

## TRANSPLANTACIÓ DE LA MELSA COM A MÈTODE DE TOLERÀNCIA INMUNOLÒGICA EN LA TRANSPLANTACIÓ RENAL

V. VIDAL I CONDE, A. MUÑOZ I VICEN, J. ASAMAR I SOLER,  
J. MUNCUNILL I GIL, J. ALSINA I ROCASALBAS, T. ESPAÑOL I BOIREN,  
L. MARTÍNEZ I MANZANO, M. A. MORAL I VICO, F. DONCEL I JAÉN

MEMORIA FINAL. — Cuando presentamos el proyecto de trabajo experimental solicitando la «Beca d'Investigació» de la Filial del Vallès Occidental de l'Acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya i de Balears, cuyo título «Transplantament de la melsa com a mètode de tolerància immunològica en la transplantació renal», nos proponíamos crear quimeras inmunológicas consiguiendo homotrasplantes de bazo duraderos, que nos permitiera, en un segundo tiempo, el trasplante renal indefinido.

La metodología que seguimos para desarrollar dicho proyecto estaba basada en que se sabe que la inducción de un estado de quimerismo va parejo con la existencia de una tolerancia inmunológica. La dificultad estriba en conseguir un quimerismo estable y permanente. El bazo posee la virtud de ser un órgano hematopoyético e inmunopoyético, ser productor de linfocitos B, tener funciones decisivas en relación con su capacidad de fijación ligada al fenómeno de reconocimiento de lo exógeno. Se sabe igualmente que el bazo propio, isogénico, coadyuva en la producción de anticuerpos facilitantes.

Lo que pretendíamos, pues, era descubrir el papel que podría ejercer un bazo exogénico, en caso de no ser rechazado, en el mantenimiento de un estado de no-reactividad inmunológica frente a un riñón trasplantado.

*Anatomía del bazo:* El bazo en el perro es de color rojo vinoso, su forma es alargada y ligeramente falciforme. Fácilmente se reconocen dos polos, uno anterior redondeado y otro posterior, relacionado con la extremidad ventral de la última costilla izquierda y la apófisis transversa izquierda de la primera vértebra lumbar.

La cara visceral es cóncava y está dividida en sentido longitudinal por el hilio del bazo en dos fosetas, anterior y posterior.

El tamaño del bazo varía extraordinariamente de un perro a otro, siendo su peso mínimo de cincuenta gramos.

La posición del mismo es muy variable, dependiendo principalmente del estado de repleción del estómago, tal que cuanto más lleno esté más desplaza el bazo su polo anterior hacia dentro y arriba.

La vascularización arterial esplénica proviene de la arteria celiaca que emite la arteria hepática y un pequeño tronco que se bifurca en arteria gástrica izquierda y arteria esplénica.

El drenaje venoso del bazo constituye, junto con la gástrica, la vena gastroesplénica que se anastomosa con la vena mesentérica común, formando la vena porta.

El bazo del perro es un «bazo depósito» debido a su citoarquitectura. En su microarquitectura predomina la pulpa roja sobre la blanca y hay una extraordinaria cantidad de túbulos ramificados con mucho tejido reticular en los sinusoides.

*Sistemática preoperatoria y post-operatoria inmediata:* A todos los perros que incluimos en nuestro programa les administramos vacunas contra la rabia, moquillo, hepatitis y leptospirosis, dando la última dosis entre los cuarenta y veintidós días antes de la intervención.

La formación de las parejas de trasplante la hacemos procurando que sean del mismo peso; no seguimos ningún otro tipo de criterio de raza, edad o sexo.

El día antes de la intervención rasuramos una de las patas delanteras para facilitar la venoclisis y hacemos una extracción sanguínea para control de la analítica.

El día de la intervención, y antes del último pesaje, lo lavamos; en algunos lotes hemos administrado antibióticos de manera profiláctica.

