



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**MODELO EXPERIMENTAL COMPARATIVO ENTRE
ANASTOMOSIS LINFATICOVENOSAS Y TRASPLANTE DE
COLGAJO LIBRE DE GANGLIO VASCULARIZADO EN EL
TRATAMIENTO DEL LINFEDEMA.**

Tesis doctoral

Randolfo Javier Fernández Peñuela

Directores

Dr. Jaume Masía Ayala.

Dra. Laura Casaní Arazo.



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**MODELO EXPERIMENTAL COMPARATIVO ENTRE
ANASTOMOSIS LINFATICOVENOSAS Y TRASPLANTE DE
COLGAJO LIBRE DE GANGLIO VASCULARIZADO EN EL
TRATAMIENTO DEL LINFEDEMA.**

**TESIS DOCTORAL
RANDOLFO J. FERNANDEZ PEÑUELA**

**Programa de Doctorado
Cirugía y Ciencias Morfológicas**

Director

Dr. Jaume Masía Ayala

Dra. Laura Casaní Arazo

Tutor

Dr. Jaume Masía Ayala

Barcelona, 2019

«El hombre de ciencia, que vive inicialmente en el presente y le gustaría ser capaz de entrever el futuro, encuentra en el pasado elementos que le permiten entender mejor ciertos datos fundamentales y permanentes que dirigen su búsqueda.»

JULIEN CAIN

Dedicatoria

A Dios todopoderoso

A mi Familia Pilar fundamental de mi vida.

A mis Hijos Carlos Javier y Pedro Alejandro, Son mi inspiración a seguir adelante a pesar de las dificultades que puedan surgir en la vida.

A Ysabel, mi compañera de vida. Gracias por tu apoyo

A mi Madre Gaudys por estar siempre presente, a mi Padre quien aunque físicamente no este, perdura en mi memoria.

A mis hermanos gracias por compartir las alegrías y tristezas.

A todos Gracias.

Agradecimiento

Al Servicio de Cirugía Plástica y Reparadora del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Gracias por haberme permitido formar parte de ustedes. En especial al Dr. Jaume Masiá y la Dra. Gemma Pons quienes no decaen en la búsqueda de tratamientos para el Linfedema.

Al ICCC Institut Catala de Ciencias Cardiovasculares.

A la Dra. Laura Cassani quien siempre estuvo a mi lado dándome el ánimo para continuar. Por su tiempo y entusiasmo en los proyectos de investigación del instituto.

Al Personal del Estabulario, en especial a Sergi y a Ángel.

Al Dr. Juan Oriol por el procesamiento de las muestras histológicas.

Al Dr. Ignasi Gich por el manejo de los datos estadísticos.

Finalmente, Gracias a Todos.

RESUMEN DE LAS PUBLICACIONES

La primera publicación se realizó con el objetivo de encontrar un modelo animal viable para la práctica del desarrollo y tratamiento quirúrgico del linfedema. El modelo animal seleccionado fue el conejo, es fácil de manejar, tiene un tamaño adecuado y su sistema linfático está bien definido. En el artículo se describe como se crea el desarrollo del linfedema y su tratamiento mediante la realización de anastomosis linfático venosas.

En el segundo artículo se utiliza el mismo modelo animal y se realiza la generación de linfedema en el miembro posterior del conejo mediante la eliminación del ganglio linfático poplíteo. Para el tratamiento del linfedema se realiza la transferencia del ganglio poplíteo contralateral.

PRIMERA PUBLICACION:

Fernández Peñuela R¹, Pons Playa G¹, Casaní Arazo L², Masiá Ayala J¹. An Experimental Lymphedema Animal Model for Assessing the Results of Lymphovenous Anastomosis. *Lymphat Res Biol.* 2018;16(3):234-39.

El sistema linfático es el menos estudiado de los sistemas del cuerpo y, como resultado, su contribución a la salud humana y las enfermedades no son bien conocidas. El fallo del sistema linfático para drenar el líquido extravasado de manera eficiente conduce a la acumulación de la linfa en el tejido intersticial, causando así linfedema. A pesar de los procedimientos de microcirugía, los resultados del tratamiento del linfedema siguen siendo decepcionantes. El objetivo de este estudio consistió en seleccionar un modelo animal experimental capaz de reproducir la enfermedad y que permitiese realizar diversos abordajes quirúrgicos y terapéuticos.

