



## ACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO (DELAY PHENOMENON) DEL COLON DERECHO E ÍLEON TERMINAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS

**Gerardo Rodríguez Leon**

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

**Doctorando**

**GERARDO RODRÍGUEZ LEÓN**

**ACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO (*DELAY PHENOMENON*)  
DEL COLON DERECHO E ÍLEON TERMINAL EN UN MODELO  
EXPERIMENTAL EN RATAS**

**TESIS DOCTORAL**

**Dirigida por:**

Dra. ROSA JORBA MARTIN y Dr. JAVIER DE OCA BURGUETE

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA – FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA



**UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI**

Tarragona, Catalunya 2023

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Acondicionamiento isquémico (delay phenomenon) del colon derecho e íleon terminal en un modelo experimental en ratas

Gerardo Rodríguez Leon



# UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI

ROSA JORBA MARTIN, doctora en Medicina y profesora del departamento de Medicina de la Universidad Rovira y Virgili,

JAVIER DE OCA BURGUETE, doctor en Medicina y profesor del departamento de Medicina de la Universidad de Barcelona,

HACEN CONSTAR, que el presente trabajo, titulado “Acondicionamiento isquémico (*delay phenomenon*) del colon derecho e íleon terminal en un modelo experimental en ratas” que presenta Gerardo Rodríguez León para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Cirugía de esta universidad.

Tarragona, 2 de mayo de 2022

ROSA JORBA MARTIN

JAVIER DE OCA BURGUETE

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Acondicionamiento isquémico (delay phenomenon) del colon derecho e íleon terminal en un modelo experimental en ratas

Gerardo Rodríguez Leon

## AGRADECIMIENTOS

A Dios

A Verónica, mi compañera de viaje, ¡sos lo mejor que me ha pasado en la vida! Gracias por nuestros dos hijos maravillosos: Nicolás y Alelí

A mis Padres, por permitirme ser, por el molde que han impreso en mi al principio de todo. Algo ha cambiado desde entonces, creo que para bien

A mis hermanos, Santiago y Paola, mis primeros amigos y quienes me han enseñado los aspectos básicos para la convivencia humana. A Hannika, mi otra hermana. Y mis sobrinos: Leire, Benja, Paula y Rodrigo

A mis familiares y allegados que hicieron posible que estudiara medicina: mi abuela Teresita, Luz Marina, tía Juanita, tía Nelly y tío Felipe, José Castro y tía Marina. Gracias a toda mi familia por el apoyo: en Bogotá, en Asunción, en el más allá.

A mi otra familia, muy querida: Cesar, Beatriz, Emilio, Soledad, Matías y Magalí, ¡y a todos los demás!

A mis amigos - colegas a quienes admiro sinceramente y con quienes he tenido el agrado de compartir partes muy importantes de mi carrera: Daniel Andrada, Christian Rojas, Jordi Elvira y Guillermo Sequera.

A dos grandes personas que me mostraron que no hay nada mejor a lo que me pueda dedicar en esta vida que a la medicina: Carlos Baez y Cesar Chirico

A mis primeros mentores quirúrgicos: Erico Rodríguez, Miguel Angel Farina, Hector Dami, Carlos Carmona, Ricardo Morales, Alfredo Chaparro, Rosa Ferreira y Gustavo Machaín Vega

A mis maestros del Hospital Universitari de Bellvitge de quienes aprendí aquello que buscaba al cruzar ese gran océano que separa tantas cosas: Antoni Rafecas, Emilio Ramos, Joan Fabregat, Carla Bettonica, Jaume Torras Torra, Leandre Ferran, Humberto Aranda, Juli Busquets, Lluís Secanella, Loris Trenti y Amador García Ruiz de Gordejuela.

A quienes considero mis mentores quirúrgicos en Coloproctología: Mónica Millán, Sebastiano Biondo y Xavier Serra Aracil.

A mis directores de Tesis: Rosa Jorba y Javier De Oca por toda su dedicación y ayuda, de verdad muchísimas gracias. Y a Pere Rebas por resolver mis dudas estadísticas tan bien como las quirúrgicas (ojalá algún día tenga esa claridad de razonamiento).

A mis apreciadas coR: Silvia Martín, Ana Galvez y Anna Sturlesse.

A mis compañeros de Residencia, que fueron mucho más que eso: Fernando Estremiana, Jaime López Borao, Jose Saez, Jose Rodríguez (te recuerdo muy especialmente), Anna Casajoana, Cristina Mercader, Maria Darriba, Carla Zerpa, Ana Gonzalez, Alejandro Bravo, Catalina Uribe y Pamela Vivas

A mis apreciados colegas del Servei de Cirurgia del Hospital de Viladecans: Albert Sueiras, Josep Vallet, Vicenç Gil, Carles Ortiz, Begoña de Ramón, Miquel Martínez Vilalta, Ramiro Hevia, Alejandro Biel, Silvia Martín, Marta Gil Barrionuevo y Marta Arnau.

Seguro que me dejo alguien muy importante. No es ingratitud, espero sepan disculparme.

Y como dijo Gustavo Cerati en el Último Concierto: GRACIAS, ¡**TOTALES**!

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Acondicionamiento isquémico (delay phenomenon) del colon derecho e íleon terminal en un modelo experimental en ratas

Gerardo Rodríguez Leon

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vascularización gástrica y de la gastroplastia (pág. 21)

Figura 2. Colgajo con sección diferida del pedículo descrita por Tagliacozzi (pág. 22)

Figura 3. Esquema de acondicionamiento isquémico ileocólico (pág. 23)

Figura 4. Diseño de un colgajo cutáneo en rata (pág. 27)

Figura 5. Esquema del flujo sanguíneo en un colgajo cutáneo (pág. 27)

Figura 6. *Surgical delay* mediante la incisión de ambos bordes longitudinales de un colgajo de 3 x 10 cm en el dorso de cada rata (pág. 28)

Figura 7. Esquema de la técnica de acondicionamiento en un colgajo cutáneo (pág. 29)

Figura 8. Esquema de inervación y regulación de esfínteres precapilares y *shunts* (pág. 33)

Figura 9. Representación gráfica del mismo colgajo con y sin *surgical delay* que ilustra la línea de necrosis y los cambios en los vasos *choke* (pág. 33)

Figura 10. Valoración in vivo de un colgajo cutáneo en conejo mediante fluoresceína (pág. 34)

Figura 11. Secuencia del *delay phenomenon* (pág. 35)

Figura 12. Arteriograma del dorso de un conejo no intervenido (pág. 35)

Figura 13. Arteriograma del dorso de un conejo al que se le realizó un colgajo con acondicionamiento isquémico (pág. 36)

Figura 14. Arteriogramas de dos colgajos de pared abdominal de perro con y sin acondicionamiento isquémico (pág. 36)

Figura 15. Esquema de la diferencia entre vasos *choke* y *shunts* verdaderos (pág. 38)

Figura 16. Secuencia de modificaciones del flujo sanguíneo de un colgajo (pág. 39)

Figura 17. Flujo sanguíneo en la gastroplastia (pág. 40)

Figura 18. Clasificación del fallo del conducto gástrico (pág. 44)

Figura 19. Vascularización arterial del colon en humanos (pág. 45)



Figura 20. Esquema de ileocoloplastia (pág. 46)

Figura 21. Puntuación de Chiu (pág. 49)

Figura 22. Vasos sanguíneos teñidos mediante inmunohistoquímica para CD31 (pág. 50)

Figura 23. Anatomía de región ileocólica en la rata (pág. 55)

Figura 24. Necrosis isquémica del ciego en rata (pág. 55)

Figura 25. Diagramas de caja de la distribución del contaje de vasos sanguíneos en colon (pág. 62)

Figura 26. Diagramas de caja de la distribución del contaje de vasos sanguíneos en íleon (pág. 62)

Figura 27. Modificaciones de la arcada vascular tras ligadura de los vasos ileocólicos (pág. 65)

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de los procedimientos de *delay* en colgajos cutáneos (pág. 32)

Tabla 2. Complicaciones de la esofaguectomía (pág. 47)

Tabla 3. Criterios de malestar animal para realizar eutanasia (pág. 58)

Tabla 4. Parámetros de supervisión del dolor en ratas (pág. 58)

Tabla 5. Mediana de puntuación de Chiu en colon (y significancia vs grupo *sham*) (pág. 60)

Tabla 6. Mediana de puntuación de Chiu en íleon (y significancia vs grupo *sham*) (pág. 61)

Tabla 7. Mediana de la suma de número de vasos en colon (pág. 63)

Tabla 8. Mediana de la suma de número de vasos en íleon (pág. 63)

Tabla 9. Valor P de la media de vasos de colon e íleon vs grupo *sham* (pág. 64)

Tabla 10. Diferencia de peso según el daño histológico tras acondicionamiento (pág. 66)



## **RELACIÓN DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS**

Anexo 1. Resumen de la comunicación presentada en el 25to Congreso de la Sociedad Española Para la Investigación Quirúrgica y publicado en el British Journal of Surgery

Anexo 2. Artículo publicado en el European Surgical Research

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Acondicionamiento isquémico (delay phenomenon) del colon derecho e íleon terminal en un modelo experimental en ratas

Gerardo Rodríguez Leon

## CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	5
INDICE DE FIGURAS .....	7
INDICE DE TABLAS .....	9
RELACIÓN DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS.....	11
CONTENIDO .....	13
RESUMEN.....	17
ABSTRACT.....	19
1. INTRODUCCIÓN .....	21
1.1 Acondicionamiento isquémico.....	24
a. Nomenclatura .....	24
b. Mecanismos del acondicionamiento isquémico:.....	25
1.2 Acondicionamiento isquémico gástrico .....	39
a. Cambios vasculares en la gastroplastia[35,37].....	40
b. Modelos experimentales de acondicionamiento isquémico gástrico.....	41
c. Resultados clínicos del acondicionamiento gástrico .....	42
1.3 Reconstrucción esofágica mediante coloplastia .....	44
a. Anatomía vascular del colon e íleon .....	44
b. Técnica quirúrgica en la coloplastia.....	46
c. Resultados y complicaciones de la coloplastia.....	47
1.4 Experiencia en Acondicionamiento Isquémico Preoperatorio (AIP) en el Hospital Universitari Bellvitge.....	48
1.5 Estudio del daño histológico y neovascularización.....	48
a. Daño histológico .....	48
b. Detección de neovascularización .....	50
2. HIPÓTESIS .....	51
3. OBJETIVOS .....	51

4.	MATERIALES Y MÉTODO.....	53
4.1.	Diseño .....	53
4.2.	Periodo de realización .....	53
4.3.	Población (animales).....	53
a.	Cálculo de tamaño de muestra .....	53
4.4.	Intervención.....	53
a.	Técnica quirúrgica del acondicionamiento isquémico .....	54
b.	Configuración de los grupos de estudio .....	54
c.	Aleatorización .....	56
4.5.	Recogida de datos.....	56
a.	Control de la aleatorización.....	57
b.	Enmascaramiento .....	57
4.6.	Seguimiento: protocolo de monitorización de bienestar animal .....	57
a.	Pauta analgésica .....	57
b.	Método de eutanasia.....	57
c.	Extracción de muestras.....	57
4.7.	Análisis de datos.....	58
4.8.	Aspectos éticos.....	59
5.	RESULTADOS .....	60
5.1.	Necrosis transmural.....	60
5.2.	Daño histológico .....	60
a.	Colon: .....	60
b.	Íleon: .....	61
c.	Contaje de vasos sanguíneos .....	61
d.	Variación de peso según el grado de daño .....	65
6.	DISCUSIÓN .....	67
	Consideraciones y proyectos futuros: .....	72
7.	CONCLUSIONES .....	73

8. BIBLIOGRAFÍA.....	75
9. ANEXOS.....	81
Anexo 1. Resumen de la comunicación presentada en el 25to Congreso de la Sociedad Española Para la Investigación Quirúrgica y publicado en el British Journal of Surgery .....	83
Anexo 2. Artículo publicado en European Surgical Research .....	85





## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** El acondicionamiento isquémico preoperatorio (AIP) del estómago mejora los resultados de la gastroplastia de reemplazo esofágico y está asociado a una baja morbilidad. En algunos casos, el estómago no puede ser utilizado para el reemplazo esofágico y se emplean otros órganos, habitualmente el colon. Actualmente no hay estudios que analicen el AIP del colon previo a coloplastia.

**OBJETIVO:** Determinar la viabilidad del AIP del colon e íleon terminal en un modelo experimental en ratas

**MÉTODOS:** El estudio se realizó en *Rattus norvegicus* mediante ligadura quirúrgica de los vasos ileocólicos. Se establecieron 7 grupos de animales (6 ratas por grupo), los grupos fueron definidos por el día de eutanasia posterior al AIP (+1, +3, +6, +10, +15 y +21) comparándolo con un grupo control (*sham*). La viabilidad del modelo se definió como <10% de necrosis transmural. La valoración de daño histológico se realizó mediante la puntuación descrita por Chiu en secciones teñidas con HyE. La neovascularización se determinó mediante el conteo de vasos teñidos mediante inmunohistoquímica para CD31 en 5 campos de gran aumento.

**RESULTADOS:** La necrosis transmural en colon se observó en 1 de 36 animales (2,78%); no se observó necrosis transmural en el íleon. El máximo de daño en el colon se observó en el 1er día post AIP ( $P = 0.015$ ), mientras que en el íleon el daño fue significativo durante el 1er, 3er y 6to día ( $P = 0,015$ ;  $0,002$  y  $0,015$  respectivamente). En el grupo +21, la recuperación fue completa en 4 de 6 animales y en el íleon en 5 de 6 animales. No hubo diferencias significativas en el número de vasos en ninguno de los grupos en comparación con el grupo control.

**CONCLUSIÓN:** Reportamos un modelo viable de acondicionamiento isquémico de colon derecho e íleon terminal. El daño histológico fue mayor en el 1er y 3er día post AIP, con una recuperación completa en dos tercios de los casos. En este modelo preliminar, no se pudo demostrar que la neovascularización sea un mecanismo de adaptación en el AIP.

**Palabras clave:** *delay phenomenon*, acondicionamiento isquémico, reemplazo esofágico, esofaguectomía, colon



## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Preoperative gastric ischemic conditioning (IC) improves the outcome of esophageal replacement gastroplasty and is associated with a low morbidity. In some cases, the stomach cannot be used for esophageal replacement and a colonic replacement is required instead. Currently, there are no studies which have assessed colonic IC or the adaptive mechanism within the colon of a cycle of ischemia and reperfusion.

**OBJECTIVE:** To determinate the feasibility of IC in the colon and terminal ileum in an experimental rat model.

**METHODS:** The study was conducted in the *Rattus norvegicus* with ileocolic vascular ligation. Seven groups of animals were established (6 rats per group) with groups defined by the date of their post-IC euthanasia (+1, +3, +6, +10, +15 and +21). Comparisons were made with a sham group. Viability of the model was defined as < 10% of transmural necrosis. The evaluation of histological damage used the Chiu score in H&E sections of paraffin-embedded specimens with assessment of neovascularization by the median of submucosal vessel counts in 5 high magnification fields using CD31 immunohistochemistry.

**RESULTS:** Transmural colon necrosis occurred in 1/36 animals (2.78%) with no animal demonstrating transmural ileal necrosis. Maximal colonic damage was seen on the 1st and the 3rd post-IC day ( $P = 0.015$ ). In the terminal ileum, the damage was significant on the 1st, 3rd and 6<sup>th</sup> day ( $P = 0,015$ ; 0,002 and 0,015, respectively). In the +21 group, histological recovery was complete in the colon in 4 of the 6 (66.7%) animals and in the ileum in 5 of 6 (83.3%) animals. There were no significant differences in quantitative neovascularization in any of the groups when compared with the sham group or when comparisons were made between groups.

**CONCLUSIONS:** We report a feasible animal model for IC of the colon and terminal ileum. Histological damage was maximal between the 1st and the 6th day following IC but by day 21 recovery was complete in two-thirds of the cases. There was no evidence in this preliminary IC model that would suggest neovascularization as an adaptive mechanism.

**Keywords:** delay phenomenon, ischemic conditioning, esophageal replacement, esophagectomy, colon



*“Lo que no me mata me hace más fuerte”*

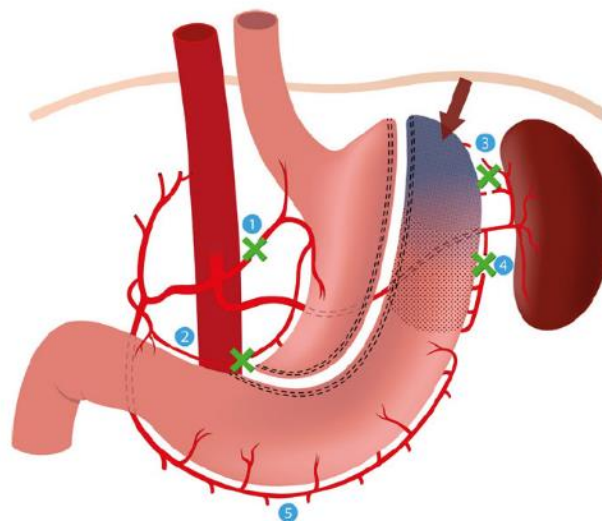
Friedrich Nietzsche

## 1. INTRODUCCIÓN

La resección quirúrgica del esófago (esofaguetomía) es una de las intervenciones más complejas del tracto digestivo y con una importante morbimortalidad asociada[1]. Está indicada en enfermedades neoplásicas y en otras situaciones que requieren la exéresis del esófago (perforación, traumatismo, ingesta cáustica, complicaciones de cirugías esofagogástricas y/o torácicas).

Tras una esofaguetomía, es necesario restablecer el tránsito digestivo para que el paciente pueda alimentarse por boca. Si bien se puede administrar nutrición directamente al intestino a través de una yeyunostomía, la imposibilidad ingerir alimentos por boca condiciona un deterioro sustancial en la calidad de vida del paciente.

El órgano de elección para reemplazo esofágico en el adulto es el estómago, seguido por el colon y por último, el intestino delgado[1]. Para que cualquiera de estos tres órganos pueda ser ascendido a través del tórax y realizar una anastomosis al esófago remanente, se requiere una movilización amplia que habitualmente implica la sección de pedículos vasculares con la consecuente disminución del aporte sanguíneo (**Figura 1**).



**Figura 1.** Vascularización arterial gástrica 1: arteria gástrica izquierda, 2: arteria gástrica derecha, 3: vasos cortos, 4: arteria gastroepiploica izquierda, 5: arteria gastroepiploica derecha. La confección de una gastroplastia solo preserva la arteria gastroepiploica derecha. La zona más susceptible de isquemia es la punta de la gastroplastia (flecha marrón). Fuente: Grimminger[2]

El principal determinante de las complicaciones del reemplazo esofágico es la isquemia de la plastia (es decir, el conducto que reemplaza al esófago: si es estómago, gastroplastia, si es el colon, coloplastia). En cirugía plástica, la confección de colgajos cutáneos largos plantea un problema similar que es la necrosis del extremo del colgajo. En el siglo XV, Tagliacozzi, cirujano italiano considerado uno de los padres de la cirugía plástica moderna[3], describió que cuando la movilización de un colgajo se realizaba por etapas esperando unas semanas antes de completar la movilización, los tejidos tenían oportunidad de recuperarse y el área de necrosis del extremo del colgajo era más pequeña que cuando se realizaba en una sola etapa (**Figura 2**). A esta estrategia se la denominó posteriormente como fenómeno de retraso o *delay phenomenon*.



**Figura 2.** Colgajo con sección diferida del pedículo descrita por Tagliacozzi [3].

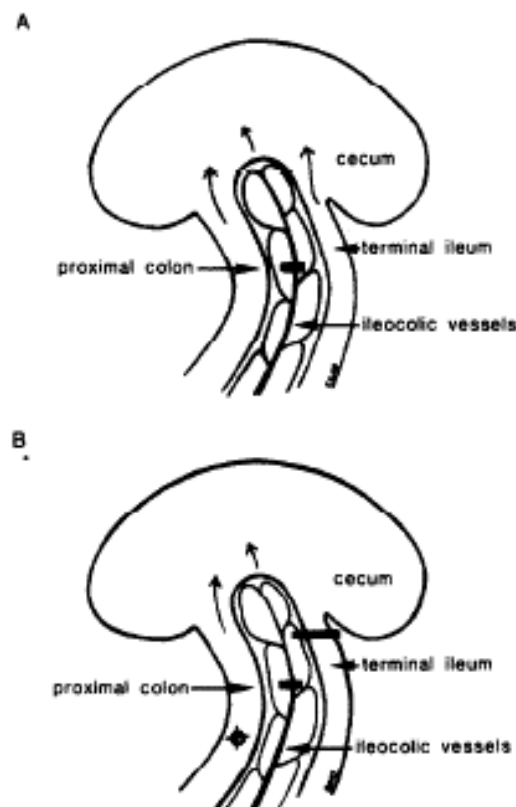
Basado en esta premisa, Urschel[4] en 1993 planteó la hipótesis de que la aplicación del *delay phenomenon* podría mejorar la vascularización de la gastroplastia, mediante la ligadura quirúrgica de la arteria gástrica izquierda semanas antes de la confección de la gastroplastia. Akiyama *et al*[5] en 1996 publicaron los resultados de una estrategia similar mediante embolización por vía endovascular.

Como se detallará más adelante, en varios modelos experimentales y posteriormente en estudios clínicos se demostró que el *delay phenomenon* (también conocido como acondicionamiento

isquémico preoperatorio, AIP) proporcionaba una mejor irrigación de la gastroplastia en especial en la punta, lugar donde es más susceptible a la isquemia (**Figura 1**) y que además es donde se realiza la anastomosis con el esófago, en comparación con las gastroplastias no acondicionadas. Metaanálisis recientes[6,7] señalan que el AIP podría disminuir el riesgo de dehiscencia anastomótica y que además es una técnica segura con una baja morbimortalidad[8,9].

No siempre se puede usar el estómago para el reemplazo esofágico. Por sus características vasculares y anatómicas, el colon es el segundo órgano de elección y comparte el mismo problema de la posibilidad de dehiscencia anastomótica y necrosis de la plastia. Dados los resultados favorables del AIP del estómago, esta Tesis Doctoral plantea el estudio inicial del acondicionamiento isquémico del íleon terminal y colon derecho en un modelo experimental en ratas.

En la literatura, solo existe un estudio similar publicado por los cirujanos plásticos Souther y Vistnes en 1975(**Figura 3**) [10].



**Figura 3.** Esquema de acondicionamiento isquémico ileocólico. A. Vasos ileocólicos ligados (barra). El aporte vascular de ciego se realiza a través de las arcadas anastomóticas y el mesenterio (flechas). B. Vasos ileocólicos e íleon con la arcada adyacente ligada (barras). El aporte vascular al ciego se realiza a través de la arcada cecal y el mesenterio (flechas). Fuente: Souther et al[10]



## 1.1 Acondicionamiento isquémico

### a. Nomenclatura

Existe cierta confusión en la terminología del acondicionamiento isquémico (o *delay phenomenon*), que se analiza a continuación.