*Anestesia:* El perro llega al quirófano bañado y en ayunas desde las doce horas antes de la intervención y con la vejiga urinaria vacía.

Subimos al perro a la mesa de quirófano y en posición de cuatro patas con una de las delanteras extendida hacia adelante, procedemos a la venoclisis. Como vía de elección utilizamos la vena cefálica, canalizada con un Abbotat n.º 18.

Se inicia la inducción con pentobarbital. La dosis depende en cada caso del peso del animal, temperamento, etc. Seguidamente colocamos un suero para fluidos y ponemos al animal boca abajo para facilitar las maniobras de intubación, que se realiza con el tubo de Rusch adecuado a la tráquea y el mantenimiento se realiza con oxígeno y fluothane.

El control del tono cardíaco y pulso se efectúa manualmente en carótida.

La volemia se mantiene con suero glucosado al 5 % y suero fisiológico.

Durante toda la intervención el perro descansa sobre una placa termorregulable por el anestesista e incorporada a la mesa de quirófano.

Se inicia el despertar del animal cuando se empieza el cierre de la laparotomía.

Al terminar se coloca el apósito sobre la herida y si responde a los estímulos se le extuba y se retira el catéter de perfusión.

Seguidamente lo trasladamos a su jaula, que está atemperada, a 22° constantemente. A los cuarenta minutos, más o menos, el animal se mantiene ya de pie.

A las cuatro horas de la intervención empieza a beber agua.

Las fases que seguimos fueron las siguientes:

- 1) Codificación de la técnica del autotrasplante de bazo.
- 2) Homotrasplatación de bazo doble.
- 3) Homotrasplatación de bazo y riñón con condicionamiento.

Vamos a desarrollar cada una de estas fases.

*Codificación de la técnica de autotrasplante de bazo:* Esta primera fase fue resuelta satisfactoriamente y realizamos sucesivamente 10 autotrasplantes, lo que nos permitió, además de codificar dicha técnica, observar el resultado de la misma, ya que conseguimos supervivencias largas y a estos animales les practicamos arteriografías sucesivas que nos permitieron seguir la evolución del órgano trasplantado. La técnica seguida fue la siguiente:

Después de tratados como hemos dicho y anestesiados se procede a la limpieza del abdomen, su rasurado y con povidona yodada al 7,5 % a la desinfección de la piel del abdomen. Colocamos los paños estériles y practicamos una laparotomía xiopubiana, longitudinal en las hembras y en bayoneta para evitar la implantación del pene en el macho.

La abertura de la cavidad abdominal se hace siguiendo la línea alba, que en el perro es muy neta y exangüe. Se reclina el paquete intestinal y se hace evidente el bazo (fig. 1).

Seguidamente procedemos al control de los vasos ilíacos: arteria primitiva ilíaca en primer lugar, y luego de ilíaca interna y externa. Dicho control lo hacemos con vessel-loops. Se coloca una pinza vascular en el origen de la ilíaca primitiva y se ligan y seccionan por separado la I. interna y la externa. Simpatectomía periarterial de la primitiva.

La vena cava inferior es controlada igualmente con vessel-loops, desde el origen de la gran vena lumbar por abajo y hasta el origen de las venas renales por arriba. Se verifica seguidamente que la colocación de dos pinzas vasculares nos permitirá la realización de la anastomosis venosa.

Se verifica la hemostasia y se procede a la esplenectomía. Para ello se seccionan entre ligaduras los vasos cortos del meso gastro-epiploico y gastro-esplénico en toda su extensión (cara gástrica del bazo). Igualmente se secciona el meso con sus vasos que une el páncreas con el bazo. Entonces se luxa el bazo hacia arriba y se controla el pedículo,



FIG. 1. — Cavidad abdominal abierta y bazo.

la arteria esplénica desde su nacimiento del tronco pequeño y en su bifurcación, respetando la gástrica izquierda. La vena esplénica antes de ser porta, como hemos dicho en la anatomía.