Métodos y resultados: Se indujo linfedema en conejos blancos de la raza Nueva Zelanda (NZW) realizando una denudación total de la piel y destrucción de los conductos linfáticos mediante microcirugía en la oreja derecha, la oreja izquierda se mantuvo como control. Se observó la generación de linfedema entre los días 7 y 15 después de la intervención. El día 15 post-intervención se practicó la anastomosis linfaticovenosa termino-terminal en el borde posterior-basal de la oreja derecha. Se realizaron mediciones seriadas del espesor de la oreja durante el estudio. El grosor de la oreja aumentó significativamente ($p < 0.05$) después de la inducción de linfedema en comparación con el control (3.2 ± 0.4 vs. 1.3 ± 0.04 mm). Después de la anastomosis, el grosor de la oreja se redujo hasta un valor semejante al control (2.0 ± 0.26 mm). Conclusión: Este modelo animal de inducción de linfedema en el oreja demostró ser una alternativa reproducible para estudiar nuevos enfoques en el tratamiento del linfedema, permitiendo además el desarrollo de habilidades microquirúrgicas.

Palabras clave: modelo animal, modelo de conejo, investigación linfática.

SEGUNDA PUBLICACION:

Fernández Peñuela R¹, Casaní Arazo L², Masiá Ayala J¹. Outcomes in vascularized lymph node transplantation in rabbits: A reliable model for improving the surgical approach to lymphedema. *Lymphat Res Biol.* 2019; 00(00):0-0.

El tratamiento no quirúrgico conservador se ha aplicado tradicionalmente al linfedema. Los primeros procedimientos quirúrgicos fueron invasivos y desfigurantes y su éxito a largo plazo a menudo fue limitado. En contraste, las técnicas quirúrgicas actuales son mucho menos invasivas y se ha demostrado que son efectivas para reducir el exceso de volumen, el riesgo de celulitis y la necesidad de prendas de compresión. Los procedimientos microquirúrgicos tales como la anastomosis de tejido linfático y la transferencia de ganglios linfáticos vascularizados se pueden utilizar para tratar el linfedema y están ganando popularidad. En este estudio, primero evaluamos la posibilidad de generar linfedema en la extremidad posterior del conejo y luego planteamos un tratamiento microquirúrgico mediante la transferencia de ganglio linfático vascularizado, sin transferencia de vasos linfáticos.

Métodos y resultados: Se utilizó como modelo experimental el conejo de raza New Zealand White (NZW). Los animales se sometieron primero a una cirugía en la que se extirpó el ganglio linfático poplíteo en la extremidad posterior izquierda para inducir la formación de linfedema. Después de 15 días post-intervención, se realizó otra operación para extirpar el ganglio linfático poplíteo contralateral y transferirlo a la extremidad con linfedema. Nuestro modelo mostró que la extirpación del ganglio poplíteo genera linfedema y que la transferencia de ganglio linfático es capaz de reducir el linfedema en la extremidad posterior del conejo. Las medidas del miembro posterior intervenido fueron: volumen basal (51.94 ± 11.23), volumen del día de la transferencia (73.40 ± 26.47) y volumen final (50.13 ± 12.0). Conclusión:

Hemos desarrollado un modelo animal, mediante transferencia microquirúrgica de ganglio linfático factible para inducir y tratar el linfedema.

Palabras clave: ganglio linfático, linfedema, modelo animal.

SUMMARY OF PAPERS

The first publication aim was to find a viable animal model for the development of secondary lymphedema in order to study its surgical treatment. The animal model selected was the rabbit, because is easy to handle, adequate size and its lymphatic system is well defined. The article describes the induction of a lymphedema and its treatment by performing venous lymphatic anastomoses.

In the second article the same animal model is used and the generation of lymphedema in the hind limb of the rabbit is carried out by lymph node exeresis. For the treatment of lymphedema, the contralateral popliteal node is transplanted.

FIRST PAPER

Fernández Peñuela R¹, Pons Playa G¹, Casaní Arazo L², Masiá Ayala J¹. An Experimental Lymphedema Animal Model for Assessing the Results of Lymphovenous Anastomosis. *Lymphat Res Biol* 2018;16(3):234-39.