En primer lugar, la publicación de Urschel en 1993[4] habla de *transplant delay* y en publicaciones sucesivas de *delay phenomenon* e *ischemic conditioning* como sinónimos. El *delay phenomenon* es un término empleado con frecuencia en la literatura, principalmente en el ámbito de la cirugía plástica y se usa como sinónimo de *vascular delay* o *surgical delay*, pone énfasis en el tiempo que hay que esperar para el desarrollo de los mecanismos adaptativos de los tejidos y es inespecífico puesto que no menciona la isquemia. Otros conceptos relacionados pero diferentes son *medical delay*, *pharmacological delay* o *chemical delay* y hacen referencia a la administración de fármacos que inducen una respuesta similar a la producida por la supresión sanguínea[11,12]. Akiyama[5] en 1996 menciona sencillamente la “terapia de embolización preoperatoria”.

En segundo lugar, en inglés es frecuente el empleo del término “*conditioning*” para varios fenómenos relacionados con la respuesta a los tejidos a isquemia transitoria o definitiva; según el diccionario Merrian Webster[13] se define *conditioning* como:

“1: *The process of training to become physically fit by a regimen of exercise, diet, and rest also: the resulting state of physical fitness.*”

2: *A simple form of learning involving the formation, strengthening, or weakening of an association between a stimulus and a response*”.

Es decir, el término “*conditioning*” hace referencia a una preparación para algo. Se podría traducir al castellano como condicionamiento o acondicionamiento. Según el diccionario de la Real Academia de la Lengua Española[14], condicionar se define como “influir de manera importante en el comportamiento de alguien o en el desarrollo de algo”, es decir, tiene más una connotación relativa a la conducta, mientras que acondicionar se define como “disponer o preparar algo de manera adecuada”. Por eso se hemos preferido el uso del término “acondicionamiento”.

En tercer lugar, hay una serie de términos en las publicaciones que son usados como sinónimos cuando se refieren a conceptos diferentes, a veces mezclándolos sin distinción como ocurre en la revisión de Hamilton[15] que usa de forma equivalente expresiones como *delay phenomenon*, *vascular delay* e *ischemic preconditioning*. Además, existen otras vertientes del estudio del

*ischemic conditioning* como el trabajo pionero de Murry[16] en un modelo canino de isquemia cardiaca donde el estímulo isquémico es temporal, mediante ciclos de clampaje arterial durante unos minutos, permitiendo luego la reperfusión, siendo estos ciclos cortos de isquemia una manera de preparar al tejido para una isquemia prolongada; lo denominó *preconditioning with ischemia*. Después de Murry se han descrito muchos otros modelos de acondicionamiento en otros órganos, a destacar los estudios realizados en intestino delgado e hígado en contexto de modelos de trasplante. También se describieron otros conceptos como el postcondicionamiento (tras un periodo de isquemia temporal prolongada se expone al tejido a periodos breves de isquemia) y el condicionamiento remoto (efecto protector de la isquemia de un órgano en la isquemia de otro órgano a distancia). La respuesta de los tejidos a la isquemia dependerá de la forma en la que se la realice, y eso tendría que estar reflejado en la nomenclatura. En esta Tesis se define el **acondicionamiento isquémico** como una respuesta adaptativa a un estímulo isquémico **permanente**. Para evitar confusiones, sería recomendable reservar el término *ischemic conditioning* o acondicionamiento isquémico para la isquemia permanente, e *ischemic preconditioning* o *ischemic postconditioning* cuando la isquemia es temporal.

Por último, el acondicionamiento isquémico en este contexto se realiza previo a la cirugía principal que es la realización de una plastia para reconstrucción de tránsito digestivo, lo que se aclara con la expresión “preoperatorio”.

En conclusión sobre la nomenclatura, pensamos que en castellano el término **acondicionamiento isquémico preoperatorio** es el más preciso, y que la traducción más adecuada al inglés sería “*preoperative ischemic conditioning*”. El término *delay phenomenon* está muy arraigado en la literatura como veremos a continuación, y a fines prácticos lo emplearemos como sinónimo de acondicionamiento isquémico.

### ***b. Mecanismos del acondicionamiento isquémico:***

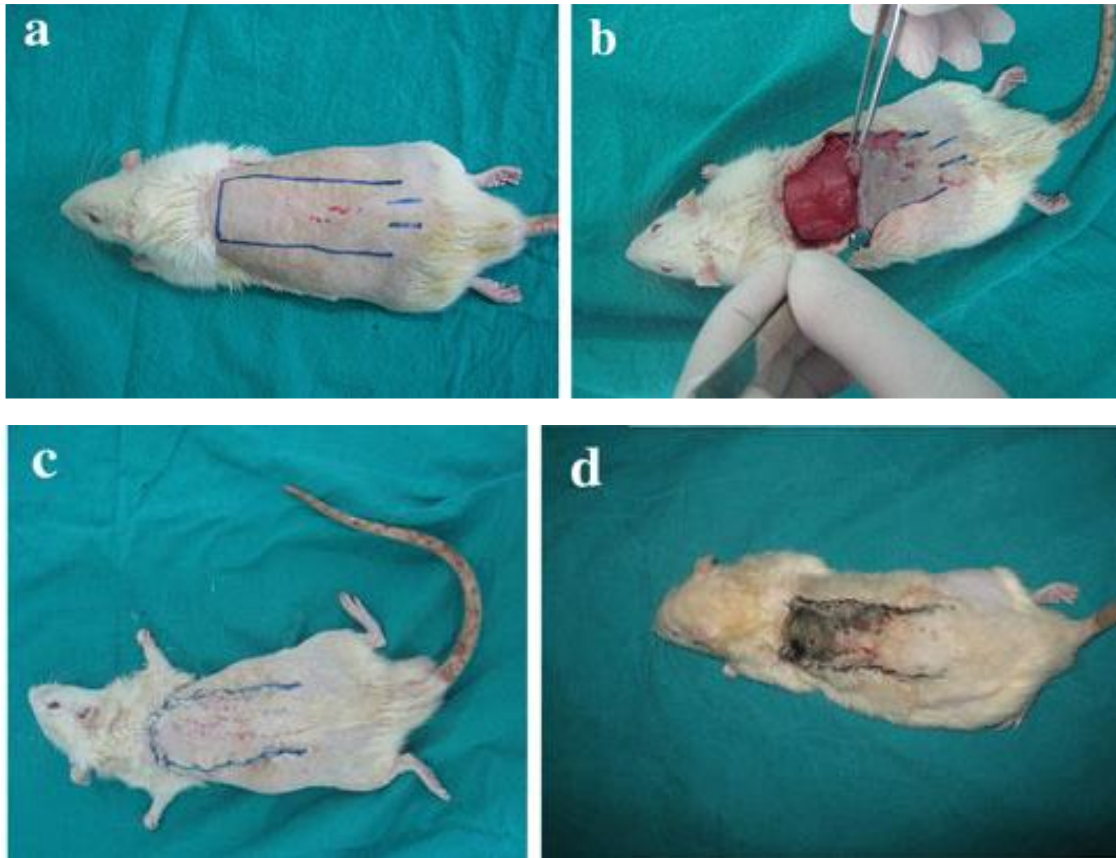
La aplicación terapéutica del *delay phenomenon* data del siglo XV. Gran parte del conocimiento proviene de grupos de investigación de cirugía plástica en la aplicación de colgajos cutáneos, con dos objetivos claros: disminuir la probabilidad de necrosis del extremo distal del colgajo y permitir la confección de colgajos de mayor tamaño[17]. Myers en 1969[18] afirmaba “si un colgajo cutáneo pediculado es elevado en dos o tres etapas, el aporte vascular es mejor que si se hace en un solo paso; esto es un **hecho quirúrgico** bien conocido y acertadamente denominado *delay phenomenon*”. Es decir, el acondicionamiento isquémico tiene por objetivo fraccionar la agresión isquémica, permitiendo que el tejido se recupere para poder responder mejor ante una

segunda agresión isquémica. Se sabe muy poco acerca de los mecanismos de acondicionamiento isquémico en el tracto gastrointestinal[19].

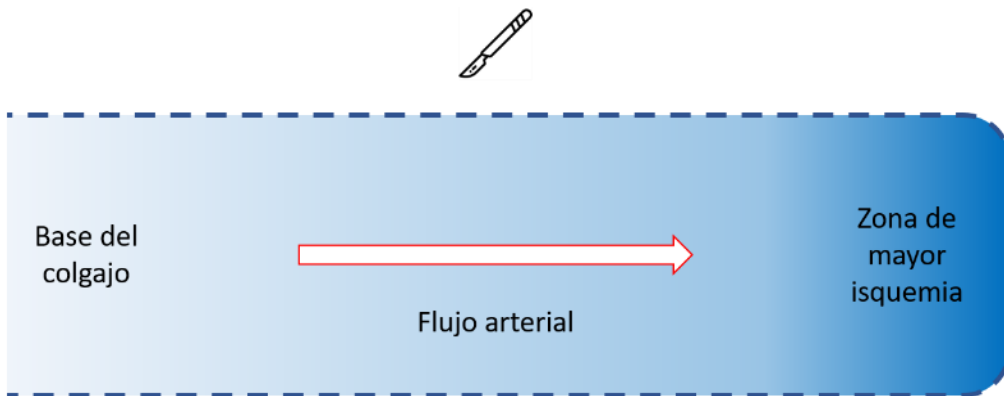
Si bien este conocimiento empírico es de hace siglos, prácticamente todos los artículos que hablan del *delay phenomenon* afirman que los mecanismos no están del todo dilucidados. La investigación de los mecanismos del *delay phenomenon* tiene dos vertientes: el estudio de las modificaciones a nivel vascular y las adaptaciones a nivel celular. Ambos mecanismos tienen sus propios componentes, pero interactúan ampliamente, lo que hace difícil explicar el *delay phenomenon* mediante una teoría unificada.

Los estudios sobre las modificaciones vasculares se han realizado principalmente por equipos de cirugía plástica en colgajos cutáneos, mientras que el estudio de la respuesta celular a la isquemia proviene de unos grupos más heterogéneos (cardiología, trasplante, nefrología, cirugía vascular, neurología, etc).

La forma habitual de realizar un colgajo aleatorio cutáneo consiste en seccionar un área de piel y tejido subcutáneo y trasladarlo a la zona receptora (**Figuras 4 y 5**).



**Figura 4.** Diseño de un colgajo cutáneo en rata. a) Marcaje del colgajo dorsal. b) Elevación del colgajo. c) Sutura y recolocación. d) Aspecto al 7mo día postoperatorio. Fuente: Gumus et al[20]

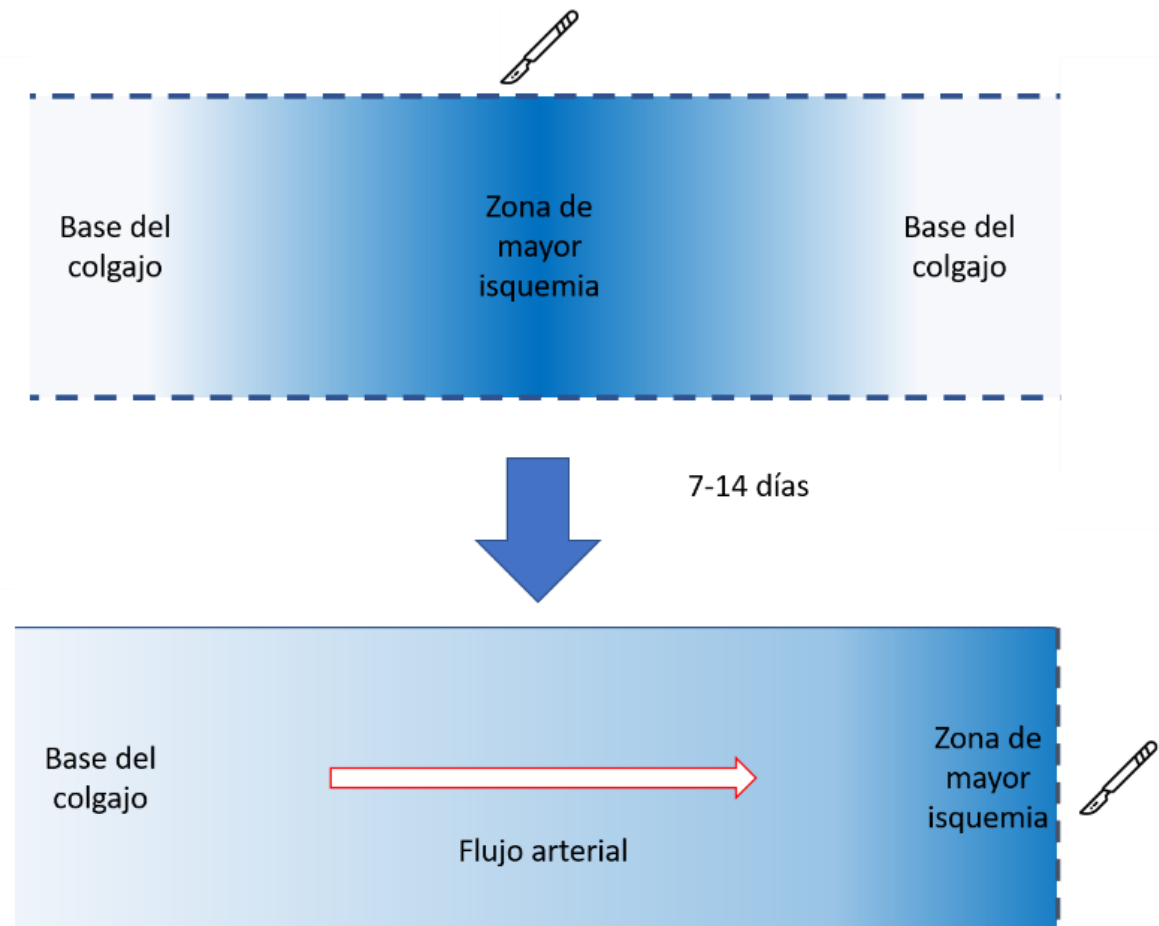


**Figura 5.** Esquema del flujo sanguíneo en un colgajo cutáneo. La línea discontinua señala la zona de sección.

En el *delay phenomenon*, el mismo colgajo se realiza en dos pasos: primero las secciones laterales y se despega el colgajo del lecho, se esperan unos días (entre 7 y 14) y luego se completa la sección del colgajo (**Figuras 6 y 7**). Con el *delay phenomenon* el área viable de colgajo puede aumentar entre de 30 a 40% en comparación con un colgajo no acondicionado.



**Figura 6.** *Surgical delay* mediante la incisión de ambos bordes longitudinales de un colgajo de 3 x 10 cm en el dorso de cada rata. En el siguiente paso el colgajo se levanta por completo. Fuente: Du et al[21]



**Figura 7.** Esquema de una técnica de acondicionamiento isquémico en un colgajo cutáneo. En la primera intervención se realiza la sección de ambos bordes cutáneos (líneas discontinuas) y se despega de los tejidos profundos. Una o dos semanas después, en un 2do tiempo se completa la sección del colgajo (línea discontinua derecha).

## **I. Respuesta vascular al delay phenomenon**

“La cirugía plástica es una batalla constante entre el aporte vascular y la belleza”

Harold Gillies, 1957[22]

A continuación, se revisan los estudios más relevantes de la literatura sobre los cambios vasculares en el *delay phenomenon* en los colgajos cutáneos.

El artículo más antiguo sobre los mecanismos del *delay phenomenon* registrado en Pubmed y además considerado uno de los pilares en esta área es de Mcfarlane et al en 1965[23], aunque este autor cita trabajos previos de principios del siglo XX de autores como Gillies, German y Braithwaithe entre otros. El estudio de Mcfarlane analizó los mecanismos del *delay phenomenon* en 4 aspectos:

- cambios vasculares en el colgajo mediante corrosión
- cambios microvasculares histológicos
- difusión de fósforo radioactivo para determinar la perfusión
- captación de rubidio a nivel intracelular como marcador de metabolismo

Estos autores observaron que en un grupo de animales sacrificados al 5to día posterior al acondicionamiento, había una hipertrofia de las arterias de mayor tamaño y una reorientación de los vasos más pequeños en comparación al grupo control, y que el tercio distal del colgajo prácticamente no se rellenaba con metacrilato. En otro grupo de animales sacrificado a los 25 días del acondicionamiento, el patrón vascular se había recuperado y era similar al grupo control. Como limitación, el metacrilato puede progresar hasta vasos con cierto calibre lo cual impide estudiar la microvascularización. En el estudio de la perfusión con fósforo observó que el flujo se mantenía bajo en ambos grupos. El estudio del metabolismo mediante rubidio indicó que había hipoxia al inicio que posteriormente mejoraba.

Myers et al [18,24] publicaron dos estudios en 1969 y 1971 donde coinciden con Mcfarlane en que el *delay phenomenon* aumenta la supervivencia del colgajo y permite realizar colgajos de mayor tamaño; hay cambios en los patrones vasculares al inicio, pero luego se normalizan, y esto ocurre de forma similar en ratas, conejo y cerdos, aunque en las ratas el efecto beneficioso tarda más tiempo en estabilizarse.

Reinish et al en 1974[25] publican un estudio donde se analizan las características de la circulación microvascular de los colgajos con y sin acondicionamiento y el efecto de un *delay phenomenon* químico por simpaticolisis con 6 hidroxidopamina. Un aumento global del flujo

sanguíneo en el colgajo no siempre se traduce en un mayor aporte de oxígeno a la célula, dada la presencia de *shunts* arteriovenosos ricamente inervados. Cuando se realiza el colgajo se seccionan nervios, los *shunts* pierden el tono vascular y se dilatan, lo cual produce un aumento del flujo en los vasos de mayor tamaño, pero una disminución de la circulación a nivel capilar que es donde se produce el intercambio de nutrientes que necesita la célula.

En el caso del *delay phenomenon* de colgajos bipediculados se produce la dilatación de los *shunts* pero como el aporte vascular es mayor, no se produce necrosis; con el tiempo, los *shunts* recuperan su tono y al seccionar uno de los pedículos no se produce su dilatación por denervación con lo que se mantiene la circulación capilar sin producir isquemia. El estudio de Reinish et al. concluyen que el mecanismo del *delay phenomenon* es impedir la pérdida de tono en los *shunts* arteriovenosos y con ello evita la disminución del flujo a nivel capilar, cuya consecuencia final es la hipoxia y muerte celular. Este, es uno de los primeros estudios en que se propone el “acondicionamiento químico” mediante simpaticolisis y el “acondicionamiento eléctrico”.

Thompson et al. en 1977[26] recopilan las teorías sobre el acondicionamiento isquémico, haciendo hincapié principalmente en la recuperación del tono simpático, principalmente en referencia al trabajo de Reinish et al. Thompson et al. plantean además que el modelo de estudio del *delay phenomenon* en ratas no es del todo adecuado, dadas las diferencias anatómicas de la vascularización cutánea con el humano.

Finseth et al. en 1978 [27] diseñaron un interesante modelo de colgajo para estudiar cada componente del acondicionamiento: la sección vasculonerviosa completa, solo sección arteriovenosa preservando la inervación, solo sección nerviosa preservando la vascularización y el efecto de la ligadura solo de arteria y vena por separado. El modelo empleó un colgajo de la totalidad de la pared abdominal en ratas realizando el *delay phenomenon* a nivel del eje vasculonervioso de la ingle. El *delay phenomenon* aumentó el área de supervivencia del colgajo en todos los casos, pero lo más llamativo es que la sección nerviosa exclusiva tenía un efecto apenas menor que el de la sección vasculonerviosa completa, y que la sección nerviosa tenía un mayor efecto que la sección arterial y venosa conservando los nervios (**Tabla 1**). Nuevamente, la conclusión es que la vía común para desencadenar el *delay phenomenon* es la vasodilatación.

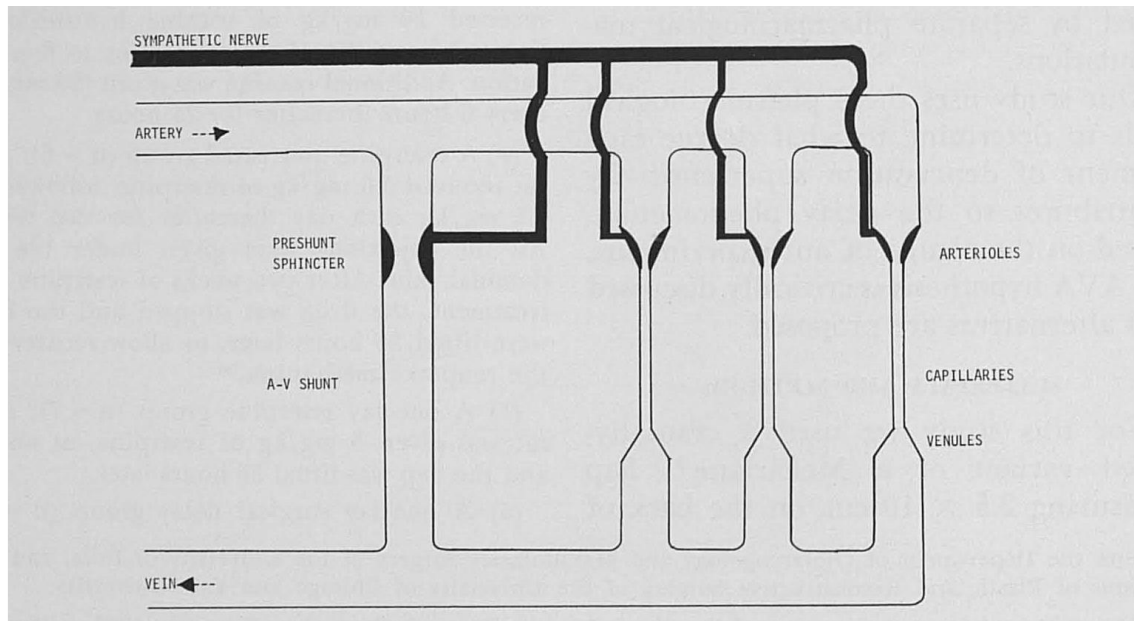


**Tabla 1.** Resultados de los procedimientos de *delay* 6 semanas antes de realizar el colgajo

<u>Grupo experimental</u>	<u>Área de colgajo viable (cm<sup>2</sup>)</u>
Control	10,41
Sección de arteria, vena y nervio	38,40*
Sección nerviosa solamente	34,02*
Sección arteriovenosa solamente	27,28*
Sección arterial	20,36*
Sección venosa	19,58*

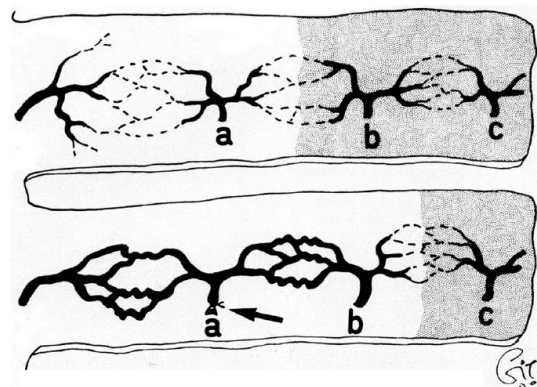
\* $p < 0,01$  vs grupo control. Fuente: Finseth et al en 1978 [27]

Cutting et al. [28] en 1978 analizaron una simulación del efecto del *delay phenomenon* mediante fármacos (cocaína y reserpina) y su interacción a nivel de la inervación del esfínter precapilar (**Figura 8**) y encontraron que la acción a este nivel era escasa; por otro lado propusieron la hipótesis de que el aumento del flujo arteriolar era debido a la relajación del músculo liso. Guba [29] en 1979 también plantea que en un modelo en cerdos, el *delay* produce un aumento del flujo principalmente entre los 4 a 12 días posterior al *delay*, que este aumento del flujo se correlaciona con la supervivencia del colgajo, pero que pasado este tiempo el flujo se hace más constante y no se relaciona con la supervivencia



**Figura 8.** Esquema de inervación y regulación de los esfínteres precapilares y *shunts*, Fuente: Cutting [28]

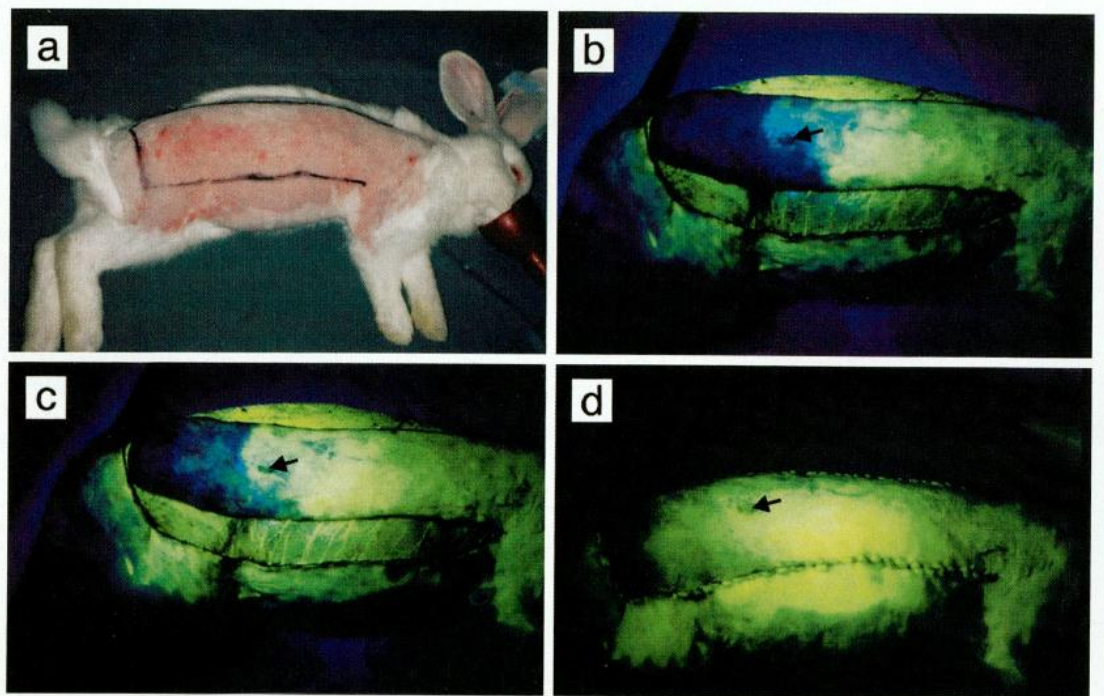
El grupo de Taylor et al. del departamento de Cirugía Plástica del Royal Melbourne Hospital, Universidad de Melbourne, Australia, tienen una importante línea de investigación que iniciaron con en los años '70 [30]. Los autores se centraron en el sitio y la secuencia donde ocurren los cambios vasculares [31], concluyendo que el principal mecanismo del *delay phenomenon* es la dilatación de los vasos *choke*, mientras que la neovascularización prácticamente no tiene ningún papel (**Figura 9**).