Una vez esqueletizado el órgano se procede a seccionar la arteria esplénica y a cateterizarla con un catéter de venotomía y se perfunde a través de ella una cantidad aproximada de 200 c. c. de suero fisiológico, que al pasar todos ellos a través de la vena esplénica a la circulación venosa del animal, se le realiza una autoperfusión de toda la sangre contenida en el bazo. Finalizada dicha autoperfusión, se procede a la esplenectomía seccionando por separado la arteria y la vena.

Se coloca el bazo en una batca y se procede seguidamente a la perfusión del órgano con suero Ringer lactado frío a 4° C, a los que se les han añadido 25 mg. de heparina y 5 c. c. de novocaína (fig. 2).

Se coloca ahora el bazo, ya perfundido y enfriado, sobre la cavidad abdominal y se procede a las anastomosis arteriales. Empezamos siempre suturando las venas: la cava es pinzada con dos pinzas vasculares y se hace una incisión longitudinal de la cava de una longitud idéntica a la de la vena esplénica, y se procede a colocar tres puntos de triangulación de Carrel (fig. 3).

Seguidamente se anastomosa una cara de la esplénica en termino lateral con la cava.

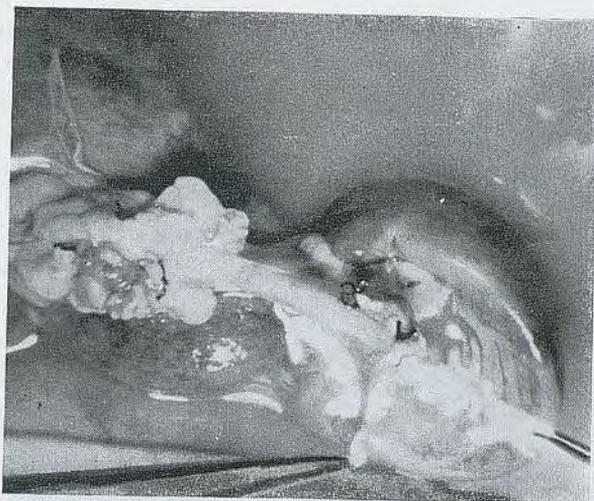


FIG. 2

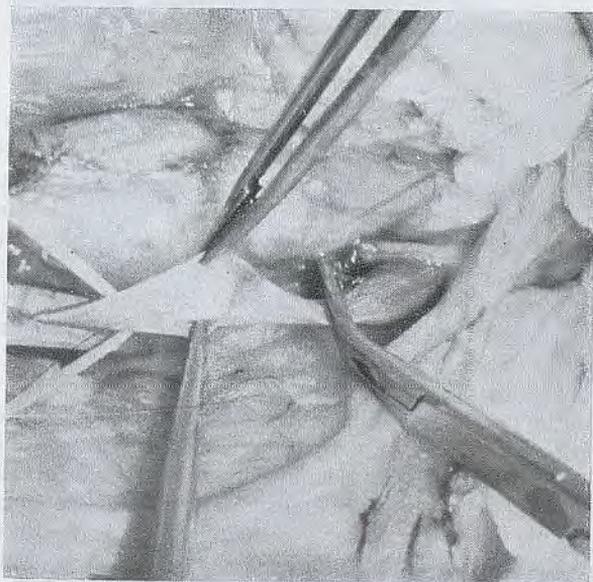


FIG. 3

La hemisutura lateroterminal cava-esplénica se realiza con Prolene 5/0 y, como se ve en la figura, previa triangulación (fig. 4).