Abstract

Background: The lymphatic system is the least studied of the body's systems, and as a result its contribution to human health and diseases is not well known. The failure of the lymphatic system to drain extravasated fluid efficiently leads to accumulation of lymph in the interstitial tissue, thus causing lymphedema. Despite developments in microsurgery procedures, the results of lymphedema treatment remain disappointing. The aim of this study was to develop an experimental animal model that is able to reproduce the disease and to apply various surgical and therapeutic approaches.

Methods and Results: Lymphedema was induced in New Zealand white rabbits (NZW) by a total skin denudation and destruction of the lymph channels via microsurgery in the right ear, leaving the left ear as control. Lymphedema generation was observed between days 7 and 15 after intervention. On day 15, a terminal venous lymphatic anastomosis was performed on the posterior edge of the right ear. Serial measurements of ear thickness were made during the study. Ear thickness was significantly ($p < 0.05$) increased after lymphedema induction compared to baseline (3.2 ± 0.4 vs. 1.3 ± 0.04 mm). After anastomosis, ear thickness was reduced (2 ± 0.26 mm). **Conclusion:** This animal model of lymphedema induction in the ear proved to be a reproducible alternative for studying new approaches to lymphedema treatment and for developing microsurgical skills.

Keywords: animal model, rabbit model, lymphatic research

SECOND PAPER

Fernández Peñuela R¹, Casaní Arazo L², Masiá Ayala J¹. Outcomes in vascularized lymph node transplantation in rabbits: A reliable model for improving the surgical approach to lymphedema. *Lymphat Res Biol.* 2019; 00(00):0-0.

Abstract

Background: Conservative nonsurgical treatment has traditionally been applied to lymphedema. Early surgical procedures were invasive and disfiguring and their long-term success was often limited. In contrast, contemporary surgical techniques are much less invasive and have been shown to be effective in reducing excess limb volume, the risk of cellulitis, and the need for compression garments. Microsurgical procedures such as lymphovenous anastomosis and vascularized lymph node transfer can treat the excess fluid component of lymphedema and are gaining in popularity. In this study, we first evaluate the possibility of generating lymphedema in the hind limb of a rabbit and then describe its treatment with microsurgical lymph node transfer without lymph vessel transfer. **Methods and Results:** In experimental rabbit models, animals first underwent surgery in which the popliteal lymph node was removed to create lymphedema in the hind limb. After 15 days, another operation was performed to excise the contralateral popliteal lymph node and transfer it to the limb with lymphedema. Our model showed that lymph node transfer was able to reduce lymphedema in the rabbit's hind limb; intervened hind limb: basal volume (51.94 ± 11.23), volume day transfer (73.40 ± 26.47), and final volume (50.13 ± 12.0). **Conclusion:** We have developed a feasible model to microsurgically induce and treat lymphedema by lymph node transfer that shows promising results.

Keywords: animal model; lymph node; lymphedema.

**MODELO EXPERIMENTAL COMPARATIVO ENTRE
ANASTOMOSIS LINFATICOVENOSAS Y TRASPLANTE DE
COLGAJO LIBRE DE GANGLIO VASCULARIZADO EN EL
TRATAMIENTO DEL LINFEDEMA.**

ÍNDICE

1. Introducción	25
1.1 Linfedema	27
1.2 Modelos Experimentales de Linfedema.	28
1.3. Anastomosis linfaticovenosa	31
1.4. Anastomosis ganglionar	31
2. Hipótesis	35
3. Objetivos	39
3.1. Objetivo general	41
3.2. Objetivo específico	41
4. Justificación	43
5. Materiales y métodos	47
5.1. Diseño	49
5.1.1. Diseño primera publicación	49
5.1.2. Diseño segunda publicación	49
5.2. Lugar donde se realizó la tesis	50
5.3. Muestra	50
5.4. Protocolo de estudio	51
5.5. Análisis estadístico	56
6. Resultados	59
6.1. Primera publicación	61
6.2. Segunda publicación	61
7. Publicaciones	63
7.1. Primer artículo	65
7.2. Segundo artículo	73
8. Discusión	81
9. Conclusiones	89
10. Referencias	95
11. Anexos	103
11.1. Anexo I: Figura 1 del primer artículo	105
11.2. Anexo II: Figura 2 del primer artículo	107
11.3. Anexo III: Técnica de infiltración en la pata de conejo	109
11.4. Anexo IV: Visualización del canal linfático	111