**Figura 9.** Representación gráfica del mismo colgajo con y sin *surgical delay* que ilustra la línea de necrosis y los cambios en los vasos *choke*. (Arriba) El territorio adyacente a a es capturado de forma segura, y la línea de necrosis ocurre en la interfaz de los vasos *choke* del vaso b. (Abajo) El vaso a ha sido ligado antes de realizar el colgajo. Nótese el efecto de los vasos *choke* en la línea de necrosis.

Fuente: Taylor et al [22]

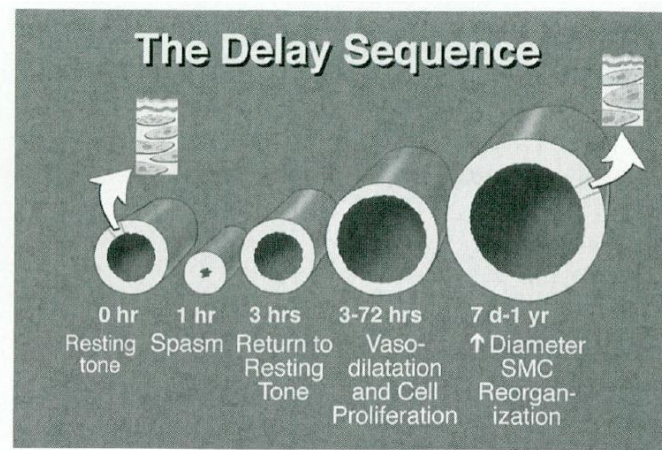
Uno de los estudios más importantes de este grupo fue realizado en 200 conejos y 18 perros, siendo analizados los tejidos mediante fluoresceína (**Figura 10**), angiografía (**Figuras 12, 13 y 14**), microscopia de luz, inmunohistoquímica y microscopía electrónica. Se observó de forma consistente que había un periodo inicial de vasoconstricción que se resolvía a las 3 horas del postoperatorio, seguido por una activa y progresiva dilatación de los vasos *choke* que fue más marcada entre las 48 y las 72 horas (**Figura 11**). La administración in vivo de tinción con fluoresceína reveló un interesante paralelismo en el cual los vasos *choke* fueron una barrera temporal para el flujo de fluoresceína inmediatamente después de realizar el colgajo, y esta barrera temporal continuó impidiendo el flujo a la punta del colgajo donde los colgajos había sido *delayed* por periodos superiores a las 72 horas. Posteriormente, no hubo obstrucción del flujo de fluoresceína a lo largo del colgajo.



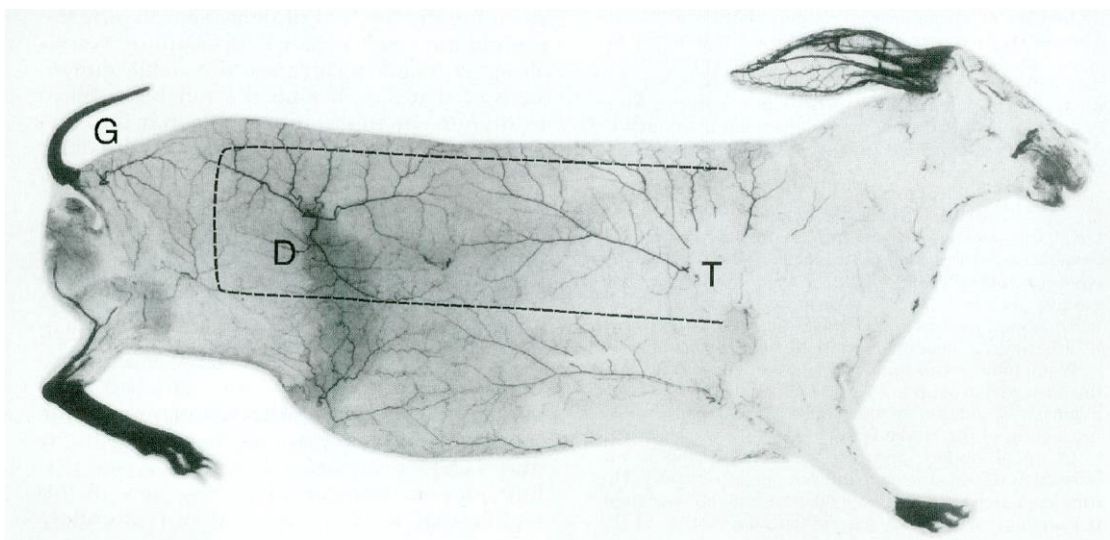
**Figura 10.** Valoración *in vivo* de la vascularización de un colgajo cutáneo en conejo. (Arriba, izquierda) Diseño preoperatorio del colgajo mediante Doppler. (Arriba, derecha) Fluorescencia al minuto de la inyección de la arteria circunfleja iliaca profunda. (Abajo, izquierda) Fluorescencia a los 5 minutos de la ligadura de la arteria circunfleja iliaca profunda. (Abajo, derecha) Fluorescencia a los 30 minutos de la ligadura. El entretencimiento inicial de la fluoresceína ocurre en la zona de los vasos *choke* entre los vasos circunflejos iliacos profundos y los toracodorsales. Fuente: Dhar et al[31]

Durante este periodo precoz de 3 días, la microscopia convencional reveló una disminución del grosor de la pared de los vasos. A nivel inmunohistoquímico se observó un aumento de la división celular que fue máximo entre las 24 y 72 horas en todas las capas de la pared de los vasos *choke*. Durante ese mismo intervalo postoperatorio, la microscopia electrónica reveló cambios

fenotípicos en el músculo liso desde las células contráctiles a las sintéticas. También se observó hipertrofia de las células musculares lisas. El endotelio vascular, que inicialmente se observaba denudado, retornó a un aspecto sano después de la primera semana. Cuando se realizó el seguimiento por periodos más prolongados, en el colgajo con *delay* al cabo de 1 año presentaba una dilatación permanente e irreversible de los vasos *choke* y un engrosamiento de su pared. Estos cambios se observaron en varios animales y en tejidos diferentes. Como conclusión, para estos autores el principal mecanismo del *delay phenomenon* es la dilatación permanente de los vasos *choke* (**Figura 11**).

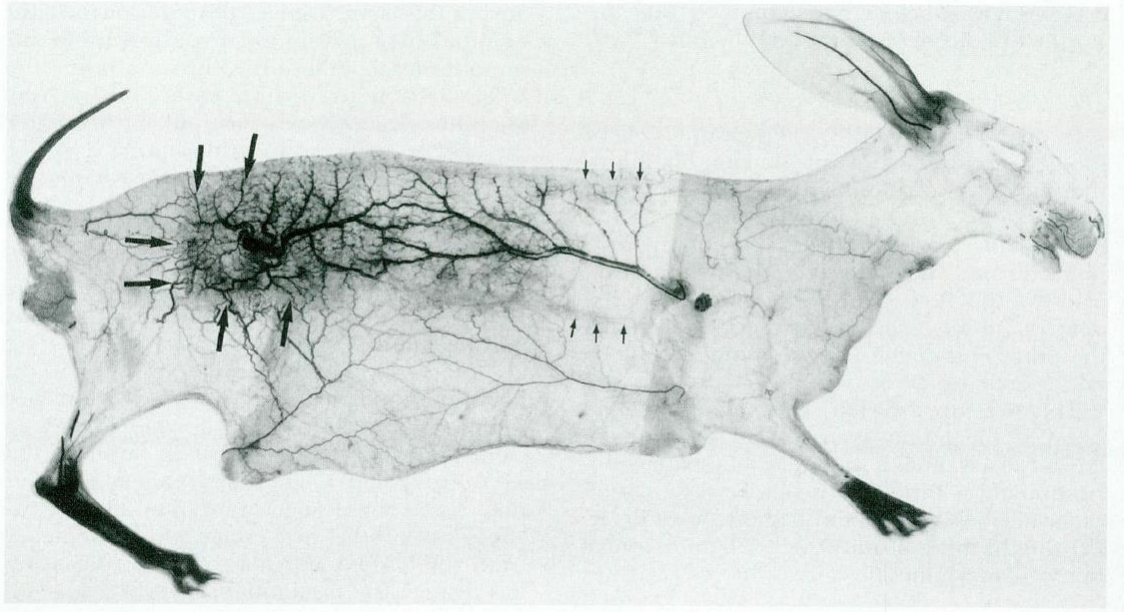


**Figura 11.** Secuencia del *delay phenomenon*. Fuente: Dhar et al[31]

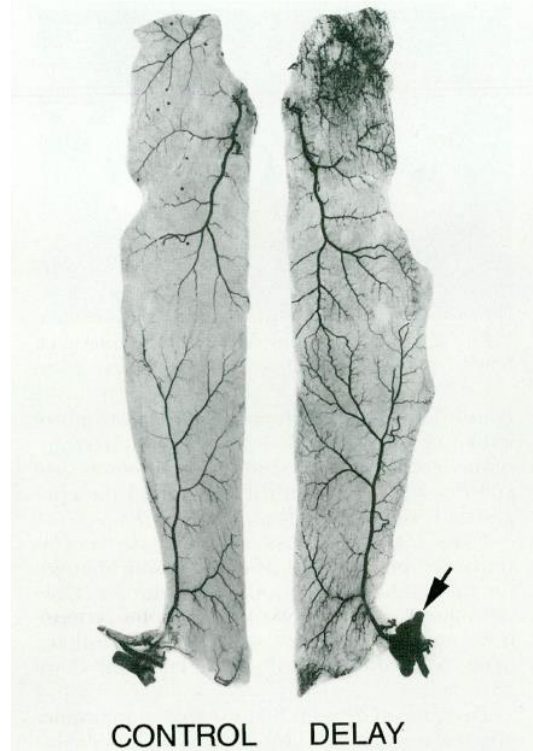


**Figura 12.** Arteriograma de un conejo no intervenido. Vasos toracodorsales (letra T), circunflejos ilíacos profundos (letra D), ambos se incluyen en el diseño del colgajo (línea de puntos). En ocasiones se incluye el territorio de las arterias glúteas (letra G). Fuente: Dhar et al[31]





**Figura 13.** Arteriograma de un colgajo al cabo de un mes; previamente se le realizó el *delay phenomenon*. Nótese la diferencia de calibre de los vasos (flechas) cruzando el colgajo, más a nivel de la punta probablemente en respuesta al descenso progresivo de la tensión de oxígeno.



**Figura 14.** Arteriograma de un control (izquierda) y de un colgajo sometido a *delay phenomenon* (derecha) de músculo recto abdominal de un perro al 7mo día postoperatorio. Nótese la dilatación de los vasos *choke* en el colgajo de la derecha, que se realizó mediante la ligadura de la arteria epigástrica inferior (flecha). Fuente: Dhar et al[31]

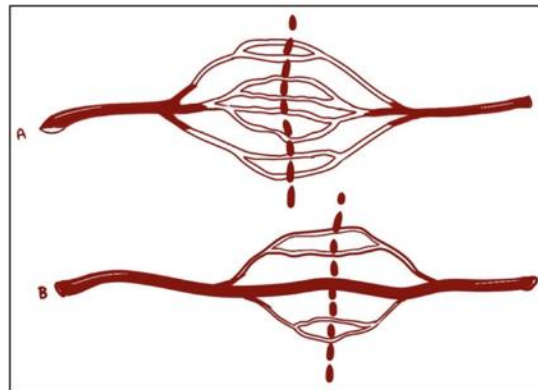
Aydin et al publicaron en 2003[32] los cambios vasculares en colgajos cutáneos objetivados mediante doppler y el efecto que producía el *delay phenomenon*. Similar a lo encontrado por otros autores, en las primeras horas después de la realización del colgajo se produce una importante vasoconstricción y posteriormente un estado de hiperemia en la parte proximal del colgajo. Los autores postulan que el *delay phenomenon* es efectivo no solo promoviendo la dilatación de los vasos *choke* sino también impidiendo que la hiperemia proximal produzca el robo del flujo a la parte más distal del colgajo.

## **II. Concepto de angiosoma e implicación en el delay phenomenon**[33]

Taylor y Palmer[30] tras realizar un extenso estudio en cadáveres, propusieron en 1989 el concepto de “angiosoma” definido como un territorio anatómico tridimensional compuesto de piel y tejidos más profundos vascularizados por una arteria fuente específica y una o más acompañantes. El límite del angiosoma está establecido por un perímetro de vasos de conexión que lo conectan con los angiosomas adyacentes para formar una red continua. Estos vasos de conexión se denominan vasos “*choke*” y habitualmente mantienen un calibre reducido, estando prácticamente inactivos en situaciones normales. Sin embargo, tienen la capacidad de dilatarse y activarse durante momentos de mayor demanda para facilitar el aumento del flujo sanguíneo[33]. Los vasos *choke* con frecuencia se confunden con los *shunts*. La diferencia entre ambos sería que los *shunts* normalmente están abiertos, mientras que los vasos *choke* solo se abren en las siguientes situaciones (**Figura 15**):

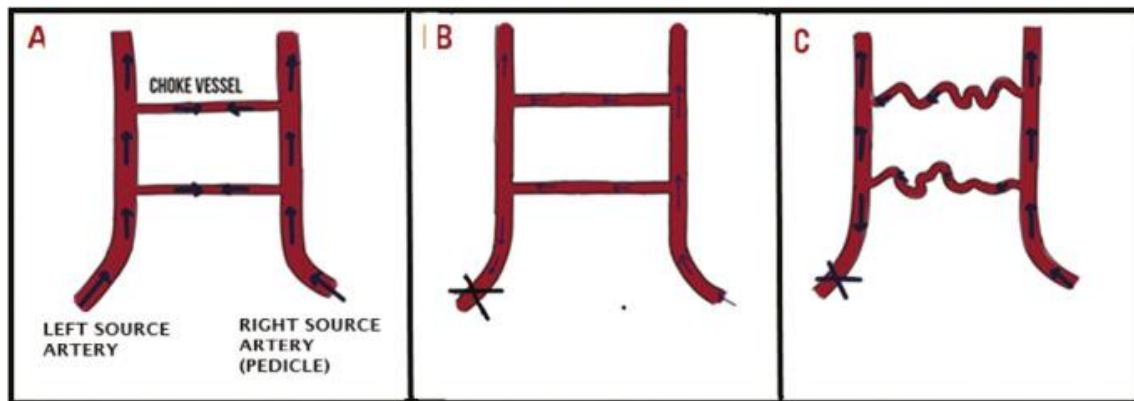
- **Hipoxia e isquemia:** Principal estímulo para la apertura de los vasos *choke*. La línea que demarca una zona de necrosis habitualmente corresponde con el límite entre dos angiosomas
- **Alteración en el flujo sanguíneo y fuerzas mecánicas:** La remodelación de los vasos *choke* se produce a través del proceso de arteriogénesis (brotación de microvasos a partir de una red capilar preexistente). La arteriogénesis en las arterias colaterales es precipitada por fuerzas mecánicas. Cuando una arteria de conductancia principal está bloqueada por embolia o lesión, el flujo sanguíneo a los angiosomas se interrumpe y se crean diferenciales de presión dentro de los vasos *choke*. Esto provoca un estrés por roce en la pared del vaso *choke*, seguido de la ruptura de la túnica íntima, el crecimiento en número y tamaño de las células de los vasos, elongación de las células del músculo liso, arteriogénesis y crecimiento de los vasos *choke*.

- **Inflamación:** Existen mediadores inflamatorios involucrados en la remodelación de los vasos *choke*, como la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 8 e interleucina-6. [21,22] TNF- $\alpha$ , MCP-1, factor inducible por hipoxia (HIF) -1 $\alpha$  y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteínas de choque térmico (HSP), CD11b, ICAM-1 y la MMP-2 (metaloproteinasa de matriz 2).



**Figura 15.** Vasos *choke* y *shunts* verdaderos que conectan angiosomas adyacentes. (A) Vasos *choke* entre arterias adyacentes (tamaño de vaso reducido). (B) *Shunt* verdadero entre arterias adyacentes (tamaño de vaso normal). Fuente: Jajoria et al[33]

En el *delay phenomenon*, tras la obstrucción de los vasos de un angiosoma tanto los vasos *choke* como los *shunts* se dilatan, primero por dilatación pasiva y posteriormente presentan un crecimiento activo. Durante la fase de crecimiento activo, las paredes de los vasos *choke* se agrandan por hipertrofia e hiperplasia, se dilatan y se vuelven más tortuosos a partir del 7º día posterior al *delay* (**Figura 16**).



**Figura 16.** Secuencia de eventos con alteración del flujo sanguíneo en un colgajo de territorio vascular antes y 7 días después de la elevación del colgajo. La figura muestra la secuencia de cambios en los vasos estranguladores antes y después de la elevación del colgajo en cirugías plásticas y reconstructivas. (A) Muestra vasos de obstrucción en condiciones fisiológicas normales donde encuentran una presión equilibrada de las arterias de origen. (B) Inmediatamente después de la elevación del colgajo hay un desequilibrio en la presión en la zona de estrangulamiento y hay un aumento del flujo sanguíneo en los vasos de estrangulamiento. (C) 7 días después de la elevación del colgajo, los vasos de obstrucción se vuelven tortuosos con el aumento del grosor y el diámetro de la pared del vaso, transformándose en arterias funcionales. Fuente: Jajoria et al[33]

Como conclusión, el mecanismo vascular del *delay phenomenon* en piel y anexos es la remodelación vascular mediante la dilatación y engrosamiento de las paredes de los vasos *choke*, lo que permite un redireccionamiento del flujo sanguíneo en sentido axial de manera que la sangre llegue a la porción más distal del colgajo. La sección nerviosa evita la vasoconstricción inicial tras el segundo evento isquémico. El estudio de estas modificaciones en el tubo digestivo es prácticamente inexistente.

### **III. Neovascularización en el delay phenomenon**

El papel de la neovascularización en el acondicionamiento isquémico es controvertido. Algunos estudios [34] sugieren que es uno de los mecanismos responsables del *delay phenomenon* mientras que otros autores, como el grupo de Taylor[31], no lo han evidenciado.

## **1.2 Acondicionamiento isquémico gástrico**

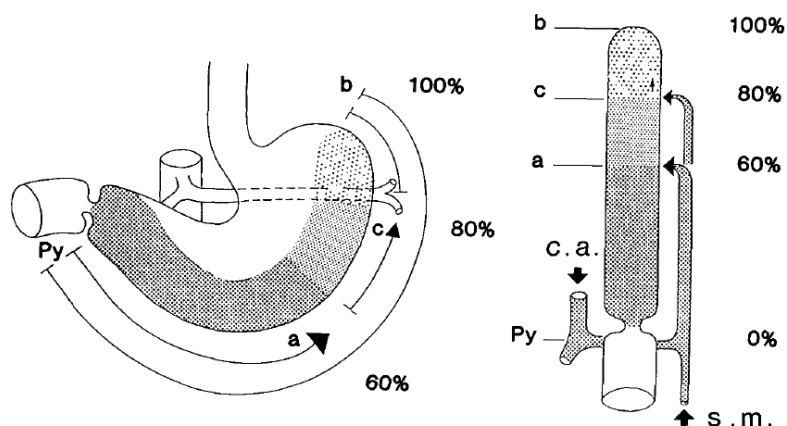
Para el reemplazo esofágico se requiere adaptar un segmento sano del tubo digestivo que pueda cumplir con las funciones del esófago, que consiste fundamentalmente en transportar los alimentos desde la orofaringe al intestino delgado. La confección de una gastroplastia comporta problemas similares a los que se producen en colgajos empleados en cirugía plástica: requieren una amplia movilización de un tejido u órgano seccionando parcialmente su vascularización, para darle una forma alargada y de base estrecha.



El estómago está irrigado por 5 afluentes principales: las arteria gástrica derecha e izquierda, las arterias gastroepiploicas derecha e izquierda y los vasos cortos (**Figura 1**). Para la gastroplastia de reemplazo esofágico se seccionan 3 de los 4 principales afluentes arteriales, preservando solamente la vascularización a través de la arteria gastroepiploica derecha, rama de la arteria gastroduodenal; se puede intentar preservar la gástrica derecha aunque para algunos autores su aporte a la vascularización de la gastroplastia es escaso[35]. La arcada gastroepiploica raramente es completa, pero no se produce la necrosis de la plastia debido a un extenso plexo submucoso[36].