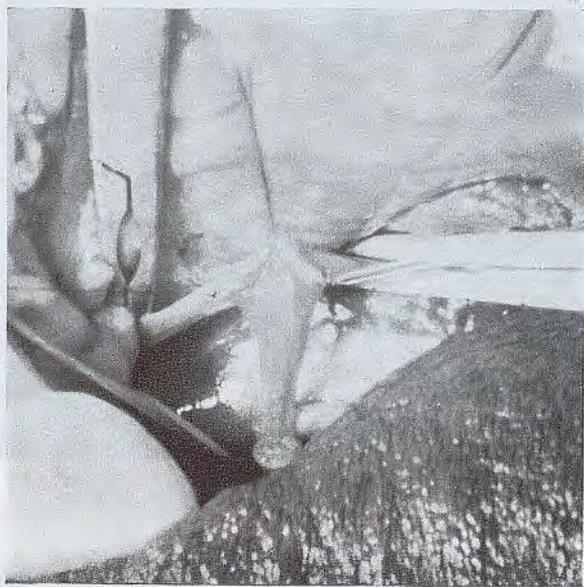


FIG. 4

Terminada la hemisutura de una cara de la cava se verifica la misma y se hace un punto en la mitad de la hemisutura posterior para realizar una cuadrangulación de la misma, con lo cual dicha anastomosis venosa es de más fácil realización y no existe la posibilidad de suturar dos paredes venosas incorrectamente (fig. 5).

En ese momento se da un giro al bazo hacia la parte ventral y se realiza la otra hemisutura venosa, con lo cual tenemos terminada dicha anastomosis (fig. 5).

Una vez terminada, pues, la sutura venosa, procedemos a realizar la maniobra de poner una pinza vascular en la vena esplénica y se sueltan las pinzas de la cava, con lo cual verificamos la hemostasia de la sutura y permitimos el restablecimiento de la circulación por la cava. Antes de soltar la segunda pinza inyectamos 25 c. c. de bicarbonato 1 molar con la idea de neutralizar los metabolitos ácidos retenidos en los miembros inferiores. Procedemos seguidamente a la realización de la sutura arterial, que la hacemos igualmente con Prolene 5/0 y en dos hemisuturas continuas. Se anastomosa la arteria esplénica con un

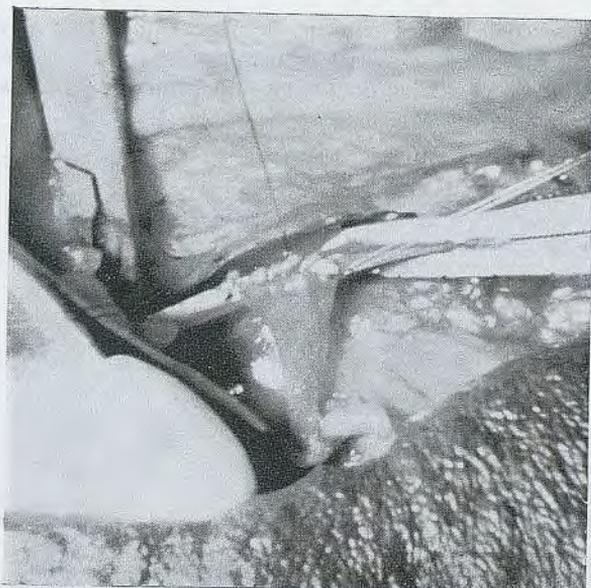


FIG. 5



FIG. 6

vaso ilíaco, que suele ser el externo, teniendo que ligar el otro, que, como hemos dicho antes, estaba seccionado y que hasta el último momento no sabemos con cuál de los dos lo podremos realizar, dependiendo del diámetro de la arteria esplénica (fig. 7).

