Lung Transplant.* 2005; 24(8): 1.081-1.090.
- Inci I, Erne B, Arni S et al. Prevention of primary graft dysfunction in lung transplantation by N-acetylcysteine after prolonged cold ischemia. *J Heart Lung Transplant.* 2010; 29(11): 1.293-1.301.
- Van De Wauwer C, Neyrinck A, Geudens N et al. Modification of the arterial anastomotic technique improves survival in porcine single lung transplant model. *Acta Chir Belg.* 2006; 106(4): 450-457.
- Xu H, Abuduwufuer A, Lv W et al. The role of HIF-1alpha-VEGF pathway in bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *J Cardiothorac Surg.* 2019; 14(1): 27.
- Thangappan K, Cavarocchi NC, Baram M et al. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) after extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): Incidence, risks and survivals. *Heart Lung.* 2016; 45(5): 449-453.