### **a. Cambios vasculares en la gastroplastia[35,37]**

Liebermann et al[35] analizaron la vascularización del estómago tras realizar la gastroplastia de curvatura mayor. Para ello, realizaron la extracción en bloque del estómago con sus conexiones vasculares a la aorta y la porta en 30 cadáveres humanos; para el estudio de la vascularización, inyectaron resina y obtuvieron moldes por corrosión. Mediante esta técnica, objetivaron que la totalidad de la vascularización de la gastroplastia proviene directamente de la arteria gastroepiploica derecha; el 60% de la plastia está vascularizada por ramas directas de esta arteria, un 20% mediante ramas de la arteria gastroepiploica izquierda que se repleciona a través de conexiones arteriales con la arteria gastroepiploica derecha, y el 20% distal (que es la zona peor vascularizada) depende exclusivamente de los plexos submucosos (**Figura 17**). Otro hallazgo significativo es que los cadáveres de personas mayores o con vasculopatía tienen un llenado muy pobre con la resina, lo que imposibilitaba el estudio de los moldes en estos casos.



**Figura 17.** Flujo sanguíneo en la gastroplastia. Los vasos gastroepiploicos derechos irrigan el 60% de la gastroplastia (distancia Py-a). El siguiente 20% se suministra a través del remanente de la arteria gastroepiploica izquierda (a-c), y el 20% más craneal (c-b) se suministra sólo a través de la red microvascular submucosa y mucosa. Eje celíaco (c.a.); vasos mesentéricos (s.m.). Fuente: Liebermann et al[35]

Schroder et al[37] analizaron en fundus gástrico los cambios en la presión de oxígeno y flujo arterial medido por Doppler tras realizar una gastroplastia en cerdos. Estos parámetros disminuyeron un 49% y 74% respectivamente tras realizar la gastroplastia. Además, demostraron que estos cambios son reales a nivel de la propia gastroplastia e independientes del cambio hemodinámico sistémico.

Por último, Sugimachi et al[38] analizaron como afecta el diámetro de la gastroplastia en un modelo canino. Realizaron gastroplastias de diferentes diámetros (6cm, 3cm y 1,5cm) y encontraron que el flujo fue mayor en las gastroplastias de 3cm debido a que se preservaba el plexo submucoso.

### ***b. Modelos experimentales de acondicionamiento isquémico gástrico***

Se han descrito varios modelos experimentales animales de acondicionamiento gástrico realizado mediante ligadura quirúrgica de la arteria gástrica izquierda:

Urschel et al[39] han publicado varios estudios en ratas:

- En 1995[39]: medición del flujo sanguíneo del estómago por Doppler. Encontró que el flujo caía 73% tras el *delay*, y que al día 14 post delay el flujo aumentó a un 81% del valor basal.
- En 1997[40]: analizó la frecuencia de dehiscencia de sutura, presión de ruptura de la sutura y depósito de hidroxiprolina. Encontró que un 27% de las ratas a las que se les realizó gastrotomía sin acondicionamiento tuvieron dehiscencia de sutura, mientras que a ninguna de las que se les realizó *delay*; no hubo diferencias en la presión de ruptura. No hubo diferencia en la concentración de hidroxiprolina en el grupo *delay* vs no *delay*.
- En 1997[41]: estudiaron la confección de la anastomosis gastroesofágica con el objetivo de comparar el flujo sanguíneo mediante Doppler. Los autores concluyeron que en el grupo *delay*, el flujo cayó aproximadamente en un 75% y volvió a valores prácticamente normales a los 14 días. Hubo menos dehiscencia en el grupo *delay* vs control (2/17 vs 6/17 respectivamente).

Otro estudio similar, fue publicado por Alfabet et al[42] en 2003. Se trata de un modelo en ratas donde se realizaba el acondicionamiento mediante la ligadura quirúrgica de la arteria gástrica izquierda. Los autores midieron la microcirculación por láser Doppler. Tras la ligadura de la arteria gástrica izquierda se produjo una caída del flujo del 74% y al cabo de 14 días la restauración del flujo alcanzó límites prácticamente normales.

Mittermair et al[43] en 2008, publicaron también un modelo en ratas. Tras la ligadura quirúrgica de la arteria gástrica izquierda se midió la densidad de capilares funcionales y su diámetro mediante inmunofluorescencia intravital microscópica. La ligadura de la arteria gástrica izquierda produjo una disminución del flujo de aprox 50%. Al cabo de 4 a 8 semanas, la vascularización volvió a valores prácticamente normales. Se observó además una dilatación compensatoria de los vasos gastroepiploicos. Los autores concluyeron que este es el “primer estudio que mide in vivo la vascularización”.

Reavis et al[19] en 2005 publicaron un modelo en zarigüeya. Tras la ligadura quirúrgica de los vasos gástricos derechos, izquierdos y vasos cortos se midió el flujo mediante Doppler. Se identificaron los vasos mediante inmunohistoquímica para factor VIII (von Willebrand). El depósito de colágeno se midió con una tinción específica y un programa informático, y se analizó el subtipo de colágeno mediante inmunohistoquímica. La preservación de las capas musculares se determinó mediante inmunohistoquímica para actina. Encontraron que la vascularización basal era de 20ml/100g de tejido. La ligadura de los vasos produjo una caída del flujo del 73% y en el grupo *delay*. En el grupo *delay*, al momento de la gastroplastia el flujo fue de 16ml/100g, es decir el 80% del flujo basal. Y comparativamente con el grupo *no delay*, el grupo *delay* tenía el triple de flujo (16 vs 5ml/100g). Hubo más depósito de colágeno (es decir, más fibrosis) en el grupo *no delay*. La integridad de la muscular propia y el número de vasos fue mayor en el grupo *delay* (56 vs 36% y 27 vs 38 en campos 20x, respectivamente).

Por último, Lamas et al[34] en 2008 utilizaron un modelo en ratas con ligadura de arteria gástrica izquierda. Los autores determinaron el daño histológico (escala de Chiu), la actividad de caspasa 3, la fragmentación de ADN y la proliferación vascular (Ki67). Concluyeron que el daño se repara a las 2 semanas, hay neovascularización y la muerte celular se produce por necrosis y apoptosis.

### ***c. Resultados clínicos del acondicionamiento gástrico***

La mayoría de estudios clínicos publicados sobre acondicionamiento isquémico gástrico son series de casos o estudios comparativos, y sólo existe un ensayo clínico aleatorizado[44].

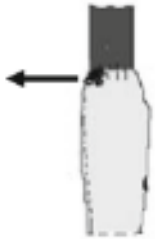
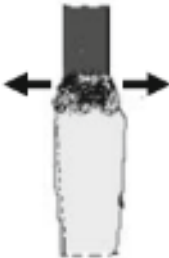
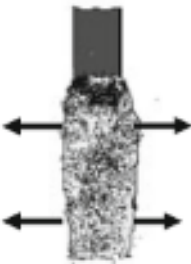
En 2020 se publicaron tres metaanálisis sobre la eficacia del acondicionamiento isquémico gástrico. Aunque todos los autores concluyen que faltan más ensayos clínicos aleatorizados, existen diferencias en cuanto a los resultados en los distintos estudios.

Zhuo et al[45] analizaron 14 estudios con un total de 1705 pacientes. La dehiscencia anastomótica se observó en el 8,5% vs 14,8%, con y sin acondicionamiento, respectivamente (OR=0,57% IC95% 0,40-0,82, P=0,002); la estenosis anastomótica se describió en 9 estudios con una diferencia de 12,1% vs 27,9% con y sin acondicionamiento, respectivamente (OR=0,46% IC95% 0,29-0,71, P=0,0005). No hubo diferencias significativas en la mortalidad.

Kamarajah et al[46] incluyeron 19 estudios con un total de 1596 pacientes. No observaron diferencias significativas en dehiscencia anastomótica o estenosis, morbilidad ni mortalidad. Sin embargo, si hubo una diferencia en la frecuencia de necrosis de la plastia a favor del acondicionamiento isquémico (OR 0,29 IC95% 0,11-0,77 P=0,013).

Michalinos et al[7] incluyeron 15 estudios con un total de 1612 pacientes. Hubo dehiscencia de anastomosis en 10,2% vs 16,8% en pacientes con y sin acondicionamiento, respectivamente (OR=0,73 IC95% 0,53-1,00 P=0,05). Analizaron la dehiscencia anastomótica severa, definida como aquella que requiere cirugía; la frecuencia de dehiscencia severa fue del 1,9% vs 8,7% en pacientes con y sin acondicionamiento, respectivamente (OR=0,27, IC95% 0,14-0,50, P<0,0001). No encontraron diferencias significativas en estenosis anastomótica, morbilidad, mortalidad ni método de acondicionamiento.

Por último, Veeramootoo et al[47,48] proponen el concepto de “fallo del conducto gástrico” (**Figura 18**); el tipo 1 sería ocasionado por un fallo técnico de la anastomosis, el tipo 2 por alteración de la microvascularización y el tipo 3 por una alteración macrovascular que condicione una oclusión de la arteria gastroepiploica derecha. El acondicionamiento isquémico podría prevenir el fallo tipo 2.

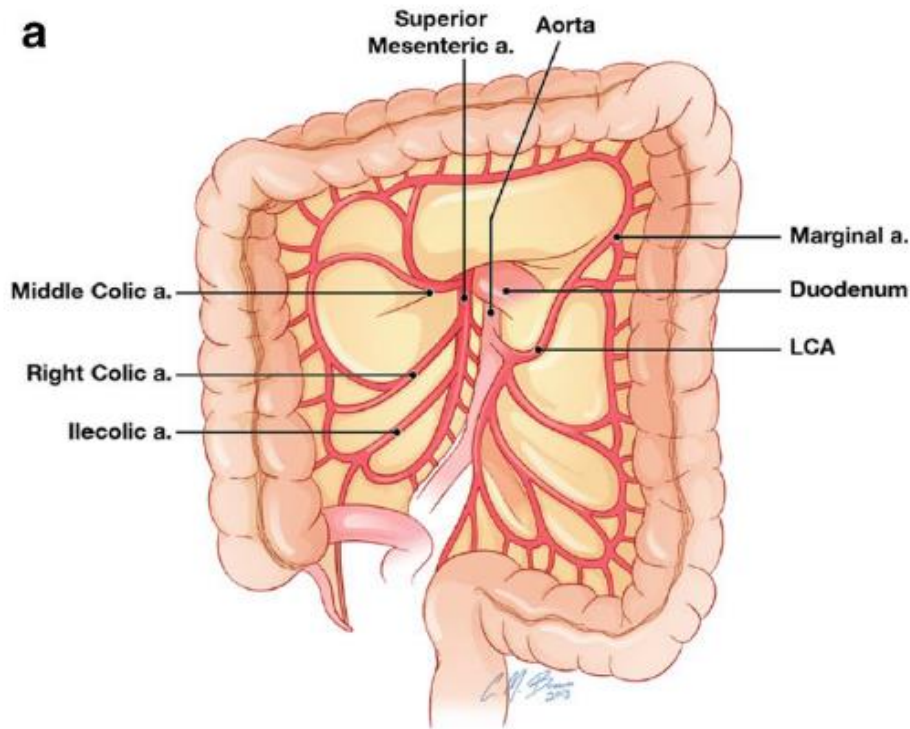
Type	Anatomy
I Simple Anastomotic Leak	
II Conduit Tip Necrosis	
III Complete Conduit Ischaemia	

**Figura 18.** Clasificación del fallo del conducto gástrico después de una esofagectomía. La flecha señala el sitio de la fuga. Fuente: Veeramootoo et al[47]

## 1.3 Reconstrucción esofágica mediante coloplastia

### a. Anatomía vascular del colon e íleon

El intestino delgado y la mitad derecha del colon están vascularizados por la arteria mesentérica superior a través de la arteria ileocólica, arteria cólica derecha y arteria cólica media (**Figura 19**).



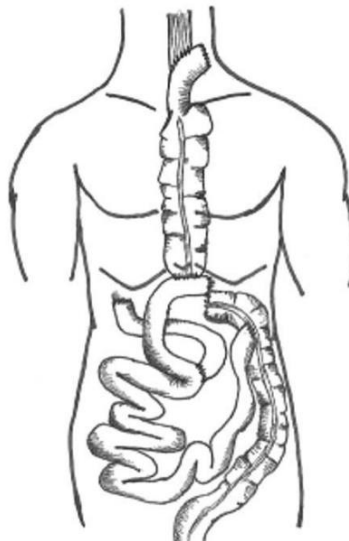
**Figura 19.** Irrigación arterial de colon en el humano. Fuente: Bates et al[49]

El estudio de la vascularización del colon derecho ha tenido un renovado interés en los últimos años debido a la implementación de la resección total del mesocolon en enfermedades neoplásicas. Negoï et al[50] realizó un metaanálisis en 6090 pacientes donde analizó las principales variantes anatómicas. La arteria ileocólica estaba comúnmente presente (99,8%) junto con la vena ileocólica (ICV) (99,7%). La arteria cólica media también estaba presente con frecuencia (94,6%), la mayoría como un solo tronco (88,4%), mientras que el resto estaban ramificadas en dos o tres vasos. La arteria cólica media se originó con más frecuencia de la arteria mesentérica superior (78,7%) aunque en ocasiones podía originarse en la arteria cólica derecha (17,8%), e incluso de otras arterias, pero todas ellas en menos del 1% de los casos. La arteria cólica derecha fue la menos constante, encontrándose en 60% de los casos; habitualmente transcurría anterior a la vena mesentérica superior (89,4%). Cuando estaba presente, se originaba con mayor frecuencia en la arteria mesentérica superior (70,8%), arteria cólica media (15,4%) o arteria ileocólica (13,8%). Las venas solían seguir el mismo trayecto que las arterias.

### ***b. Técnica quirúrgica en la coloplastia***

La primera coloplastia fue realizada por Kelling en 1911 y el primer reemplazo esofágico mediante coloplastia exitoso fue descrito en 1914 por Von Hacker[1]. A diferencia de la gastroplastia que tiene una sola anastomosis (esofagogástrica), la coloplastia tiene 3 anastomosis (esofagocólica, coloyeyunal e ileocólica).

La técnica de la reconstrucción esofágica mediante coloplastia se realiza habitualmente mediante laparotomía [51]. Se procede a la disección de la fascia de Toldt, movilizándolo todo el colon derecho e intraoperatoriamente se confirma la distribución vascular. Se procede al pinzamiento vascular de los vasos ileocólicos y cólicos derechos y se valora la vascularización del injerto a los 10 minutos. Si no presenta signos de isquemia o estasis vascular, se secciona el íleon terminal con una grapadora lineal, se ligan los vasos ileocólicos y cólicos derechos, se realiza la sección del colon transverso y ascenso de la plastia cólica vía mediastino anterior o subcutánea. En caso de que la vascularización tras el pinzamiento no sea satisfactoria, se moviliza el colon izquierdo y se disecan los vasos cólicos izquierdos repitiendo la maniobra de pinzamiento. Si en este caso la vascularización a través de la arcada es correcta, se utiliza la plastia izquierda. En ambos casos la anastomosis cervical se realiza esofagocólica o esofagoileal terminolateral manual con puntos discontinuos. Se realiza anastomosis coloyeyunal en Y de Roux y yeyunoyeyunal. En caso de coloplastia derecha se completa con anastomosis ileocólica, y colocólica, cuando se trata de coloplastia izquierda. La anastomosis coloyeyunal se realiza siempre en Y de Roux, desestimando la anastomosis cologástrica para evitar el reflujo biliar que puede ser causa de colitis.



**Figura 20.** Esquema de ileocoloplastia. Fuente: Farran et al[52]

### **c. Resultados y complicaciones de la coloplastia**

La esofagectomía y reconstrucción esofágica es una cirugía técnicamente compleja y de las más agresivas en el campo de la cirugía digestiva. El registro y publicación de las complicaciones es impreciso o sin definiciones bien establecidas en la mayoría de los estudios. Por ello en 2011 se creó el Esophageal Complications Consensus Group (ECCG), que publicó en 2019[53] el “*benchmarking*” de las complicaciones de la resección esofágica. Realizaron una revisión de una base de datos prospectiva con 2704 pacientes. El 94% de las reconstrucciones fueron mediante gastroplastia. La frecuencia global de complicaciones fue 59%, siendo graves, que requirieron reintervención o exitus (es decir Clavien Dindo  $\geq$  IIIb) en 17,2%. Se describen las complicaciones más relevantes en la **Tabla 2**.

**Tabla 2:** complicaciones de la esofagectomía

Fuga anastomótica	11,4%
Necrosis de la plastia	1,3%
Fístula quilosa	4,7%
Lesión del nervio recurrente	4,2%
Mortalidad (30 días)	2,4%
Mortalidad (90 días)	4,5%

Fuente: Low et al[53]

Dentro de las complicaciones específicas de la coloplastia se reporta[1]:

- Dehiscencia de anastomosis: 0 a 15%
- Necrosis de la plastia: 0 a 10%
- Mortalidad: 0 a 16%



## 1.4 Experiencia en Acondicionamiento Isquémico Preoperatorio (AIP) en el Hospital Universitari Bellvitge

En la Unidad de Cirugía Esofagogástrica del Hospital Universitari de Bellvitge se inició la experiencia con el acondicionamiento isquémico gástrico mediante el estudio de un modelo animal en 2007[34]. En 2011 se publicó la primera serie en humanos[8] siguiendo la técnica de embolización mediante arteriografía descrita por Akiyama et al[5]. En 2018[9] se publicaron los resultados clínicos del acondicionamiento isquémico gástrico preoperatorio y reconstrucción post esofagectomía tras 14 años de experiencia, en 97 casos. Se trata de la mayor serie sobre acondicionamiento isquémico mediante embolización descrita hasta la fecha. El acondicionamiento tuvo una mortalidad nula con una morbilidad del 13%. La cirugía de reconstrucción tuvo una morbilidad global del 45% (siendo superiores o iguales al grado IIIB de la clasificación de Clavien Dindo[54] en 19%), con 2% de isquemia de la gastroplastia, 7% de dehiscencia anastomótica y mortalidad del 7%. Comparando estos resultados con los de los pacientes a los que no se les realizó acondicionamiento, pueden considerarse satisfactorios[53].

## 1.5 Estudio del daño histológico y neovascularización

### a. Daño histológico

Como modelo experimental, el dato más importante para establecer la viabilidad del acondicionamiento isquémico es que el animal sobreviva al procedimiento en buenas condiciones. En decir, que no haya una necrosis del segmento acondicionado y que el animal no tenga signos de sufrimiento que requieran la eutanasia. Superada la agresión isquémica inicial, también es importante determinar la secuencia de recuperación histológica para determinar el momento en que sería más adecuado para realizar la coloplastia, ya que para que una anastomosis cicatrice adecuadamente es necesario que el intestino esté recuperado. La puntuación de Chiu et al. [55] se establece mediante los siguientes parámetros histológicos (**Figura 21**):

0: Mucosa normal

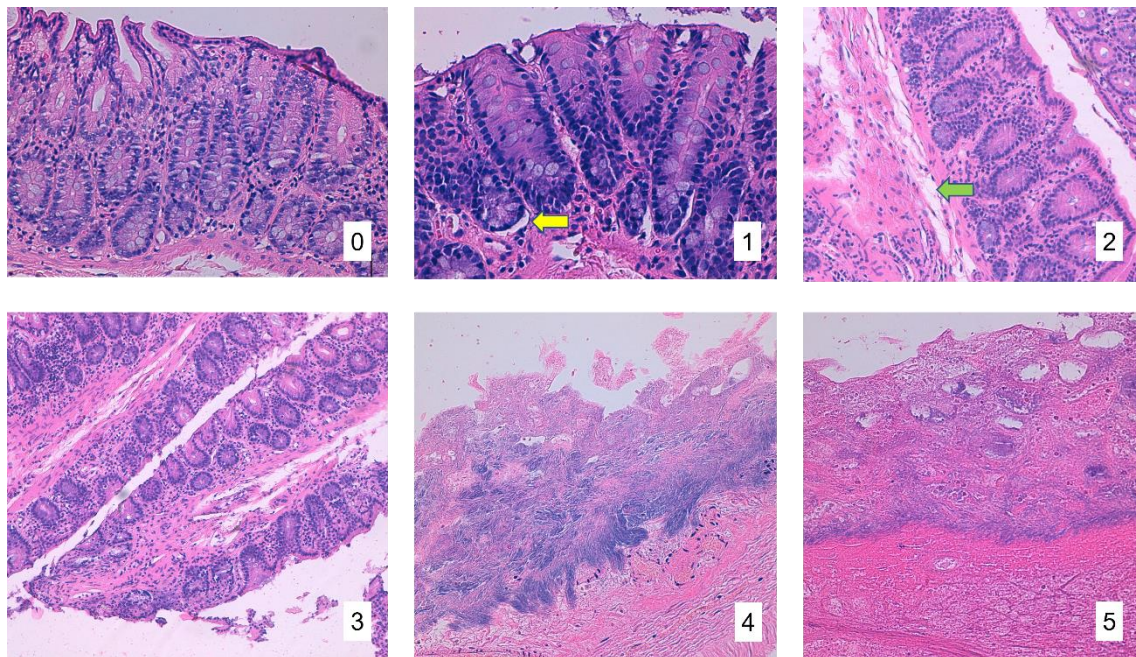
1: Edema subepitelial en las vellosidades

2: Edema en lámina propia

3: Afinamiento epitelial con denudación en las puntas de las vellosidades

## 4: Infarto de la mucosa

## 5: Infarto transmural



**Figura 21.** Puntuación de Chiu del 0 al 5 con tinción de HyE (ver explicación en el texto). La flecha amarilla indica edema subepitelial y la flecha verde, edema de la lámina propia

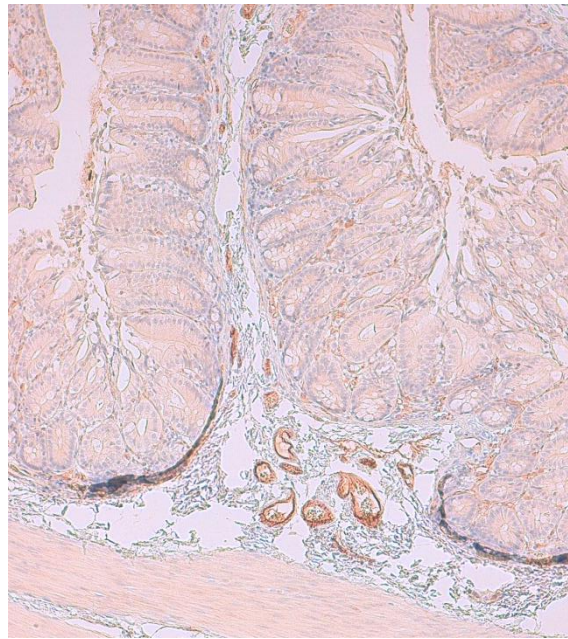
En el estudio original, Chiu et al. encontraron una correlación consistente y reproducible de los hallazgos de daño histológico con la intensidad de la isquemia y parámetros bioquímicos e inmunohistoquímicos de daño isquémico determinado mediante métodos mucho más complejos. El principal fenómeno histológico inicial es el despegamiento de la capa epitelial/subepitelial, que evidencia morfológicamente una consecuencia fisiológica precoz de la isquemia como es el aumento de la permeabilidad capilar y el edema. Los eventos posteriores, como la denudación del epitelio y la necrosis evidencian un daño isquémico más severo.