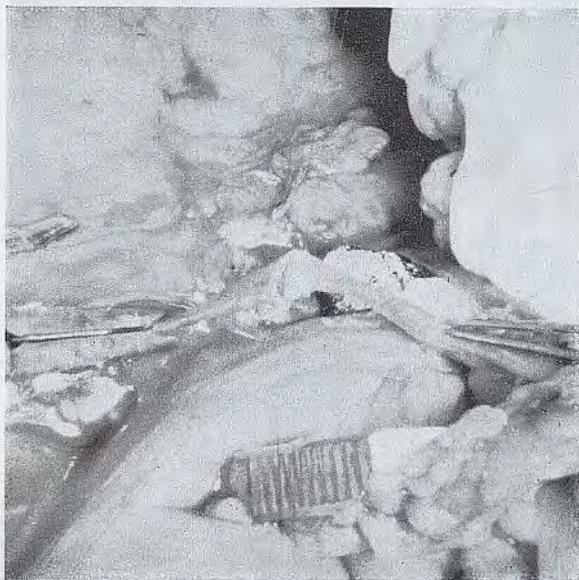


FIG. 7

Una vez terminadas las anastomosis vasculares se sueltan las pinzas vasculares, primero la de la vena y luego la de la arteria, con lo cual se colorea el bazo y se comprueba la viabilidad del injerto.

En la figura 8 se puede comprobar como el bazo ya tiene un color igual al de origen y que las suturas arterial y venosa funcionan bien.

Verificamos seguidamente la hemostasia y procedemos al cierre de la laparotomía después de haber ubicado el bazo en su «locum» preestablecido. La fosa ilíaca derecha es excelente para recibir el órgano trasplantado, la vejiga urinaria lo cubre y las asas intestinales se depositan sobre él, quedando el músculo psoas por fuera.

Se verifica de nuevo la hemostasia y se cierra la laparotomía con sutura a puntos sueltos totales de los músculos y peritoneo (seda del n.º 3). El tejido celular subcutáneo a puntos sueltos de catgut 00 y la piel con sutura continua subcutánea de seda 3/0.



FIG. 8

Seguidamente se le coloca el apósito abdominal y se le retiran las vías de goteo, desintuba y se coloca el animal en una camilla y se traslada a su jaula individual, que está atemperada a una temperatura estable de 20° C. Como decíamos más arriba, a las 4 horas ya toma líquidos.

Esta técnica la repetimos en 10 animales y conseguimos con ella supervivencias largas y sin problemas para los animales de experimentación, lo cual nos permite abordar el siguiente paso o fase, que consistía en la práctica de homotrasplantes dobles de bazo.

*Homotrasplante de bazo doble:* La operación de homotrasplante de bazo la realizamos trabajando dos equipos quirúrgicos simultáneamente en dos mesas de quirófano próximas y en paralelo dentro de la misma sala.

Las dos laparotomías se empiezan simultáneamente y cuando ya se tienen esqueletizados los dos bazos se procede a las esplenectomías en paralelo. Las perfusiones de ambos bazos se realizan según el protocolo experimental de perfusión de bazo que hemos descrito en la técnica del autotrasplante. Una vez enfriados y perfundidos se cruzan

los bazos y cada uno de los equipos realiza un homotrasplante según el mismo modelo descrito anteriormente.

Verificado el perfecto funcionamiento de cada uno de los trasplantes por el equipo encargado, se cierra la laparotomía y se remite el animal a su jaula.

Hicimos varios lotes de homotrasplatación:

● Cinco homotrasplantes sin inmunosupresión, con esplenectomía del propio animal y sin que les administrásemos antibióticos.

Estos cinco animales fallecieron, a los 12 y 15 días, de sepsis. En la necropsia encontramos el bazo rechazado en todos ellos.

● A otro lote les practicamos el homotrasplante y les administramos antibióticos (fueron seis perros). Los seis rechazaron el bazo a los 15 días en que les practicamos laparotomía exploradora. Dos de ellos fueron sacrificados por el estado séptico del bazo y los otros cuatro sobrevivieron a la segunda operación, pero sin bazo.

● Un tercer lote de cuatro animales (dos parejas) se les sometió a inmunosupresión suave durante 15 días (Imurel 1 mg/Kg/peso y Prednisona 0,5 mg/Kg/peso).

Buen estado de los perros, y a dos de ellos, como se verá más tarde, les trasplantamos un riñón a las seis semanas, encontrando entonces que el bazo estaba rechazado.