Esta escala ha sido ampliamente empleada en cirugía experimental, con casi 500 citas en PubMed, y ha sido utilizada como modelo de acondicionamiento gástrico[34] con buenos resultados.

### ***b. Detección de neovascularización***

La detección de neovascularización es un área compleja con multitud de técnicas disponibles de diferente dificultad y costo de aplicación[56]. Actualmente se emplea sobre todo en el estudio de angiogénesis tumoral.

Los vasos sanguíneos de la submucosa intestinal pueden ser difíciles de identificar mediante tinciones habituales como la hematoxilina eosina, por lo que se puede emplear técnicas de inmunohistoquímica dirigidas a antígenos específicos de células endoteliales (**Figura 22**).



**Figura 22.** Vasos sanguíneos de la submucosa teñidos mediante inmunohistoquímica para CD31

El antígeno CD31, conocido también como molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas 1 (PECAM-1), es una glicoproteína transmembrana relacionada con la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se expresa en células madre mieloides, plaquetas y células endoteliales. El CD 31 participa en la migración de los leucocitos desde el espacio extravascular. Es empleado en técnicas de inmunohistoquímica para detectar capilares. La técnica de recuento de vasos en campos de gran aumento tiene la ventaja de ser fácilmente aplicable y no requiere de equipos especiales, aunque tiene el inconveniente de la imprecisión de un conteo manual.

## 2. HIPÓTESIS

El acondicionamiento isquémico (*delay phenomenon*) del colon derecho e íleon terminal es viable en términos de ausencia de necrosis transmural, con un patrón de recuperación predecible y siendo la neovascularización un mecanismo adaptativo.

## 3. OBJETIVOS

- Primario: valorar la viabilidad (presencia/ausencia de necrosis transmural) del acondicionamiento isquémico del colon e íleon terminal en un modelo experimental animal (*Rattus norvegicus*)
  
- Secundarios:
  - Analizar la secuencia de daño/recuperación a nivel histológico producida por el acondicionamiento y comparar las diferencias entre colon e íleon distal
  - Cuantificar la microvascularización para determinar si hay aumento del número de vasos sanguíneos como mecanismo del acondicionamiento



## 4. MATERIALES Y MÉTODO

### 4.1. Diseño

Se realizó un estudio experimental en ratas.

### 4.2. Periodo de realización

Los animales fueron intervenidos entre febrero y mayo de 2012.

### 4.3. Población (animales)

Se empleó *Rattus norvegicus* SD raza Sprague-Dawley, hembras exreproductoras con peso entre 200 y 300g y de entre 8 y 12 meses de edad. Los animales fueron adquiridos a Harlan U.K. limited (Shaw's Farm, Blackthorn, Bicester, Oxon, OX OTP England).

Todos los animales se manipularon en el estabulario de la Unitat d'Experimentació Animal del Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona. Tras recibir los animales del proveedor, fueron puestos en cuarentena un mínimo de 48 horas, con alimento y agua *ab libitum*. En todo momento los animales estuvieron en jaulas descontaminadas de patógenos y con limpieza regular. El seguimiento del bienestar animal estuvo a cargo del investigador y del personal del estabulario.

#### a. Cálculo de tamaño de muestra

Dado que es un estudio experimental sobre una nueva técnica quirúrgica en animales de laboratorio, cuyo desarrollo, mantenimiento y cuidados se realizan en forma estandarizada, no hay parámetros sobre los que argumentar un tamaño de muestra basado en asunciones estadísticas. Se utilizó un tamaño de muestra empírico tal y como se ha llevado a cabo en estudios similares[34,42]: 6 en el grupo control y 6 en cada grupo experimental (en total 42 animales).

### 4.4. Intervención

La intervención quirúrgica realizada fue el acondicionamiento isquémico del colon derecho e íleon terminal mediante la ligadura quirúrgica de los vasos ileocólicos. Para las comparaciones se empleó un grupo control al cual no se le realizó el acondicionamiento.



### **a. Técnica quirúrgica del acondicionamiento isquémico**

- I. Anestesia general con isoflurano por vía inhalatoria, dosis de inducción 5%, dosis de mantenimiento 1 a 2,5%
- II. Profilaxis antibiótica con enrofloxacin subcutánea una dosis previa al inicio de intervención, 7,5mg/kg
- III. Analgesia previa al inicio del procedimiento con buprenorfina 0,05mg/kg
- IV. Laparotomía media. Identificación de vasos ileocólicos, ligadura con seda 4-0 y sección de estos
- V. Cierre de laparotomía con sutura de seda 3-0. Cierre de piel con grapas metálicas

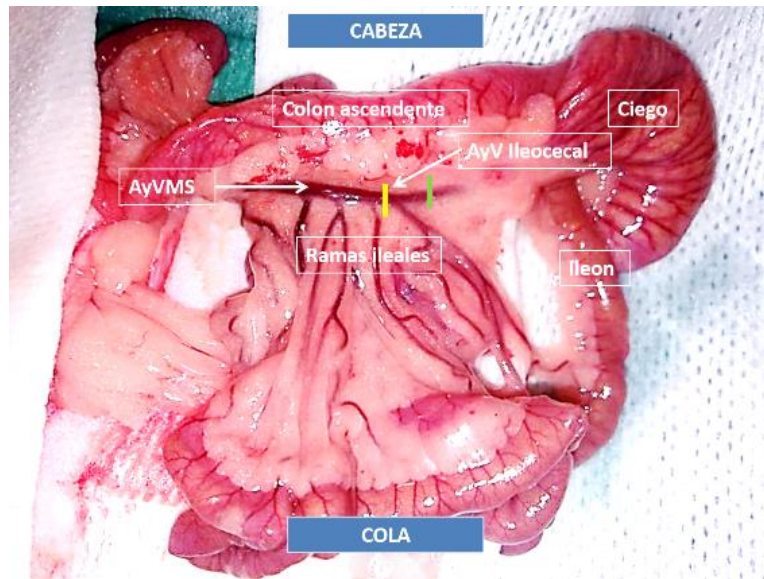
### **b. Configuración de los grupos de estudio**

Los animales fueron distribuidos en 7 grupos de la siguiente manera:

- Grupo +1: eutanasia al 1er día post quirúrgico
- Grupo +3: eutanasia al 3er día post quirúrgico
- Grupo +6: eutanasia al 6to día post quirúrgico
- Grupo +10: eutanasia al 10mo día post quirúrgico
- Grupo +15: eutanasia al 15to día post quirúrgico
- Grupo +21: eutanasia al 21er día post quirúrgico
- Grupo *sham*

Se emplearon además 8 animales para poner a punto la técnica quirúrgica y la extracción de muestras.

Para determinar el sitio adecuado para la ligadura de los vasos ileocólicos (**Figura 23**), se seleccionó un primer grupo de 4 animales donde se realizó una ligadura de los mismos vasos que se tendrían que ligar en una intervención quirúrgica estándar, es decir, los vasos ileocólicos y la última rama ileal; dos de ellos requirieron eutanasia por mala evolución (ver criterios de eutanasia precoz en el apartado “Seguimiento”, **Tabla 3**) y en los que se comprobó que había necrosis isquémica del ciego (**Figura 24**).



**Figura 23.** Anatomía ileocólica de la rata. La barra amarilla señala el sitio de ligadura inicial, empleado en 4 animales de los cuales 2 presentaron necrosis del ciego. La barra verde señala el sitio de ligadura del resto de los animales, preservando la última rama ileal



**Figura 24.** Necrosis isquémica del colon

En un segundo grupo de 4 animales se realizó la ligadura de vasos ileocólicos preservando la última rama ideal (**Figura 23**) estando todos vivos y en buenas condiciones al 3er día post operatorio, con lo cual se eligió este sitio para la ligadura vascular en el resto de los animales.



### **c. Aleatorización**

No se empleó ningún tipo de aleatorización. La distribución por grupos se realizó a conveniencia. Previo al momento de la intervención quirúrgica de acondicionamiento, el animal fue asignado a un grupo con una fecha de eutanasia predeterminada.

## **4.5. Recogida de datos**

La variable desenlace para el objetivo primario (es decir, valorar la viabilidad del acondicionamiento) fue la frecuencia de *necrosis transmural* objetivada mediante el análisis histológico de un fragmento de colon e íleon con hematoxilina eosina.

Las variables de los objetivos secundarios se definieron y fueron medidas de la siguiente manera:

- ***Daño histológico:*** se utilizó la escala descrita por Chiu[55], descrita previamente en la Introducción. Se resume aquí las categorías:
  - 0: Mucosa normal
  - 1: Edema subepitelial en las vellosidades
  - 2: Edema en lámina propia
  - 3: Afinamiento epitelial con denudación en las puntas de las vellosidades
  - 4: Infarto de la mucosa
  - 5: Infarto transmural
- ***Cuantificación de la neovascularización:*** se realizó mediante fijación en parafina y detección de los vasos sanguíneos marcados por inmunohistoquímica para CD31 (Abcam, ab28364, Reino Unido). En cada lámina se contaron el número de vasos en 5 campos de gran aumento a nivel de la submucosa tanto del colon como del íleon y se comparará con el grupo de referencia (*sham*).

### **a. Control de la aleatorización**

Dado que se trató de animales de laboratorio criados en situaciones estandarizadas, todas hembras, con un estrecho rango de edad y peso, además de ser una muestra pequeña, se consideró que la probabilidad de sesgo por las diferencias basales de los animales era mínima.

### **b. Enmascaramiento**

Se realizó un enmascaramiento del investigador que valoró las láminas histológicas. Este solo disponía de un código de identificación del animal, pero no del grupo al que pertenecía.

La recogida de datos se realizó a través del programa Excel.

## **4.6. Seguimiento: protocolo de monitorización de bienestar animal**

La supervisión fue en función del día de eutanasia previsto, siendo diaria hasta el 3er día postquirúrgico; cumplido dicho plazo, fue cada 48hs. En cada visita se valoró si había signos de sufrimiento que precisaran eutanasia (**Tabla 3**) y los parámetros de supervisión del dolor (**Tabla 4**). Los primeros 3 días se administró analgesia según pauta y los animales se alimentaron *ad libitum*.

### **a. Pauta analgésica**

Se administró meloxicam como analgesia postoperatoria, 1mg/kg subcutáneo cada 24h. La primera dosis se administró inmediatamente después del procedimiento quirúrgico y se continuó durante 72h. Si el animal presentaba signos de mal control del dolor, se administró una dosis de rescate de buprenorfina.

### **b. Método de eutanasia**

Asfixia mediante cámara de CO<sub>2</sub>

### **c. Extracción de muestras**

Resección de colon derecho e íleon terminal

**Tabla 3.** Criterios para realizar eutanasia

---

Pérdida de peso >20%

Animal inconsciente /comatoso

Imposibilidad para moverse con normalidad

---

**Tabla 4.** Parámetros para supervisión del dolor

---

Pérdida de peso

0) Normal

1) Menor 10 %

2) 10-15 %

Aspecto físico

0) Normal

1) Encorvado

Alteraciones en la conducta

0) ninguna

1) Incapacidad de moverse con normalidad

Valoración:

0-2: analgesia según protocolo

3-4: analgesia de rescate con buprenorfina

---

## 4.7. Análisis de datos

Para el análisis del objetivo primario, se comparó la proporción de necrosis (variable dicotómica) con una proporción esperada máxima del 10%, que es el porcentaje de necrosis de la coloplastia citado en una revisión reciente[1]. Como se comparó una proporción esperada con una teórica, se empleó una prueba binomial exacta.

Para el análisis de los objetivos secundarios:

- Se comparó el grado de daño histológico con el grupo *sham*; dado que el daño histológico es una variable con 5 categorías y que no todas superaron una frecuencia de 5, se empleó el test exacto de Fisher.
- Se comparó el número de vasos sanguíneos con el grupo *sham*; dado que el número de vasos es una variable cuantitativa y las muestras eran pequeñas, en el análisis de diferencia de medias global se empleó la prueba de Kruskal Wallis y para el análisis de cada grupo vs *sham* se optó por la aleatorización de Fisher Pitman.

Se consideró estadísticamente significativas las diferencias con  $p < 0,05$  e intervalo de confianza del 95%.

Los datos fueron analizados con el programa Stata 13 (StataCorp, EEUU)

#### **4.8. Aspectos éticos**

El estudio fue presentado y aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona y se desarrolló en el estabulario del Campus de Bellvitge. Quien realizó las intervenciones quirúrgicas y manejó el cuidado perioperatorio de los animales contaba con la acreditación correspondiente del Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya para personal investigador usuario de animales de experimentación.

Durante el desarrollo del estudio se cumplió la normativa de la Unión Europea (directiva 86/609 CEE), relativa a las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los animales utilizados para experimentación científica, así como la ley 5/1995 de la Generalitat de Catalunya respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otras finalidades científicas.

Para la redacción de este proyecto tuvieron en cuenta las guías ARRIVE para el reporte de investigación en animales[57] y las recomendaciones HARRP de la International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)[58].

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Necrosis transmural

Del total de 36 animales, se encontró necrosis transmural del colon (puntuación de Chiu 5) en 1 animal (2,78%, IC 95% 0 – 8,15%) perteneciente al grupo +6 y necrosis epitelial (Chiu 4) en 1 animal. No se observó necrosis transmural del íleon en ningún animal. No se tuvo que sacrificar en forma precoz ningún animal.

### 5.2. Daño histológico

#### a. Colon:

Se resume en la **Tabla 5**. El pico de máxima puntuación de daño histológico fue en el grupo 1 y la diferencia fue significativa vs grupo *sham*. En los grupos sucesivos se observó una mejoría progresiva del daño, siendo completa (grado 0) en 4/6 y con daño leve (grado 1) en 2/6 del grupo +21. Las diferencias de daño observadas entre el grupo *sham* y el resto de grupos no fue estadísticamente significativas.

**Tabla 5.** Mediana de puntuación de Chiu y RIC\* en colon y significancia vs grupo *sham*

Grupo	Mediana de puntuación (RIC)	P valor**
+1	1.50 (1.00)	<b>0.015</b>
+3	1.00 (1.00)	0.061
+6	0.50 (1.00)	0.182
+10	0.50 (1.00)	0.182
+15	0.00 (0.00)	1
+21	0.00 (1.00)	0.455

\*Rango intercuartil

\*\*Test exacto de Fisher. En negrita los valores estadísticamente significativos (P<0,05)

### **b. Íleon:**

Se resumen en la **Tabla 6**. No se observó necrosis transmural en ninguno de los 36 animales intervenidos. El pico de máximo daño fue en el grupo 1 presentando una mejoría progresiva. En el grupo 21, 5 de los 6 animales no tenían daño (Chiu 0), y el que presentaba daño era leve (Chiu 1). La diferencia de daño de cada grupo respecto al grupo *sham* fue estadísticamente significativa en los grupos 1, 3 y 6.

**Tabla 6.** Mediana de puntuación de Chiu y RIC\* en íleon y significancia vs grupo *sham*

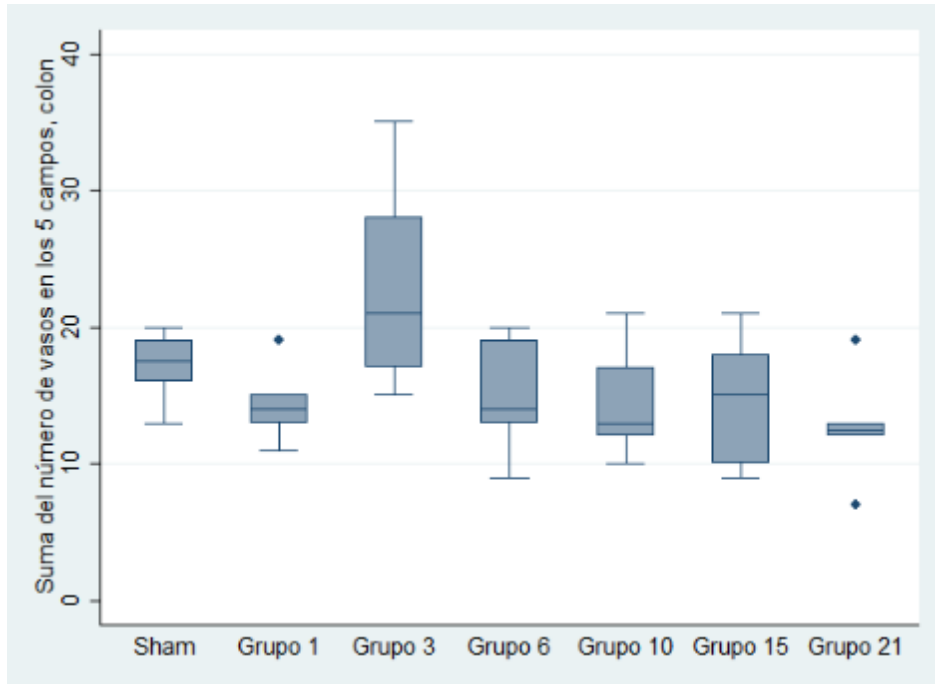
<b>Grupo</b>	<b>Mediana de puntuación (RIC)</b>	<b>P valor**</b>
+1	1.50 (1.00)	<b>0.015</b>
+3	1.00 (1.00)	<b>0.002</b>
+6	1.00 (0.00)	<b>0.015</b>
+10	0.50 (1.00)	0.182
+15	0.00 (1.00)	0.455
+21	0.00 (0.00)	1

\*Rango intercuartil

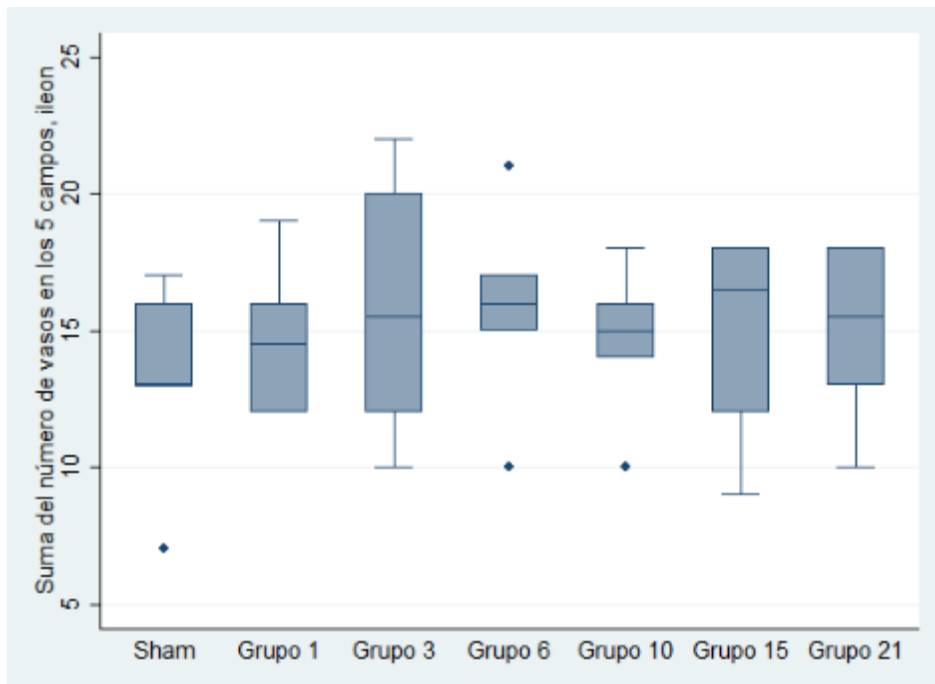
\*\*Test exacto de Fisher. En negrita los valores estadísticamente significativos (P<0,05)

### **c. Contaje de vasos sanguíneos**

Se ilustra en las **Figuras 25 y 26** y **Tablas 7 y 8**. En cada individuo se sumó el total de vasos detectados por inmunohistoquímica mediante marcaje anti CD31 en 5 campos de gran aumento. Los animales con necrosis epitelial o transmural fueron excluidos.



**Figura 25.** Diagramas de caja que resumen la distribución de la media del contaje de vasos por 5 campos de gran aumento a nivel de la submucosa del colon.



**Figura 26.** Diagramas de caja que resumen la distribución de la media del contaje de vasos por 5 campos de gran aumento a nivel de la submucosa del íleon.

**Tabla 7.** Mediana de la suma de número de vasos\* en colon, percentil 25, percentil 75 y rango intercuartil

<b>Grupo</b>	<b>Colon</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>RIC**</b>
<i>Sham</i>	17.5	16	19	3.00
Grupo 1	14	13	15	2.00
Grupo 3	21	17	28	11.00
Grupo 6	14	13	19	6.00
Grupo 10	13	12	17	5.00
Grupo 15	15	10	18	8.00
Grupo 21	12.5	12	13	1.00

\*En 5 campos de gran aumento

\*\*Rango intercuartil

**Tabla 8.** Mediana de la suma de número de vasos\* en íleon, percentil 25, percentil 75 y rango intercuartil

<b>Grupo</b>	<b>Íleon</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>RIC**</b>
<i>Sham</i>	13	13	16	3.00
Grupo 1	14.5	12	16	4.00
Grupo 3	15.5	12	20	8.00
Grupo 6	15.5	15	17	2.00
Grupo 10	15	14	16	2.00
Grupo 15	16.5	12	18	6.00
Grupo 21	15.5	13	18	5.00

\*En 5 campos de gran aumento

\*\*Rango intercuartil



Los gráficos P-P no mostraron clara vulneración de la normalidad; sin embargo, la prueba de Shapiro Wilk para contaje en colon era significativa ( $p= 0.005$ ) y los diagramas de box plot señalaban valores alejados tanto en colon como íleon, por lo que se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

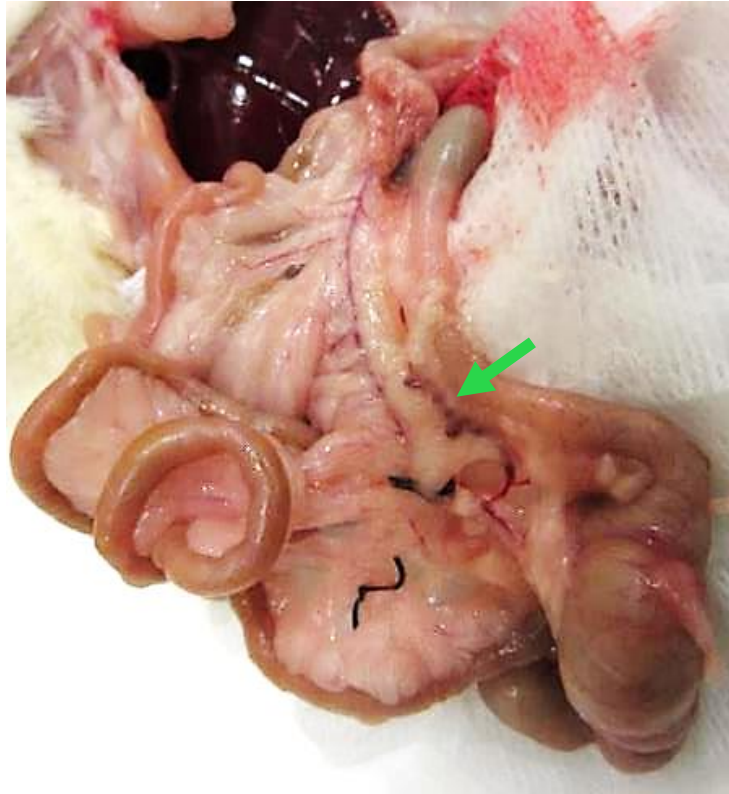
En el grupo *sham* la mediana de vasos de colon e íleon y rango intercuartil fue de 17,5 (14,5-20,5) y 13 (10-16) respectivamente. No hubo diferencias significativas, tanto en la comparación con el grupo *sham* (test de Fisher Pitman, tabla inferior) como en el análisis entre grupos (test de Kruskal Wallis,  $p= 0,076$ ; **Tabla 9**).

**Tabla 9.** Valor P de la media de vasos de colon e íleon vs grupo *sham*\*

	Colon	íleon
Grupo 1	0,156	0,491
Grupo 3	0,126	0,327
Grupo 6	0,39	0,317
Grupo 10	0,199	0,489
Grupo 15	0,316	0,426
Grupo 21	0,057	0,418

\* Prueba de Fisher Pitman

Aunque no era un objetivo del estudio, un hecho llamativo en algunos animales fue el desarrollo de importantes vasos colaterales en el mesenterio (**Figura 27**)



**Figura 27.** Modificaciones vasculares tras ligadura de vasos ileocólicos

#### ***d. Variación de peso según el grado de daño***

Para analizar la variación del peso, se agrupó el daño en las siguientes categorías:

- No daño: Chiu = 0
- Daño leve/moderado: Chiu 1-3
- Necrosis: Chiu 4-5

El peso medio de todos los animales previo al AI fue de 318.71 gramos (desviación estándar 37.37). La diferencia de peso entre los animales intervenidos que no presentaron daño histológico y los que presentaron daño no fue significativa (prueba t pareada, media 1,44 gramos,  $p=0,42$ ). Se expone las distribuciones en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Diferencia de peso según el daño histológico tras acondicionamiento

	<b>N</b>	<b>Media de diferencia peso*</b>	<b>DE**</b>
No daño	12	-7.83	11.04
Daño leve/moderado	22	-9.27	22.41
Necrosis	2	7.50	0.71

\* En gramos

\*\*DE: desviación estándar

## 6. DISCUSIÓN

El acondicionamiento isquémico del íleon terminal y colon derecho mediante la ligadura de los vasos ileocólicos ha sido viable en este modelo experimental en ratas, al observarse necrosis transmural del colon en 1 de 36 animales (2,78%, IC 95% 0 – 8,15%). No se observó ningún caso de necrosis transmural del íleon terminal ni se tuvo que realizar ningún sacrificio precoz por malestar animal. Además, si a la ligadura de los vasos ileocólicos se asocia la sección de la última rama ileal, la necrosis es más frecuente (2/4 casos). Este estudio es el primer modelo experimental animal de acondicionamiento isquémico del colon que se ha publicado en la literatura[59,60] utilizando la técnica quirúrgica habitual para la coloplastia derecha en humanos.

La necrosis de la coloplastia es una complicación nefasta en un paciente que habitualmente ha pasado por múltiples cirugías previas, con baja reserva funcional y con compromiso del estado general e incluso psicológico. La imposibilidad de la ingesta oral reduce considerablemente la calidad de vida. Cualquier estrategia que aumente la probabilidad de que la plastia de reemplazo esofágico funcione correctamente y que reduzca el riesgo de reintervención por necrosis aguda o por complicaciones derivadas de la isquemia crónica (y, en consecuencia, suprimir la ingesta oral), tiene un valor inestimable.

El acondicionamiento isquémico preoperatorio proporciona una mejoría en la perfusión y en la tolerancia de los tejidos a la isquemia en modelos experimentales en otros órganos [36,61]. El principal órgano en el cual se ha estudiado el acondicionamiento isquémico en cirugía digestiva es el estómago. En relación a la coloplastia, la mayoría de los estudios que proponen la optimización de la vascularización utilizan el método del *supercharged* vascular que requiere una anastomosis microvascular para aumentar la perfusión del conducto, pero es un recurso técnicamente difícil de aplicar, requiere una alta especialización con experiencia en microcirugía y a pesar de ello se ha asociado con una fuga anastomótica en el 42% de los pacientes[62]. El acondicionamiento isquémico es una técnica más sencilla; en el caso de acondicionamiento gástrico preoperatorio, hay dos abordajes: el quirúrgico (mediante ligadura quirúrgica de las arterias) y la vía endovascular. En el Hospital Universitari de Bellvitge la vía endovascular es la de elección, siendo factible en la mayoría de los casos, con pocas complicaciones, no requiere anestesia general y tiene una corta estancia posterior al procedimiento [63]. En el futuro habrá que comprobar si estas ventajas se reproducen en el acondicionamiento del colon.

Si bien el estudio del acondicionamiento del colon hecho por Souther et al[10] tiene similitudes con este, también hay unas diferencias importantes. Souther et al compararon dos grupos de 10 ratas: en el grupo de acondicionamiento isquémico se realizó la ligadura de los vasos ileocólicos y dos semanas después se seccionó el colon e íleon con sus respectivas arcadas; en el grupo control

se realizaron las tres ligaduras en la misma intervención (**Figura 3**). Constataron necrosis del ciego en 20% en el grupo de acondicionamiento isquémico vs 80% en el grupo no acondicionado ( $p<0,01$ ). Si bien la diferencia de porcentaje de necrosis con y sin acondicionamiento es notable, la técnica que emplearon produce una isquemia muy severa y difiere de la técnica quirúrgica empleada habitualmente para la coloplastia derecha, ya que en esta se preserva la arcada vascular del colon derecho y sus afluentes: la arteria cólica derecha y la rama derecha de la arteria cólica media, mientras que en el estudio de Souther solo se preservan los pequeños vasos que trascurren en el mesenterio; además, fue diseñado como modelo preliminar del acondicionamiento isquémico y realizado por cirujanos plásticos hace casi 50 años, cuando el estado de la cirugía en general era completamente diferente al actual. La presente Tesis forma parte del desarrollo de una estrategia más amplia para la optimización de la vascularización de las diferentes plastias de reemplazo esofágico.

Gust et al[1] realizaron una revisión extensa de la literatura sobre la coloplastia. En los estudios incluidos, la necrosis de la coloplastia se observó hasta en el 10% de los casos, mientras que la dehiscencia anastomótica se reportó entre el 3 y el 46% de los casos. El principal determinante de la dehiscencia anastomótica fue la isquemia. La isquemia de la plastia en el postoperatorio puede ocurrir por varios factores: hipotensión sistémica, oclusión arterial (trombosis, espasmo, acodamiento), congestión venosa por compresión y alteraciones en la microvascularización; sin embargo, en el caso de la gastroplastia, la causa más importante de disminución del flujo sanguíneo es la propia supresión vascular para la movilización del estómago que produce una caída del flujo de un 74%[37].

Reavis et al[19] en su modelo de acondicionamiento gástrico en zarigüeya observaron que el flujo sanguíneo de las gastroplastias acondicionadas era el triple que en las no acondicionadas. Teniendo en cuenta estos datos, además de nuestros resultados y los de Souther et al, creemos que es razonable hipotetizar que el acondicionamiento isquémico del colon podría favorecer el flujo sanguíneo y disminuir la probabilidad de necrosis de la coloplastia, lo que habría que comprobar con modelos experimentales en el futuro. También es razonable pensar que este beneficio debería tener aún más importancia en pacientes con vasculopatía[6], y como propone Veeramootoo et al[47], para prevenir ciertos tipos de fallo de la plastia relacionados con la alteración de la microvascularización del extremo del conducto.

El acondicionamiento isquémico preoperatorio del colon plantea otras ventajas. La vascularización del colon derecho es muy variable. El acondicionamiento colónico preoperatorio mediante arteriografía permitiría conocer la anatomía vascular de ese paciente, diagnosticar si hay alguna arteria clave ocluida por enfermedad arterial (lo que contraindicaría realizar una

coloplastia derecha) e incluso tratarla, además de tener de antemano embolizados los vasos que se seccionarán en la cirugía y permitir la hipertrofia de los vasos remanentes, con la consecuente remodelación vascular para optimizar el flujo sanguíneo de la plastia. Los pacientes a los que se les realiza una coloplastia, habitualmente han sido sometidos a intervenciones quirúrgicas abdominales previas complejas que generan adherencias y que dificultarían un acondicionamiento realizado mediante sección quirúrgica, problema que se puede obviar cuando el acondicionamiento se realiza mediante arteriografía. Por último, el acondicionamiento isquémico preoperatorio del colon puede funcionar también como prueba para saber si el colon derecho puede resistir adecuadamente la isquemia, y en caso de que reaccione favorablemente, permite fraccionar la agresión quirúrgica en dos etapas, a diferencia de como se hace actualmente en un solo tiempo. Si con la embolización preoperatoria hay necrosis del colon, el manejo sería potencialmente menos complejo que la desconexión de una coloplastia.

Otro aspecto que analizamos en nuestro estudio fue la secuencia de recuperación histológica, dado que lo ideal es realizar la coloplastia una vez que haya una recuperación completa. Similar a lo que se observa con el modelo de acondicionamiento isquémico gástrico[34], a las 2-3 semanas la recuperación es prácticamente completa. Sin embargo, hubo diferencias en el pico de daño determinado por la puntuación de Chiu en comparación con el estómago. En el modelo de acondicionamiento isquémico gástrico el pico de daño se produjo al 6º día[34], similar a lo que observamos en el íleon pero no en el colon, donde el daño significativo solo ocurrió en el primer día postquirúrgico. Este hallazgo quizás se pueda explicar porque la vascularización del colon es menor que la del intestino delgado y del estómago, y algunos estudios señalan que el colon podría tolerar incluso mejor la isquemia que el intestino delgado[64]. La fisiología del estómago, intestino delgado y colon son diferentes y los resultados del acondicionamiento gástrico no necesariamente se pueden equiparar con el acondicionamiento colónico. Por ejemplo, el estómago tiene una tasa metabólica alta al tener que producir el ácido clorhídrico necesario para la digestión, mientras que el intestino delgado y el colon tienen una función más absorbitiva y una carga bacteriana más elevada. Desconocemos como estos factores podrían influir en los resultados del acondicionamiento isquémico.

En cuanto a la neovascularización, no pudimos demostrar que sea un mecanismo adaptativo del acondicionamiento isquémico, lo que podría tener varias explicaciones. La isquemia desencadena la liberación de mediadores inflamatorios que son potentes estimuladores para la neovascularización, con lo cual es muy probable que esta ocurra en alguna medida; sin embargo, tarda días en producirse y cuesta creer que pueda prevenir la necrosis que ocurre en las primeras horas del postoperatorio, aunque quizás sí mejore la perfusión de tejidos isquémicos sin necrosis a mediano o largo plazo. A efectos prácticos, estudiar la importancia de la contribución de la

neovascularización como mecanismo del acondicionamiento podría tener impacto al intentar reproducirlo mediante la administración exógena de determinados factores (como el factor de crecimiento vascular derivado del endotelio) o de medicamentos que modulen la respuesta isquémica, lo que en algunos casos se ha denominado acondicionamiento químico. Sin embargo, estos factores podrían tener el inconveniente de estimular también el tejido neoplásico de pacientes intervenidos por cáncer.

Más que la neovascularización, quizás el aspecto clave de las modificaciones vasculares en el acondicionamiento isquémico sea la remodelación vascular mediante la dilatación permanente de los vasos *choke* como ocurre en otros órganos como la piel y el estómago. De hecho, Akiyama et al.[5] plantean que el mecanismo de acondicionamiento mediante embolización es la dilatación de la arteria gastroepiploica derecha. Aunque no fue un objetivo de nuestro estudio, en algunos casos observamos claramente la dilatación de las arcadas vasculares cólicas (**Figura 27**).

Para Dhar y Taylor[31], la neovascularización no tiene un papel primordial en el acondicionamiento en colgajos cutáneos, pero sí las modificaciones de remodelación vascular de los vasos existentes. Estos autores proponen un interesante concepto denominado angiosoma[30] que se refiere a que una arteria nutricia discurre a través del tejido conectivo y se ramifica en una trama tridimensional como una especie de árbol, vascularizando una parte delimitada de tejido y conformando así una unidad funcional contigua a otras unidades similares comunicadas entre sí mediante los vasos *choke*. Cuando el flujo se detiene en la arteria nutricia de un angiosoma, se produce una dilatación de los vasos *choke* de los territorios adyacentes y producen un redireccionamiento del flujo sanguíneo mediante la remodelación vascular que explicarían en gran medida el mecanismo del acondicionamiento isquémico. Estas modificaciones están descritas en colgajos miocutáneos, sin embargo, no hemos encontrado ningún artículo que analice las características de los angiosomas en el tubo digestivo, lo cual podría también ser un tema de estudio en el futuro.

En cuanto a la nomenclatura, en la literatura se emplea como sinónimos términos que significan conceptos diferentes y al acondicionamiento isquémico preoperatorio se le menciona de varias maneras (precondicionamiento isquémico, *delay phenomenon*, *surgical delay*, condicionamiento isquémico). El término *delay phenomenon* está arraigado en la literatura, principalmente en el ámbito de la cirugía plástica y pensamos que es poco específico. Otro concepto relacionado, pero diferente al acondicionamiento isquémico, es el efecto protector de la exposición de un tejido a periodos cortos de isquemia frente a una isquemia prolongada (por ejemplo: precondicionamiento, postcondicionamiento y condicionamiento remoto). Proponemos el empleo del término **acondicionamiento isquémico preoperatorio** (en inglés: *preoperative ischemic*

**conditioning**) en este contexto y definirlo como una “estrategia terapéutica que tiene por objetivo mejorar la irrigación de un órgano mediante la supresión parcial y definitiva de su vascularización, como paso previo a una intervención quirúrgica en la que se le utilizará como colgajo o plastia”.

Nuestro estudio tiene varias limitaciones. Se debe tener cuidado al extrapolar los hallazgos a los humanos, ya que en la rata el ciego es grande en proporción al resto del intestino; esto y la carga bacteriana intestinal del roedor podrían ser factores que afecten negativamente en la tolerancia a la isquemia en comparación con los humanos (quienes probablemente la toleren mejor). En nuestro estudio no se realizó preparación mecánica del colon (administración de laxantes y/o antibióticos orales) para reducir la carga fecal intestinal, que potencialmente podría ser un factor que influya en los resultados del acondicionamiento. El sexo de la rata también puede ser importante ya que en algunos modelos las ratas hembras han tolerado mejor la lesión producida por isquemia reperusión en comparación con los machos[65]. En cuanto a la determinación de la neovascularización, existen métodos de análisis de imágenes más sofisticados y objetivos aunque más costosos [66], y es posible que tenga más relevancia hacer un análisis no solo de los neovasos, sino cómo se comporta en general el proceso de remodelado vascular, la hipertrofia de las arcadas vasculares y la estructura de los angiosomas en el tubo digestivo.



## Consideraciones y proyectos futuros:

- Para avanzar en el desarrollo del modelo, en estudios posteriores se debería analizar los cambios en el flujo sanguíneo a nivel del extremo de la coloplastia, las modificaciones en diámetro y distribución a nivel de las arcadas vasculares, así como los efectos del acondicionamiento en la cicatrización de la anastomosis (flujo sanguíneo, porcentaje de dehiscencia, depósito de colágeno y epitelización de la mucosa). Además, es importante la elección del modelo animal que sea lo más parecido al intestino humano, emplear animales de ambos sexos y evitar el empleo de animales muy jóvenes (que tienen una respuesta mucho mejor que en animales mayores).
- Dado que la lesión mucosa podría favorecer la traslocación bacteriana, se debería analizar el papel de la preparación mecánica del colon, descontaminación oral y/o antibiotioterapia sistémica tras el acondicionamiento isquémico ileocólico.
- Analizar las diferencias del efecto del acondicionamiento es distinto en colon derecho vs colon izquierdo de cara, tanto a la coloplastia de reemplazo esofágico, como a otras intervenciones quirúrgicas donde hay que ligar grandes vasos del colon (por ejemplo, la resección de recto con anastomosis colorectal, donde habitualmente se liga la arteria mesentérica inferior y la vascularización del colon izquierdo remanente depende únicamente de las arcadas vasculares).
- Estudiar los angiosomas en el tubo digestivo y el papel de la dilatación permanente de los vasos *choke* como mecanismo del acondicionamiento isquémico en el colon.
- Por último, pensamos que sería interesante analizar el efecto de determinados factores en el desarrollo del acondicionamiento isquémico, tales como la edad, el estado nutricional, la quimioterapia antiangiogénica, la radioterapia, entre otros.

## 7. CONCLUSIONES

1. El acondicionamiento isquémico del colon e íleon es biológicamente viable según este modelo animal; sin embargo, hay que seleccionar adecuadamente el sitio de ligadura vascular
2. El daño histológico es mayor al 1er día post acondicionamiento en colon y del 1º al 6º día en el íleon, remitiendo progresivamente hasta normalizarse en la mayoría de los animales a los 21 días
3. En este modelo, el colon fue más susceptible a la necrosis isquémica en comparación con el íleon
4. No se pudo demostrar que la neovascularización sea un mecanismo de acción del acondicionamiento isquémico



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Gust L, Ouattara M, Coosemans W, Nafteux P, Thomas PA, D'Journo XB. European perspective in Thoracic surgery—eso-coloplasty: when and how? *J Thorac Dis*. 2016 Apr;8(S4):S387–98.
- 2 Grimminger PP, Goense L, Gockel I, Bergeat D, Bertheuil N, Chandramohan SM, et al. Diagnosis, assessment, and management of surgical complications following esophagectomy. *Ann N Y Acad Sci*. 2018;1434(1). DOI: 10.1111/nyas.13920
- 3 Zimblér MS. Gaspare Tagliacozzi (1545-1599): renaissance surgeon. *Arch Facial Plast Surg*. [cited 2019 Mar 23]. ;3(4):283–4.
- 4 Urschel JD. Transplant delay will reduce anastomotic complications of gastric pull up for isolated esophageal atresia. *Med Hypotheses*. 1993 Jun;40(6):379–80.
- 5 Akiyama S, Ito S, Sekiguchi H, Fujiwara M, Sakamoto J, Kondo K, et al. Preoperative embolization of gastric arteries for esophageal cancer. *Surgery*. 1996 Sep [cited 2019 Mar 23]. ;120(3):542–6.
- 6 Heger P, Blank S, Diener MK, Ulrich A, Schmidt T, Büchler MW, et al. Gastric Preconditioning in Advance of Esophageal Resection-Systematic Review and Meta-Analysis. 2017 DOI: 10.1007/s11605-017-3416-z
- 7 Michalinos A, Antoniou SA, Ntourakis D, Schizas D, Ekmektzoglou K, Angouridis A, et al. Gastric ischemic preconditioning may reduce the incidence and severity of anastomotic leakage after oesophagectomy: a systematic review and meta-analysis. *Dis Esophagus*. 2020 May;33(10). DOI: 10.1093/dote/doaa010
- 8 Farran L, Miro M, Alba E, Bettonica C, Aranda H, Galan M, et al. Preoperative gastric conditioning in cervical gastropasty. *Dis Esophagus*. 2011;24(4):205–10.
- 9 Miró M, Farran L, Estremiana F, Miquel J, Escalante E, Aranda H, et al. ¿Puede el acondicionamiento gástrico disminuir la incidencia de dehiscencia anastomótica esofagogástrica cervical? *Cir Esp*. 2018 Feb;96(2):102–8.
- 10 Souther SG, Vistnes LM. The intestine and the delay phenomenon-A preliminary report. *J Surg Res*. 1975 Jun;18(6):619–22.
- 11 Iranpour M, Khodarahmi A, Khodarahmi N, Shafiee M, Malekpourafshar R, Nakhaee N. Montelukast for Medical Delay in Flap Surgery. *World J Plast Surg*. 2020;9(1):48–54.
- 12 Karacaoglu E, Yuksel F, Turan SO, Zienowicz RJ. Chemical delay: An alternative to surgical delay experimental study. *Ann Plast Surg*. 2002;49(1):73–81.
- 13 Conditioning | Definition of Conditioning by Merriam-Webster [Internet]. [cited 2020 May 1]. Available from: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/conditioning#synonyms>
- 14 Diccionario de la lengua española | Edición del Tricentenario | RAE - ASALE [Internet]. [cited 2020 May 1]. Available from: <https://dle.rae.es/>
- 15 Hamilton K, Wolfswinkel EM, Weathers WM, Xue AS, Hatfeg DA, Izaddoost S, et al. The Delay Phenomenon: A Compilation of Knowledge across Specialties. *Craniofac Trauma Reconstr*. 2014;7(2):112–8.
- 16 Murry CE, Jennings RB, Reimer K a. Preconditioning with ischemia : injury delay of lethal cell ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1224–1136.

- 17 Ghali S, Butler PEM, Tepper OM, Gurtner GC. Vascular Delay Revisited. *Plast Reconstr Surg.* 2007 May;119(6):1735–44.
- 18 Myers MB, Cherry G. Mechanism of the delay phenomenon. *Plast Reconstr Surg.* 1969;44(1):52–7.
- 19 Reavis KM, Chang EY, Hunter JG, Jobe BA, Lineaweaver WC, Schirmer BD, et al. Utilization of the delay phenomenon improves blood flow and reduces collagen deposition in esophagogastric anastomoses. *Ann Surg.* 2005;241(5):736–47.
- 20 Gümüŝ N, Ödemiş Y, Tuncer E, Yilmaz S. The effect of topical minoxidil pretreatment on nonsurgical delay of rat cutaneous flaps: Further studies. *Aesthetic Plast Surg.* 2013 Aug;37(4):809–15.
- 21 Du Z, Zan T, Li H, Li Q. A study of blood flow dynamics in flap delay using the full-field laser perfusion imager. *Microvasc Res.* 2011 Nov;82(3):284–90.
- 22 Taylor GI, Corlett RJ, Dhar SC, Ashton MW. The anatomical (angiosome) and clinical territories of cutaneous perforating arteries: Development of the concept and designing safe flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2011 Apr;127(4):1447–59.
- 23 McFarlane RM, Heagy FC, Radin S, Aust JC, Weemuth RE. A study of the delay phenomenon in experimental pedicle flaps. *Plast Reconstr Surg.* 1965 Mar;35(3):245–62.
- 24 Myers MB, Cherry G. Differences in the delay phenomenon in the rabbit, rat, and pig. *Plast Reconstr Surg.* 1971 Jan;47(1):73–8.
- 25 Reinisch JF. The pathophysiology of skin flap circulation: The delay phenomenon. *Plast Reconstr Surg.* 1974;54(5):585–98.
- 26 Thompson FM, Berakha GJ, Guthrie RH. The effective duration of the delay phenomenon in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1977;60(3):384–9.
- 27 Finseth F, Cutting C. An experimental neurovascular island skin flap for the study of the delay phenomenon. *Plast Reconstr Surg.* 1978;61(3):412–20.
- 28 Cutting CB, Robson MC, Koss N. Denervation supersensitivity and the delay phenomenon. *Plast Reconstr Surg.* 1978 Jun [cited 2020 May 20]. ;61(6):881–7.
- 29 Guba AM. Study of the delay phenomenon in axial pattern flaps in pigs. *Plast Reconstr Surg.* 1979;63(4):550–4.
- 30 Taylor GI, Palmer JH. The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications. *Br J Plast Surg.* 1987;40(2):113–41.
- 31 Dhar SC, Taylor GI. The delay phenomenon: The story unfolds. *Plast Reconstr Surg.* 1999;104(7):2079–91.
- 32 Aydin MA, Mavili ME. Examining microcirculation improves the angiosome theory in explaining the delay phenomenon in a rabbit model. *J Reconstr Microsurg.* 2003 Apr;19(3):187–94.
- 33 Jajoria H, Venkataram A, Mysore V. Importance of choke vessels in injectable fillers. *J Cutan Aesthet Surg.* 2020 Jul;13(3):185.
- 34 Lamas S, Azuara D, de Oca J, Sans M, Farran L, Alba E, et al. Time course of necrosis/apoptosis and neovascularization during experimental gastric conditioning. *Dis Esophagus.* 2008 Jun;21(4):370–6.
- 35 Liebermann-Meffert DMI, Meier R, Siewert JR. Vascular anatomy of the gastric tube used for esophageal reconstruction. *Ann Thorac Surg.* 1992;54(6):1110–5.