*Homotrasplante simultáneo de bazo y de riñón con inmunosupresión:* A un lote de cuatro perros se les practicó, en la misma operación, el doble homotrasplante de bazo y de riñón. Se procedía como en técnica de trasplatación realizando simultáneamente las dos esplenectomías y su consiguiente perfusión y seguidamente se trasplantaban en la fosa ilíaca, tal como hemos descrito. Verificado el buen funcionamiento de ambos trasplantes procedimos a la nefrectomía derecha de cada uno de los animales. Perfusión renal y trasplante en la fosa ilíaca izquierda (arteria renal en lateroterminal con la art. ilíaca común y vena renal igualmente en lateterminal con la vena ilíaca).

De estos cuatro perros, en dos de ellos el trasplante renal se rechaza y mueren de uremia a los 11 y 12 días. En la autopsia se demuestra que los bazos no estaban rechazados.

Los riñones izquierdos de ambos animales se habían resecaado en la operación, de ahí que al fallarles el único riñón fallecieron de uremia.

Los otros dos animales fallecieron a los 21 y 25 días, con rechazo de riñón en el primero y sin él en el segundo.

Dos animales que se han citado antes sufrieron en una segunda operación el trasplante renal, después de haberles practicado el esplénico 45 días antes. De estos animales uno hizo un rechazo hiper-agudo del trasplante renal a las 24 horas de la intervención, muriendo, y el segundo el rechazo lo hizo al sexto día, muriendo igualmente.

*Homotrasplatación de bazo con la técnica de transfusiones facilitadoras:* Hemos realizado una serie de homotrasplantes de bazo, intentando crear lo que en Inmunología se llama «engagement», esto es, condicionar al animal receptor.

Esta técnica consiste en el intercambio simultáneo de 20 c. c. de sangre heparinizada entre los perros que forman una pareja de trasplante.

Antes de efectuar la primera transfusión hacemos un control analítico sistemático a todos los perros de la serie (hematocrito, hematíes, recuento y fórmula leucocitaria, urea, etc.).

Dejamos en ayunas de alimentos sólidos a los animales, les afeitamos las patas delanteras y procedemos seguidamente: colocamos al primer perro sobre la mesa con las patas delanteras flexionadas, colocamos una venda elástica en una de ellas y cuando las venas se han dilatado puncionamos y extraemos 20 c. c. de sangre con una jeringuilla convenientemente heparinizada. Hacemos lo mismo con el otro animal. Comprimitos las punciones y pinchamos en la otra pata inyectando los 20 c. c. de sangre procedente de su pareja de trasplante.

Después de una corta compresión y comprobado que no sangran, los volvemos al estabulario.

Dichas transfusiones las hacemos semanales una vez y durante ocho semanas, que habíamos fijado como fecha óptima para la realización del trasplante.

Hicimos tres parejas y por consiguiente trasplantamos seis animales condicionados de esta manera. Los resultados fueron los siguientes:

Tres perros murieron en el post-operatorio inmediato.

1 de rotura de bazo.

2 de embolia pulmonar.

Tres perros sobrevivieron.

A éstos se les practicó estudio gammagráfico con isótopos radiactivos, obteniendo los siguientes resultados: los tres funcionaban a las dos semanas del trasplante.

Uno de ellos dejó de funcionar a la tercera semana.

Otro era negativa la imagen en la gammacámara a la cuarta semana.

El tercero funcionaba a la sexta, pero dejó de funcionar a la octava semana.

Este estudio gammagráfico de los animales trasplantados fue realizado en el Centro Técnico de Isótopos Radiactivos que dirige el doctor SETOAIN, lo que nos permitió seguir la evolución del bazo trasplantado. Las ventajas de esta técnica son:

- es una exploración inocua, tanto para el que la realiza como para el que la soporta;
- da una objetividad suficiente;

- es de fácil repetitividad;
- mínima irradiación.