- 36 Urschel JD, Antkowiak JG, Delacure MD, Takita H. Ischemic conditioning (Delay Phenomenon) improves esophagogastric anastomotic wound healing in the rat. *J Surg Oncol.* 1997;66(4):254–6.
- 37 Schröder W, Beckurts KTE, Stähler D, Stützer H, Fischer JH, Hölscher AH. Microcirculatory changes associated with gastric tube formation in the pig. *Eur Surg Res.* 2002;34(6):411–7.
- 38 Sugimachi K, Ikeda M, Kai H, Ueo H, Okudaira Y, Inokuchi K. Assessment of the blood flow in various gastric tubes for esophageal substitutes. *J Surg Res.* 1982;33(6):463–8.
- 39 Urschel JD. Ischemic conditioning of the rat stomach: implications for esophageal replacement with stomach. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 1995 Apr [cited 2019 Mar 14]. ;36(2):191–3.
- 40 Urschel JD, Takita H, Antkowiak JG. The effect of ischemic conditioning on gastric wound healing in the rat: implications for esophageal replacement with stomach. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 1997 Oct;38(5):535–8.
- 41 Urschel JD, Antkowiak JG, Delacure MD, Takita H. Ischemic conditioning (Delay Phenomenon) improves esophagogastric anastomotic wound healing in the rat. *J Surg Oncol.* 1997 Dec;66(4):254–6.
- 42 Alfabet C, Montero EF de S, Paes Leme LF, Higashi VS, Sallum FO CFC, Fagundes DJ, et al. Progressive gastric perfusion in rats: Role of ischemic conditioning. *Microsurgery.* 2003 Oct;23(5):513–6.
- 43 Mittermair C, Klaus A, Scheidl S, Maglione M, Hermann M, Margreiter R, et al. Functional capillary density in ischemic conditioning: implications for esophageal resection with the gastric conduit. *Am J Surg.* 2008 Jul;196(1):88–92.
- 44 Veeramootoo D, Shore AC, Wajed SA. Randomized controlled trial of laparoscopic gastric ischemic conditioning prior to minimally invasive esophagectomy, the LOGIC trial. *Surg Endosc.* 2012;26(7):1822–9.
- 45 Zhuo ZG, Shen X, Song TN, Xu ZJ, Alai GH, Yao P, et al. The efficacy of ischemic conditioning in the prevention of gastroesophageal anastomotic complications: A meta-analysis. *Ann Palliat Med.* 2020 Jul;9(4):1586–95.
- 46 Kamarajah SK, Boyle C, Bundred JR, Tan BH. Critical appraisal of gastric conduit ischaemic conditioning (GIC) prior to oesophagectomy: A systematic review and meta-analysis. *Int J Surg.* 2020 May;77:77–82.
- 47 Veeramootoo D, Parameswaran R, Krishnadas R, Froeschle P, Cooper M, Berrisford RG, et al. Classification and early recognition of gastric conduit failure after minimally invasive esophagectomy. *Surg Endosc Other Interv Tech.* 2009;23(9):2110–6.
- 48 Wajed SA, Veeramootoo D, Shore AC. Video. Surgical optimisation of the gastric conduit for minimally invasive oesophagectomy. *Surg Endosc.* 2012 Jan;26(1):271–6.
- 49 Bates DDB, Paroder V, Lall C, Lalwani N, Widmar M, Garcia-Aguilar J. Complete mesocolic excision and central vascular ligation for right colon cancer: an introduction for abdominal radiologists. *Abdom Radiol.* 2019 Nov;44(11):3518–26.
- 50 Negoï I, Beuran M, Hostiuc S, Negoï RI, Inoue Y. Surgical anatomy of the superior mesenteric vessels related to colon and pancreatic surgery: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2018 Dec;8(1). DOI: 10.1038/s41598-018-22641-x
- 51 Farran-Teixidó L, Miró-Martín M, Biondo S, Conde-Mouriño R, Bettonica-Larrañaga C,

- Danso HA, et al. Reconstrucción esofágica en un segundo tiempo: Coloplastia y gastroplastia. *Cir Esp.* 2008;83(5):242–6.
- 52 Farran Teixidor L, Viñals Viñals JM, Miró Martín M, Higuera Suñé C, Bettónica Larrañaga C, Aranda Danso H, et al. Ileocoloplastia supercharged: Una opción para reconstrucciones esofágicas complejas. *Cir Esp.* 2011 Feb;89(2):87–93.
- 53 Low DE, Kuppusamy MK, Alderson D, Cecconello I, Chang AC, Darling G, et al. Benchmarking Complications Associated with Esophagectomy. *Ann Surg.* 2019 Feb;269(2):291–8.
- 54 Dindo D, Demartines N, Clavien P-A. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg.* 2004 Aug [cited 2019 Mar 23]. ;240(2):205–13.
- 55 Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg.* 1970 Oct [cited 2018 Oct 27]. ;101(4):478–83.
- 56 Nowak-Sliwinska P, Alitalo K, Allen E, Anisimov A, Aplin AC, Auerbach R, et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis.* 2018 Aug;21(3):425–532.
- 57 Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010 Jun;8(6):e1000412.
- 58 Osborne N, Avey MT, Anestidou L, Ritskes-Hoitinga M, Griffin G. Improving animal research reporting standards. *EMBO Rep.* 2018 May;19(5):e46069.
- 59 Rodriguez-Leon G, Estremiana F, Miro M, Bettonica C, Aranda H, Farran L, et al. Ischemic Conditioning in the Right Colon and Terminal Ileum: An Experimental Rat Model. *Eur Surg Res.* 2021 Dec DOI: 10.1159/000520676
- 60 Rodriguez-Leon G, Estremiana F, Miro M, Bettonica-Larrañaga C, Aranda H, De Oca J, et al. ISCHEMIC CONDITIONING (DELAY PHENOMENOM) OF THE RIGHT COLON AND TERMINAL ILEUM IN AN EXPERIMENTAL MODEL IN RATS. *Br J Surg.* 2020;107(S1):8.
- 61 Perry KA, Banarjee A, Liu J, Shah N, Wendling MR, Melvin WS. Gastric ischemic conditioning increases neovascularization and reduces inflammation and fibrosis during gastroesophageal anastomotic healing. *Surg Endosc.* 2013 Mar;27(3):753–60.
- 62 Esmonde N, Rodan W, Haisley KR, Joslyn N, Carboy J, Hunter JG, et al. Treatment protocol for secondary esophageal reconstruction using ‘supercharged’ colon interposition flaps. *Dis Esophagus.* 2020 Oct;33(10). DOI: 10.1093/dote/daaa008
- 63 Miró M, Farran L, Estremiana F, Miquel J, Escalante E, Aranda H, et al. ¿Puede el acondicionamiento gástrico disminuir la incidencia de dehiscencia anastomótica esofagogástrica cervical? *Cirugía Española.* 2018 Feb;96(2):102–8.
- 64 Takeyoshi I, Zhang S, Nakamura K, Ikoma A, Zhu Y, Starzl TE, et al. Effect of ischemia on the canine large bowel: A comparison with the small intestine. *J Surg Res.* 1996;62(1):41–8.
- 65 Wu M, Rowe JM, Fleming SD. Eicosanoid production varies by sex in mesenteric ischemia reperfusion injury. *Clin Immunol.* 2020 Nov;220. DOI: 10.1016/j.clim.2020.108596

- 66 Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer*. 2002;38(12):1564–79.





## **9. ANEXOS**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Acondicionamiento isquémico (delay phenomenon) del colon derecho e íleon terminal en un modelo experimental en ratas

Gerardo Rodríguez Leon

## Anexo 1. Resumen de la comunicación presentada en el 25to Congreso de la Sociedad Española Para la Investigación Quirúrgica y publicado en el British Journal of Surgery

### 8 SEIQ abstracts

**Results:** The LASCA device provides absolute values. The Postbiopsy Group had mean perfusion of 195.97, while the Control Group 317.61, we found statistically significant differences ( $P = 0.042$ ).

**Conclusions:** The vascularization of the Postbiopsy group is smaller than in the control group, the sample size is too small to obtain clinically conclusive data, the information obtained leads us to think about carrying out this study in a large animal model. We obtained a reproducible protocol with LASCA applicable to the study of diseases such as ischemic colitis or mesenteric ischemia in a murine model.

#### ISCHEMIC CONDITIONING (DELAY PHENOMENON) OF THE RIGHT COLON AND TERMINAL ILEUM IN AN EXPERIMENTAL MODEL IN RATS

G. Rodríguez-León<sup>1</sup>, F. Escribana<sup>2</sup>, M. Miró<sup>2</sup>, C. Beñonica<sup>2</sup>,

H. Aranda<sup>2</sup>, F. de Oca<sup>2</sup>, R. Jorba<sup>2</sup>, L. Ferran<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hospital de Viladecans, <sup>2</sup>Hospital Universitario Bellvitge, <sup>3</sup>Hospital Universitario Joan XXIII

**Objectives:** Preoperative gastric ischemic conditioning (IC) is a technique with low morbidity and that seems to improve the results of oesophageal replacement gastrectomy; however, the stomach cannot always be used. There are no studies about colonic IC, and the mechanisms of adaptation to ischemia in this context are unknown. Our objectives were: to assess the viability of the IC of the colon and terminal ileum in an experimental model, to assess the histological damage caused by IC and compare the differences between colon and distal ileum, and to determine if neovascularization is an adaptation mechanism in IC.

**Methods:** Experimental study in rats (*Rattus norvegicus*). IC technique: surgical ligation of ileocolic vessels. Groups: 6; rats per group: 7; each group was defined by the day of euthanasia post-IC: (+1, +3, +6, +10, +15 and +21, respectively) and a sham group. Biological viability of the model was defined as less than 10% of transmural necrosis. Assessment of histological damage: simplified Chiu scale in histological sections with H&E staining (0: no damage; 1: damage without necrosis; 2: mucous or transmural necrosis). Neovascularization assessment: submucosal vessel count in 5 high magnification fields using immunohistochemistry for CD31.

**Results:** Transmural colon necrosis: 1/36 animals (2.78%), none in ileum. Maximum peak of colon damage: 1st and 3rd day post IC ( $p = 0.015$  and  $0.03$  respectively, Fisher's exact test); ileum: similar results but non-significant differences. In +21 group, histological recovery was complete in the colon in 4 of the 6 animals (66.7%) and in the ileum in 5 of 6 (83.3%). There were no significant differences in the number of vessels compared to the sham group (Fisher's Pitman test) or between groups (Kruskal-Wallis test).

**Conclusions:** Ischemic conditioning of the colon and terminal ileum is viable in this model. The histological damage was maximum between the 1st and 3rd day after IC, and on day 21 the recovery is complete in 2/3 of the cases. It was not detected that neovascularization is an adaptive mechanism in this model.

#### FIRST STEPS FOR THE DEVELOPMENT OF A NAVIGATION SYSTEM BASED ON SOUND FEEDBACK AND THREE-DIMENSIONAL MODELS FOR THE ASSISTANCE OF ULTRASOUND-GUIDED PERCUTANEOUS INTERVENTIONS

J.A. Sánchez-Margallo<sup>1</sup>, R. Telo Sánchez, J. Moreno del Pozo<sup>2</sup>, F.M. Sánchez-Margallo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, <sup>2</sup>Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

**Objectives:** In ultrasound-guided percutaneous interventions (UGPI) needle identification and placement are crucial to ensure procedural success and patient safety. However, this activity can be compromised due to occlusions with nearby anatomical structures or artefacts in the ultrasound image. Aims: To implement a navigation system for UGPI, providing visual and sound feedback to assist the alignment of the percutaneous needle with respect to the ultrasound image plane.

**Methods:** The navigation system consists of the following components: (1) Ultrasound image acquisition system; (2) Needle and ultrasound probe tracking system; (3) three-dimensional environment; (4) Sound assistance. The Ix5000

system was used as ultrasound system and its image was digitized using a video capture device. Two electromagnetic microsensors attached to the needle and ultrasound probe were used to track them. The three-dimensional environment provided a real-time 3D visual representation of the ultrasound image and the location of both the needle and the ultrasound probe. A sound-based assistance system was implemented to guide the approximation and inclination of the needle with regard to the ultrasound image. For face validation, four physicians with different experience in UGPI carried out a task consisting of identifying, reaching and puncture a target in a phantom with and without using the navigation system. They repeated the task twice for different targets. At the end of the session, they were asked to complete a questionnaire evaluating the usability and usefulness of the navigation system.

**Results:** The participants without experience in UGPI required 150 seconds to reach the first target and 13 seconds to reach the second one while using the navigation system. The participants considered the navigation system a useful tool for locating and positioning the needle with respect to the ultrasound image. They preferred the sound-based assistance system for the execution of the tasks. They suggested that it would be necessary to improve the differentiation between the sounds for the guidance regarding the approximation and inclination of the needle.

**Conclusions:** Providing acoustic feedback during an ultrasound-guided percutaneous procedure is feasible, useful and practical, making it easier for the user to place the needle in the ultrasound image plane.

#### PRELIMINARY COMPARATIVE STUDY OF COATING TECHNIQUES FOR DRUG-ELUTING BIODEGRADABLE URETERAL STENTS

J.E. de la Cruz<sup>1</sup>, C. Sousa<sup>1</sup>, S. Álvarez<sup>2</sup>, A. López de Alda<sup>3</sup>, F.M. Sánchez-Margallo<sup>1</sup>, F. Soria<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón Cáceres, <sup>2</sup>Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, <sup>3</sup>Hospital de Don Benito, Badajoz, Spain

**Objectives:** Unfortunately, there is currently no system for the local and safe release of chemotherapy drugs at therapeutic doses and exposure time, for the adjuvant treatment of non-infiltrating upper urinary tract tumours. Aim: Evaluation of three laboratory techniques to optimize the coating and controlled release of chemotherapy drugs in biodegradable ureteral stents.

**Methods:** Methylamine chloride (methylene blue) is used as the model chemical compound. Three coating techniques are used on identical fragments of the biodegradable ureteral stent BraiSiens®. Group-I: Dip coating technique without protein base (10mg/ml); Group-II: Nanocoating technique with protein base (10mg/ml); Group-III: Dip coating mix, incorporates the protein base with crystallization of the chemical compound to modify its solubility (10mg/ml). 6 samples per group. All the samples of the study are introduced in aliquots with PBS 1X (5ml), orbital agitation and 37.5° C. PBS is changed at follow-up times: 1-2-4-24-48-72-96-120-144-168-192 hours. The release kinetics of methylamine chloride is evaluated at each follow-up by spectrophotometry.

**Results:** Group-I shows a mean value of 74±10µg released compound. The release is very abrupt and 90% of the stent load is reached in the first 4 hours. Significant standard deviations in percentage of total compound released were observed in this Group. Group-II shows a minimum load capacity and release of methylamine chloride of 10±1µg, with a very rapid release: 97% of the compound during the first two hours. Group-III, with a release capacity of 116±8µg, had delivered 92% by 72h.

**Conclusions:** Among the evaluated techniques, "dip coating mix" has a higher release capacity of the chemical compound, with a sustained release over time, which makes it an appropriate technique for obtaining drug-eluting stents. The protein coating as a vehicle for chemical compounds allows a kinetic release at a higher concentration and greater control in the release. Urine studies are necessary to evaluate this kinetics in biodegradable chemotherapeutic-releasing stents.



## Anexo 2. Artículo publicado en European Surgical Research

European  
Surgical Research

Research Article

Eur Surg Res  
DOI: 10.1159/000520676

Received: March 18, 2021  
Accepted: October 28, 2021  
Published online: December 7, 2021

# Ischemic Conditioning in the Right Colon and Terminal Ileum: An Experimental Rat Model

Gerardo Rodríguez-Leon<sup>a</sup> Fernando Estremiana<sup>b,c</sup> Monica Miro<sup>b,c</sup>  
Carla Bettonica<sup>b,c</sup> Humberto Aranda<sup>b,c</sup> Leandre Farran<sup>b,c</sup> Javier de Oca<sup>c</sup>  
Fatima Sabench<sup>d</sup> Rosa Jorba<sup>d,e</sup>

<sup>a</sup>General Surgery Department, Hospital de Viladecans, Barcelona, Spain; <sup>b</sup>Esophagogastric Surgery Department, Hospital Universitari Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Spain; <sup>c</sup>Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>d</sup>Universitat Rovira Virgili, Tarragona, Spain; <sup>e</sup>General Surgery Department, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain

### Keywords

Delay phenomenon · Ischemic conditioning · Esophageal replacement · Esophagectomy · Colon

### Abstract

**Introduction:** Preoperative gastric ischemic conditioning (IC) improves the outcome of esophageal replacement gastropasty and is associated with low morbidity. However, when the stomach cannot be used for esophageal replacement, a colonic replacement is required. The study aim was to assess the viability of right colon and terminal ileum IC in a rat model and the histological damage/recovery sequence and determine if neovascularization is a potential adaptive mechanism. **Methods:** The study was conducted in *Rattus norvegicus* with ileocolic vascular ligation. Seven groups of animals were established (6 rats per group) with groups defined by the date of their post-IC euthanasia (+1, +3, +6, +10, +15, and +21 days). Comparisons were made with a sham group. Viability of the model was defined as <10% of transmural necrosis. The evaluation of histological damage used the Chiu score in hematoxylin and eosin sections of paraffin-embedded specimens with CD31 immunohistochemical assessment of neovascularization by the median of submuco-

sal vessel counts in 5 high-magnification fields. **Results:** Transmural colon necrosis occurred in 1/36 animals (2.78%) with no animal demonstrating transmural ileal necrosis. The maximum damage was observed in the colon on +1 day post-IC (average Chiu score 1.67,  $p = 0.015$ ), whereas in the ileum, it was on days +1, +3, and +6 (average Chiu score 1.5, 1.3, and 1.17;  $p = 0.015, 0.002, \text{ and } 0.015$ , respectively). In the +21-day group, histological recovery was complete in the colon in 4 (66.7%) of the 6 animals and in the ileum in 5 (83.3%) of 6 animals. There were no significant differences in quantitative neovascularization in any of the groups when compared with the sham group or when comparisons were made between groups. **Conclusions:** The tested animal model for IC of the colon and terminal ileum appeared to be feasible. Histological damage was maximal between the 1st and 3rd day following IC, but by day 21, recovery was complete in two-thirds of the rats. There was no evidence in this preliminary IC model that would suggest neovascularization as an adaptive mechanism.

© 2021 S. Karger AG, Basel

Meeting presentation: 25th Congress of the Spanish Society for Surgical Research, Barcelona, December 2019. Abstract: BJS 2020;107(S1):5–20.

karger@karger.com  
www.karger.com/usr

© 2021 S. Karger AG, Basel

Correspondence to:  
Gerardo Rodríguez-Leon, rodriguezleon@gmail.com

Karger



## Introduction

Ischemic conditioning (IC) is the tissue adaptation resulting from partial or permanent suppression of vascularization. Preoperative ischemic conditioning (PIC), also known as the “delay phenomenon,” was developed by plastic surgeons to improve flap survival. This PIC technique mobilizes a flap but delays its transposition usually for 2–3 weeks, effectively achieving better adaptation to ischemia and diminishing the likelihood of necrosis.

In reconstruction after esophagectomy, the same principle applies requiring partial mobilization and devascularization of a segment of the digestive tract to construct a conduit; the stomach is the first option in adults, and when it is not available, the second option is the colon [1]. Esophagectomy has high morbidity (50%) and mortality (5–10%) [2], with ischemia of the conduit a principal determinant of significant complications, including anastomotic dehiscence, conduit necrosis, or stenosis. In a comparative study of gastric duct versus colonic duct, Briel et al. [3] reported that the global prevalence of duct ischemia was 9.2%, with no significant differences between the colonic and gastric ducts, whereas in the review by Gust et al. [1], the prevalence of ischemia of the colonic duct was between 0% and 10%. Although conducting a preoperative study of vascularization of the colon is not a systematic practice [1], an audit performed in the UK indicated that almost half of the esophagogastric surgeons surveyed consider performing preoperative angiography [4].

Different segments of the colon can be used to create the conduit, and a recent meta-analysis [5] stated that left coloplasty was the most frequent (70.9%) procedure, with a small difference in morbidity between left and right coloplasty (15.7% vs. 18.7%, respectively). In our team, we have more experience with right coloplasty [6, 7] which has the following advantages over left coloplasty: less disparity in the caliber between the ileum and esophagus, the possibility that the Bauhin valve acts as an anti-reflux mechanism, and the least variability in terms of vascularization. Arterial vascularization of the right colon is mainly determined by the ileocolic artery and the right branch of the middle colic artery, both communicated through the marginal artery (present in 99.8%, 95%, and 100% of cases, respectively), whereas the right colic artery has a less relevant role, a more variable origin, and is present as such in two-thirds of the cases [8].

Several techniques can improve conduit vascularity, such as PIC, supercharged microvascular augmentation, an omental patch, or exogenous agents (such as vascular

endothelial growth factor) [9]. The use of gastric PIC was first analyzed in an experimental rat model by Urschel [10] in 1993. Later experimental models have shown that gastric PIC decreased the rate of dehiscence, improved oxygen delivery to the terminal end of the gastroplasty, and was associated with reduced collagen deposition [11]. Several recent clinical studies and meta-analyses show that PIC may decrease the rate of anastomotic dehiscence and the reoperation rate from leaks [2, 12], with low morbidity [2, 13].

The only available experimental animal study on the delay phenomenon in the colon we know of is by Souther and Vistnes [14] in which an ileocolic anastomosis was performed in rats after deliberate ligation of the penultimate and terminal branches of the ileocolic arcade. The study aim was to determine the viability of right colon and terminal ileum IC in a rat model, assess the histological damage/recovery sequence, and determine if neovascularization is a potential adaptive mechanism.

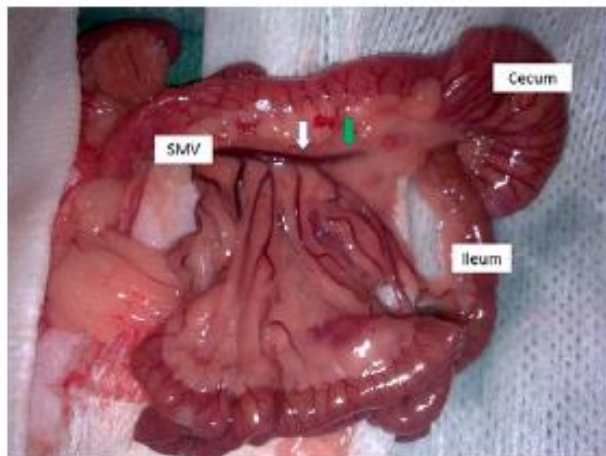
## Materials and Methods

The study protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona, developed in the Bellvitge's Animal Facility, and complies with the regulations of the European Union (directive 86/609 CEE) and May 1995 of the Generalitat de Catalunya regarding the protection of animals used for experimentation and other scientific purposes. The relevant ARRIVE 2.0 [15] and HARRP [16] guidelines were followed. Female Sprague Dawley rats weighing from 200 to 300 mg and aged from 8 to 12 months (Harlan U.K. Ltd., Shaw's Farm, Blackthorn, Bicester, Oxon, OX OTP England) were used. Healthy rats were included after a quarantine period. The sample size was based upon a previous study conducted by our group on gastric PIC [17]. There were 6 study groups and a sham group ( $n = 6$  each, 42 in total) grouped according to the number of days post-IC when they were euthanized: +1, +3, +6, +10, +15, and +21.

### *Ischemic Conditioning Protocol*

Antibiotic prophylaxis was a preoperative dose of subcutaneous enrofloxacin (7.5 mg/kg) with buprenorphine analgesia (0.05 mg/kg). General anesthesia was isoflurane inhalation by using an induction dose at 5% and a 1–2.5% maintenance dose. A midline laparotomy was performed with identification, ligation (4-0 silk), and transection of the arterial and venous ileocolic vessels. The laparotomy wound was closed with a 3-0 silk suture, and the skin was closed with staples. The euthanasia method was by CO<sub>2</sub> asphyxiation. To determine the optimal site for vessel ligation, 2 groups of 4 animals each were used: 1 group underwent tying off the main ileocolic vessel alongside the distal ileal branch (Fig. 1, white arrow), and 1 group underwent ligation of the ileocolic artery only (Fig. 1, green arrow). Two animals from the former group were euthanized due to deterioration of their clinical condition, with postmortem autopsy confirming cecal necrosis. Animals from the latter group were alive and well without exhibiting any





**Fig. 1.** Vascular anatomy of the ileocolic region in the rat. The white arrow indicates the initial ligation site that included the last ileal branch (necrosis of the cecum occurred in 2/4 animals). The green arrow indicates the definitive ligation point in the remaining animals. SMV, superior mesenteric vessels.

clinical signs or symptoms on postoperative day 3. Therefore, ileocolic vessel ligation was chosen for all of the animals included in this study who were monitored daily until the postoperative day 3 and then every 48 h thereafter. Table 1 shows the pain assessment parameters. Euthanasia was performed if there was any evidence of animal distress. The following criteria for euthanasia were used: a  $\geq 20\%$  loss of weight, loss of consciousness by the animal, and/or an inability of the animal to move normally. During the first 3 days postoperatively, subcutaneous meloxicam 1 mg/kg every 24 h was administered for analgesia. All animals were fed and watered ad libitum.

#### Outcome Measures

To determine the primary outcome measure (transmural necrosis), we accepted a colonic or ileal necrosis rate of  $<10\%$  as our viability standard in accordance with a similar rate reported by Gust et al. [1] for eso-coloplasty. Secondary outcome measures included a histological damage score and quantification of neovascularization. The histological damage score has been described by Chiu et al. [18] for paraffin-embedded specimens stained with hematoxylin and eosin. Slides were categorized as 0: normal mucosa, 1: increase in the subepithelial space, 2: elevation of the epithelium, 3: moderate/severe intra/subepithelial edema, 4: transmucosal infarction, and 5: transmural infarction. Quantification of neovascularization was also performed on paraffin-embedded material immunohistochemically stained for the vessels with CD31 (ab28364; Abcam, Cambridge, UK). In each slide, the number of vessels in 5 high-magnification fields of both the colon and ileum at the submucosal level was counted, and the median number of vessels was compared with the reference (sham) group. Tissue samples were coded prior to histological analysis so that they were not identifiable by group. In addition to these groups, 8 more animals were used to define

**Table 1.** Pain assessment parameters

Weight loss, %
0: normal
1: $<10$
2: 10–15
Physical appearance
0: normal
1: bowed
Behavioral disturbances
0: none
1: inability to move normally

Management: 0–2: analgesia according to protocol; 3–4: rescue analgesia.

the ligation site of the vessels and handling of the samples. For histological analysis, the coded samples were analyzed by a surgeon supervised by a pathologist.

#### Statistical Analysis

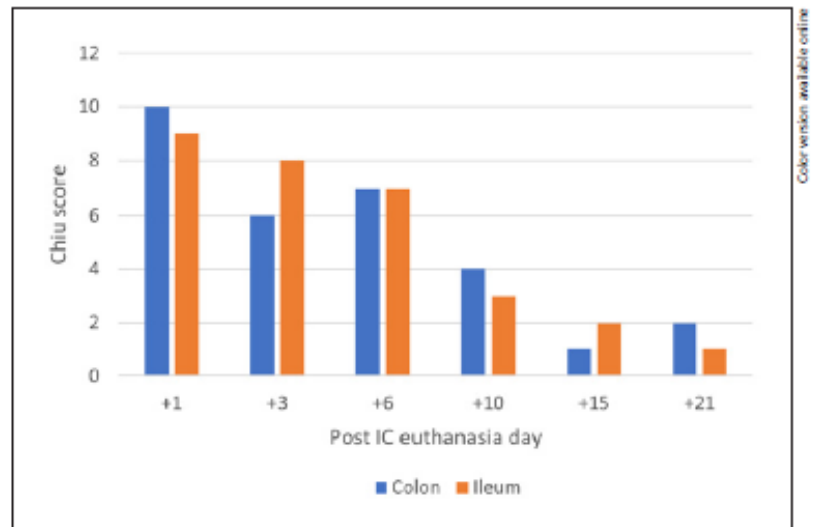
Data were analyzed by using the Stata 13 program (StataCorp, College Station, TX, USA). The rate of necrosis was compared with the maximum expected proportion of 10% by using an exact binomial test. Differences in the rates of histological damage and vascular quantification were assessed by performing Fisher's exact test and the Kruskal-Wallis test combined with a Fisher Pitman randomization, respectively.  $p$  values of  $<0.05$  were considered to be indicative of statistical significance.

## Results

#### Histological Scoring

Among all animals (36), colonic transmural necrosis was evident in 1 (2.78%) of the +6-day group, with epithelial necrosis (Chiu score = 4) in 1 further rat. No ileal transmural necrosis was observed in any rat, and there was no need for a pre-emptive sacrifice to be made ahead of schedule. Figure 2 summarizes the Chiu score (minimum = 0, maximum = 30) in each group of animals. For the colon, maximal histological damage occurred in group +1-day with a significant difference when compared with the sham group ( $p = 0.015$ ). In the successive groups, there was incrementally less quantitative histological damage in the other groups. There were 4/6 rats in the +21-day group that showed no histological damage (grade 0) and 2/6 animals in this group with only mild (grade 1) damage. Table 2 shows the differences in damage for both the colon and ileum between the 6 study groups and sham group. There were no significant differences in the colonic Chiu score for any other group. For the ileum, the maximum histological damage was evident





**Fig. 2.** Sum of the total Chiu score by group. Each column corresponds to the sum of the Chiu score of the animals belonging to that group.

**Table 2.** Comparison of Chiu scores between the conditioned group and the sham group

Group	Colon		Ileum	
	Chiu score*	p value <sup>†</sup>	Chiu score*	p value <sup>†</sup>
+1	1.67	<b>0.015</b>	1.5	<b>0.015</b>
+3	0.83	0.061	1.3	<b>0.002</b>
+6	1.17	0.182	1.17	<b>0.015</b>
+10	0.67	0.182	0.5	0.182
+15	0.16	1	0.33	0.455
+21	0.33	0.455	0.17	1

Significant values ( $p < 0.05$ ) are indicated in bold. \* Average Chiu score by group. <sup>†</sup> Comparison versus sham group, Fisher's exact test.

in the +1-day group, with progressively less damage in the other groups. In the +21-day group, 5/6 animals had no histological damage (grade 0), and one showed mild (grade 1) damage only. There was a significant difference in histological damage between the +1-, +3-, and +6-day groups and sham group (Table 2).

#### Blood Vessel Count

In each animal, the total number of vessels detected by CD31 immunohistochemistry in 5 high-magnification fields was determined. Animals with epithelial or transmural necrosis were excluded. The results are

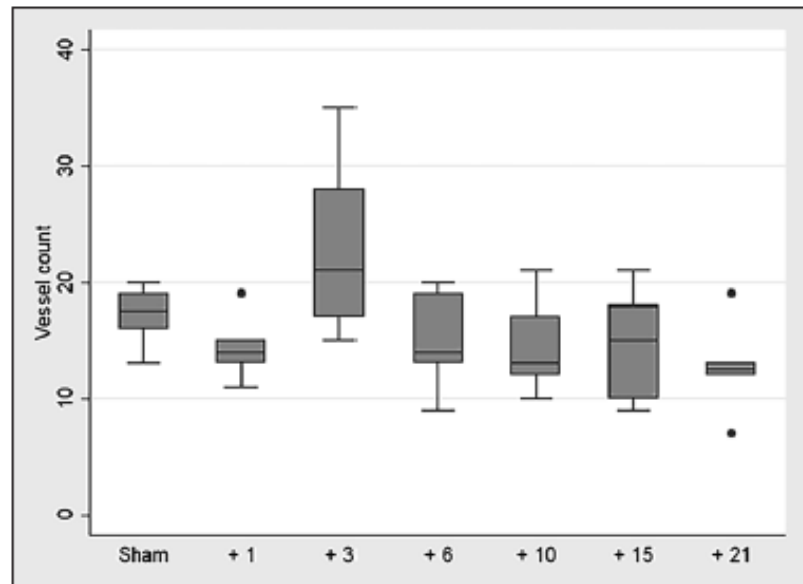
**Table 3.** Median number of vessels\* (and IQR) in the colon and ileum in euthanized animals after ischemic conditioning

Group	Colon (IQR)	Ileum (IQR)
Sham	17.5 (3)	13 (3)
Group 1	14 (2)	14.5 (4)
Group 3	21 (11)	15.5 (8)
Group 6	14 (6)	16 (2)
Group 10	13 (5)	15 (2)
Group 15	15 (8)	16.5 (6)
Group 21	12.5 (1)	15.5 (5)

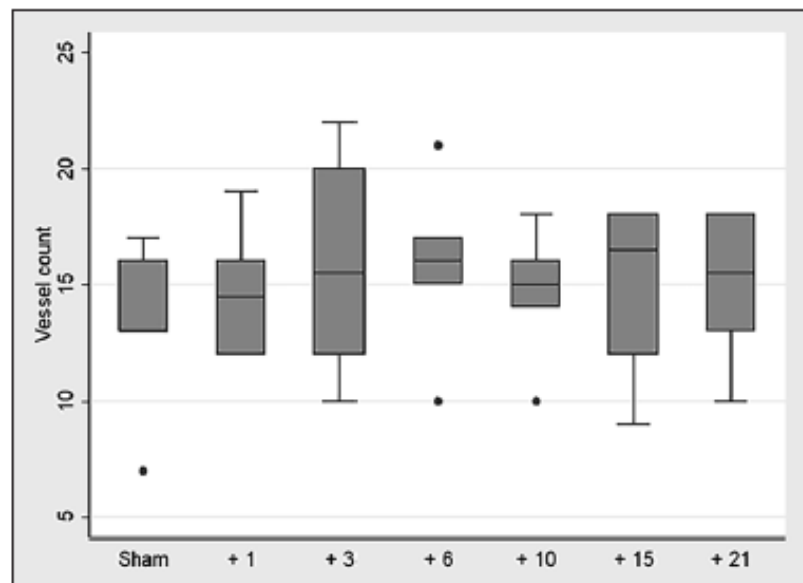
Total **15 (6.5)** **15 (4)**

IQR, interquartile range. \* Measurement made from 5 high-magnification fields.

shown in Table 3 and graphically presented in Figures 3 and 4. In the sham group, the median number of ileal and colonic vessels was 13 (interquartile range [IQR] = 10–16) and 17.5 (IQR = 14.5–20.5), respectively. Overall, the median number of ileal and colonic vessels was 15 (8.5–21.5) and 15 (11–19), respectively. No significant differences were noted between the groups with IC and the sham groups or in any of the analyses between groups ( $p = 0.076$ ). Overall, there was no difference in the mean weight between the animals with histological damage and those without (mean difference = 1.44 g,  $p = 0.42$ ).



**Fig. 3.** Distribution of colon vessel count. Box plot of vessel count in the colon by post-IC euthanasia day.



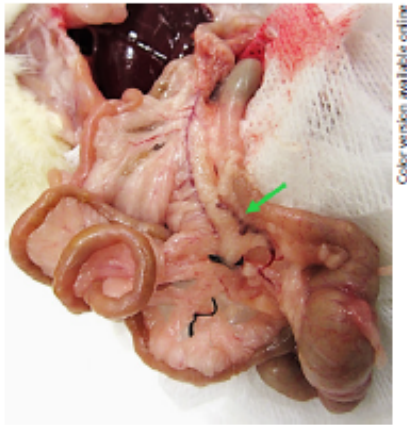
**Fig. 4.** Distribution of ileum vessel count. Box plot of vessel count in the ileum by post-IC euthanasia day.

### Discussion

This study showed that IC of the colon by ligation of the ileocolic vessels was feasible in this initial experimental model, with transmural necrosis of the colon observed in 1/36 animals (2.78%) and no transmural ileal necrosis. Importantly, ligation of the last ileal artery led to necrosis in half of the rats, a finding similar to that reported pre-

viously by Souther and Vistnes [14], so it must be preserved.

Overall, there was about a 10% risk of ischemia of the conduit (gastric or colonic) without PIC. Ischemic gastric conditioning provides a technically straightforward alternative with minimal morbidity [13], and colonic PIC could be a relatively simple strategy with similar benefits. Other more complex techniques can be used to improve



**Fig. 5.** Development of collateral circulation. The green arrow indicates the increase in diameter of the vascular arch of the ileum after ischemic conditioning.

perfusion (such as “supercharge”), but they have a high anastomotic leakage rate (42%) [19].

When designing an ileocolic conduit, knowing the anatomical variants is critical to preserve adequate vascularization. Colonic PIC enables prior direct assessment of the anatomy of the arterial supply to the colon, redirection of blood flow to the arteries for preservation, and prediction of vascular sufficiency before esophageal reconstruction surgery.

There is an ordered process of mucosal recovery following ischemia. Similar to gastric PIC [17], in our model, histological recovery was complete in two-thirds of the animals at 21 days, whereas the damage was mild in the remaining one-third, suggesting that 21 days would be adequate for performing an esophago-ileal anastomosis.

The mechanisms of IC have been studied mostly in the skin, whereas those in the digestive tract remain poorly understood. Furthermore, there is some confusion in the literature terminology, so we think that the most appropriate term to use is “preoperative IC,” and that “preconditioning,” “delay phenomenon,” or others should be avoided in this context.

Generally, these mechanisms can act on 3 levels: macrovascular, microvascular, and cellular effects. At the cutaneous level, an extensive study by Dhar and Taylor [20] suggested that after IC, there is a vasoconstriction period followed by permanent and irreversible dilation of the “choke vessels” that communicate with adjacent vascular territories (angiosomes), which is probably the most important mechanism of IC. At the intracellular level, there

are modifications in gene expression, inhibition of apoptosis, nitric oxide-mediated vasodilatation, and metabolic reprogramming. At the microvascular level, there is neovascularization with anastomoses between the capillaries of the plasty and its recipient site [21]. Unlike gastric PIC [17], in our model, we were unable to demonstrate that neovascularization is an IC mechanism, which is consistent with Dhar and Taylor [20]. Although it was not a study objective, we did observe a considerable increase in the caliber of marginal vessels in some animals (Fig. 5), similar to what happens with right gastroepiploic artery in gastric conditioning [22].

Our study had several limitations. Caution is needed when extrapolating the findings to humans since the rat has a relatively larger cecum in proportion to the rest of the intestine. The rat’s sex also may be important; Wu et al. [23] demonstrated that female mice tolerated ischemia-reperfusion-induced injury better than males. In our study, we used ex-breeding female rats to make better use of the available experimental animals given that when they would have finished their function and been euthanized anyway, along with being older, they would have been more similar to the adult human population that undergoes this type of procedure. Finally, there are currently more objective methods for quantifying neovascularization [24], but they are more expensive and require more resources.

Although this is a very early model of ileocolic PIC, we think it provides 2 relevant aspects for future studies using experimental animal models: histological recovery at 3 weeks is acceptable to perform an anastomosis, and preservation of the last ileal branch is key to avoiding necrosis of the cecum. Aspects to be analyzed in future studies could include the effect of PIC on blood flow in the colonic duct, anastomotic leak and conduit necrosis, dilation of the choke vessels as a mechanism of IC in the digestive tract, anatomical variations in the vascularization of the right colon in rats, effect of mechanical colonic preparation on PIC, and the role of experimental animal models in the surgical training of infrequent and complex procedures, such as this one.

## Conclusions

Performing IC of the right colon and terminal ileum was feasible in this animal model, with almost complete histological recovery by  $\leq 3$  weeks. Neovascularization did not appear to act as an adaptive mechanism. More animal studies are required to assess the effect of ileocolic preoperative IC on conduit blood flow and anastomotic healing before considering its use in humans.



## Acknowledgments

We thank Veronica Gomez for her support in preparing the surgical interventions and obtaining data. We also thank Alvaro Gimeno, Director of Animal House Bellvitge University of Barcelona, for the veterinary advice.

## Statement of Ethics

The study protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona at the February 12, 2012, meeting.

## Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

## References

- Gust I, Ouattara M, Coosemans W, Naftoux P, Thomas PA, D'Journo XB. European perspective in Thoracic surgery-eso-coloplasty: when and how? *J Thorac Dis*. 2016 Apr;8(S4):S387-98.
- Michalinos A, Antoniou SA, Ntourakis D, Schizas D, Ekmektzoglou K, Angouridis A, et al. Gastric ischemic preconditioning may reduce the incidence and severity of anastomotic leakage after oesophagectomy: a systematic review and meta-analysis. *Dis Esophagus*. 2020 May;33(10):doaa010.
- Briel JW, Tamhankar AP, Hagen JA, DeMeester SR, Johansson J, Choustoulakis E, et al. Prevalence and risk factors for ischemia, leak, and stricture of esophageal anastomosis: gastric pull-up versus colon interposition. *J Am Coll Surg*. 2004 Apr;198(4):536-41.
- Fisher RA, Griffiths EA, Evison F, Mason RC, Zylstra J, Davies AR, et al. A national audit of colonic interposition for esophageal replacement. *Dis Esophagus*. 2017 May; 30(5):1-10.
- Brown J, Lewis WG, Foliaki A, Clark GWB, Blackshaw GRJC, Chan DSY. Colonic interposition after adult oesophagectomy: systematic review and meta-analysis of conduit choice and outcome. *J Gastrointest Surg*. 2018 Jun;22(6): 1104-11.
- Farran-Teixidó L, Miró-Martín M, Biondo S, Conde-Mourino R, Bettonica-Larranaga C, Danso HA, et al. Reconstrucción esofágica en un segundo tiempo: coloplastia y gastroplastia. *Cir Esp*. 2008;83(5):242-6.
- Farran Teixidor L, Viñals Viñals JM, Miró Martín M, Higuera Suñé C, Bettonica Larranaga C, Aranda Danso H, et al. Ileocoloplastia supercharged: una opción para reconstrucciones esofágicas complejas. *Cir Esp*. 2011 Feb; 89(2):87-93.
- Bruzzi M, M'harzi L, Poghosyan T, Ben Abdallah I, Papadimitriou A, Ragot E, et al. Arterial vascularization of the right colon with implications for surgery. *Surg Radiol Anat*. 2020 Apr; 42(4):429-35.
- Enestvedt CK, Thompson SK, Chang EY, Jobe BA. Clinical review: healing in gastrointestinal anastomoses, part II. *Microsurgery*. 2006;26(3): 137-43.
- Urschel JD. Transplant delay will reduce anastomotic complications of gastric pull up for isolated esophageal atresia. *Med Hypotheses*. 1993 Jun;40(6):379-80.
- Reavis KM, Chang EY, Hunter JG, Jobe BA, Lineaweaver WC, Schirmer BD, et al. Utilization of the delay phenomenon improves blood flow and reduces collagen deposition in esophago-gastric anastomoses. *Ann Surg*. 2005; 241(5):736-47.
- Heger P, Blank S, Diener MK, Ulrich A, Schmidt T, Büchler MW, et al. Gastric preconditioning in advance of esophageal resection-systematic review and meta-analysis. *J Gastrointest Surg*. 2017 Sep;21(9):1523-32.
- Miró M, Farran L, Estremiana F, Miquel J, Escalante E, Aranda H, et al. Puede el acondicionamiento gástrico disminuir la incidencia de dehiscencia anastomótica esofagagástrica cervical? *Cirugía Española*. 2018 Feb;96(2):102-8.
- Souther SG, Vistnes LM. The intestine and the delay phenomenon - a preliminary report. *J Surg Res*. 1975 Jun;18(6):619-22.
- Percie Du Sertid N, Hurst V, Ahluwaliaid A, Alamid S, Aveyid MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2020 Jul 14; 18(7):e3000410.
- Osborne N, Avey MT, Anestidou L, Ritskes-Hoitinga M, Griffin G. Improving animal research reporting standards: HARRP, the first step of a unified approach by ICLAS to improve animal research reporting standards worldwide. *EMBO Rep*. 2018 May;19(5):e46069.
- Lamas S, Azuara D, de Oca J, Sans M, Farran L, Alba E, et al. Time course of necrosis/apoptosis and neovascularization during experimental gastric conditioning. *Dis Esophagus*. 2008 Jun; 21(4):370-6.
- Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg*. 1970 Oct [cited 2018 Oct 27];101(4):478-83.
- Esmonde N, Rodan W, Haisley KR, Joslyn N, Carboy J, Hunter JG, et al. Treatment protocol for secondary esophageal reconstruction using "supercharged" colon interposition flaps. *Dis Esophagus*. 2020 Oct;33(10):doaa008.
- Dhar SC, Taylor GI. The delay phenomenon: the story unfolds. *Plast Reconstr Surg*. 1999; 104(7):2079-91.
- Schreiber T, Salhofer L, Quinting T, Fandrey J. Things get broken: the hypoxia - inducible factor prolyl hydroxylases in ischemic heart disease. *Basic Res Cardiol*. 2019;114(3):16.
- Akiyama S, Kodera Y, Sekiguchi H, Kasai Y, Kondo K, Ito K, et al. Preoperative embolization therapy for esophageal operation. *J Surg Oncol*. 1998 Dec [cited 2019 Mar 23];69(4): 219-23.
- Wu M, Rowe JM, Fleming SD. Eicosanoid production varies by sex in mesenteric ischemia reperfusion injury. *Clin Immunol*. 2020 Nov; 220:108596.
- Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer*. 2002;38(12):1564-79.

## Funding Sources

The project was funded by grants from the Health Research Fund of the Carlos III Health Institute (FIS 98/0029-01 and IS 01/1260).

## Author Contributions

Rodríguez-Leon, De Oca, and Estremiana contributed to study conception and design. Rodríguez-Leon contributed to acquisition of data. Sabench, Jorba, and Rodríguez-Leon contributed to analysis and interpretation of data. Jorba, De Oca, and Rodríguez-Leon contributed to drafting of the manuscript. Miro, Bettonica, Aranda, and Farran contributed to critical revision.

## Data Availability Statement

All data generated or analyzed during this study are included in this article. Further enquiries can be directed to the corresponding author.



UNIVERSITAT  
ROVIRA i VIRGILI