*Sistemática post-operatoria:* Los cuidados postoperatorios de estos animales trasplantados naturalmente empiezan una vez terminada la intervención. Se le coloca un apósito en el abdomen y no se desintuba hasta que los movimientos espontáneos así lo aconsejan.

Con angarillas son trasladados hasta la perrera, que es individual y provista de techo bajo, comunicada con el patio y provista de calefacción. La temperatura constante es de 20° C.

El primer control lo hacemos a las ocho de la mañana del día siguiente (unas doce horas después de la intervención).

Durante la primera semana hacemos una visita diaria y apuntamos en la hoja de curso la evolución y vicisitudes acaecidas, con ayuda del mozo encargado del estabulario.

Pasada la primera semana subimos al animal, si su estado general se lo permite, al terrado junto con el resto de animales, haciendo vida normal.

La medicación postoperatoria varía según el protocolo establecido en cada serie.

Como antibióticos hemos empleado las cefalosporinas y como corticoide la prednisolona.

No dudamos en la reintervención si así lo requiere.

Según las series, hemos hecho sistemáticamente arteriografías o gammagrafías con tecnecio radiactivo.

**DISCUSIÓN.** — Desde la aceptación del proyecto experimental por la Acadèmia de Ciències Mèdiques (Filial del Vallès Occidental), hasta el momento actual, que damos por terminado el proyecto, hemos realizado 35 trasplantes de bazo experimental, empleando como animal el perro callejero de 10-12 Kg. de peso.

En una primera fase hicimos 10 autotrasplantes para codificar la técnica de trasplantación de bazo en el perro.

En una segunda fase subdividida en tres subfases realizamos 15 homotrasplantes de bazo divididos de la siguiente manera:

- 5 homotrasplantes de bazo (tres dobles, pero un animal murió en la intubación, de ahí que no sirvió más que como donante), que sufrieron el homotrasplante, sin que se les administrara ni antibióticos ni drogas inmunosupresoras. Los cinco animales murieron de sepsis tras rechazo del bazo.

- 6 perros con homotrasplante de bazo a los cuales se les administró antibióticos. Los seis rechazaron el bazo.

• 4 perros homotrasplantados a los que se les administró anti-bióticos y drogas inmunosupresoras, que soportaron bien la intervención y cuyos bazos sobrepasaron la media de supervivencia.

• 4 perros que fueron sometidos a la doble trasplantación de bazo y de riñón, con nefrectomía contralateral, que presentan la característica de morir dos de ellos antes de las dos semanas, por uremia, pero con el bazo funcionando.

• 6 animales a los cuales se les ha creado un condicionamiento con repetidas transfusiones sanguíneas, que creemos es el camino que debe seguirse en futuros trabajos, ya que conseguimos unos resultados aleccionadores: tres de los animales han sobrepasado las fechas de rechazo habituales.

CONCLUSIONES. — De la investigación realizada por nuestro grupo, creemos poder sacar las siguientes conclusiones, en materia de trasplantación de bazo encaminadas a crear tolerancia inmunológica:

- 1) La técnica de bazo en el perro es factible de realizar.
- 2) La mortalidad o rechazo del bazo trasplantado es indefectible, si se deja a su propia evolución.
- 3) Se consiguen mejores resultados en la trasplantación de bazo si se usan drogas inmunosupresoras en el postoperatorio.
- 4) La mortalidad de los animales ha sido por sepsis o por embolismo pulmonar.
- 5) Las infecciones y sepsis se corrigieron cuando empleamos anti-bióticos.
- 6) El condicionamiento con transfusiones repetidas nos ha permitido conseguir resultados muy interesantes, aunque sin llegar a solucionar el problema del rechazo del bazo.
- 7) Creemos que la técnica de las politransfusiones podrían ser útiles para el trasplante de otros órganos, como por ejemplo el renal o el cardíaco, ya que, como hemos visto en nuestra experiencia, el bazo consigue un alargamiento de su supervivencia, pero no impide a la larga (8 semanas) el que sea rechazado.