1

Introducción

1.1. LINFEDEMA

El sistema linfático es, sin duda el menos estudiado de los sistemas del cuerpo, y como resultado su contribución a la salud humana y las enfermedades no se comprenden bien¹. Cuando el sistema linfático es incapaz de drenar la extravasación de líquidos de manera eficiente, la linfa se acumula en el tejido intersticial, por lo tanto se produce el linfedema². El linfedema se define como un aumento anormal de linfa en los espacios intersticiales debido a una alteración del funcionamiento del sistema linfático, que se manifiesta por edema en una extremidad o región del cuerpo. Es una condición crónica y progresiva que afecta a la calidad de vida. Clásicamente, se ha descrito que el linfedema aparece clínicamente cuando el volumen acumulado de linfa en el intersticio supera aproximadamente el 20% del normal.

El linfedema puede ser primario o secundario. El primario es congénito y se caracteriza por la aplasia, hipoplasia o hiperplasia de los vasos linfáticos y/o por alteraciones de los ganglios linfáticos. La forma secundaria es mucho más común y se debe a un deterioro adquirido del sistema linfático, típicamente debido a una infección (por ejemplo filariasis), trauma o consecuencias postquirúrgicas, especialmente cirugía oncológica y radioterapia. También puede resultar por el daño a los vasos linfáticos por insuficiencia venosa crónica³. Para el manejo del linfedema se han desarrollado diferentes enfoques terapéuticos, médicos y quirúrgicos, tales como trasplante autólogo de los ganglios linfáticos, anastomosis venosa linfática, etc.².

A pesar de los recientes avances en procedimientos de microcirugía para el tratamiento del linfedema, los resultados siguen siendo poco alentadores⁴. El linfedema es una enfermedad compleja que involucra una gran cantidad de componentes del tejido, lo que causa que el desarrollo de sistemas exclusivamente *in Vitro* para estudiar su fisiopatología sea difícil y no permita el abordaje completos de la enfermedad. Por lo tanto, el uso de modelos animales, reproducibles y confiables, es indispensable para replicar la

fisiopatología. Para replicar la fisiopatología del linfedema y realizar procedimientos terapéuticos y prácticas quirúrgicas se requiere del desarrollo de modelos animales experimentales fiables y reproducibles. Con la intención de reproducir el linfedema crónico se han descrito numerosos procedimientos y utilizado diferentes modelos animales experimentales, sin embargo, el costo es alto y los resultados hasta ahora han sido inconsistentes⁵.

1.2. MODELOS EXPERIMENTALES DE LINFEDEMA.

El desarrollo de modelos experimentales comenzó con Halsted, quien fuera el pionero en la técnica de mastectomía radical como tratamiento al cáncer de mama. En 1922 propone el término “Elefantiasis quirúrgica” para describir el linfedema post mastectomía.

En 1936, su colaborador Reichert fue el primero en intentar producir un linfedema crónico de forma experimental en perros, para lo cual les practicaba en la pierna una incisión circular de todos los tejidos blandos, respetando los pedículos vasculares femorales y el fémur. En los primeros días postoperatorios, se observaba la presencia de edema sin conseguir la progresión hacia linfedema⁶. En 1977, Olszewski⁷ reporta un modelo experimental de linfedema en el muslo del perro muy promisorio. La técnica consistía en la escisión circular de una banda de 2 cm de piel y tejido subcutáneo; además de la disección de los vasos linfáticos del muslo y del ganglio poplíteo, se requería realizar una resección del tejido subcutáneo, la fascia y el periostio, dejando un hueco para la curación secundaria por granulación. Posteriormente la piel era suturada al músculo y el defecto se dejaba cicatrizar por segunda intención, sin aproximar los bordes de la herida; esto provocaba una cicatriz retráctil que evitaba que la red linfática superficial tuviese la oportunidad de restaurar el flujo linfático. Esta técnica permitió el desarrollo de linfedema. Sin embargo, solo 8 de 23 animales desarrollaron linfedema de forma permanente^{7,8}. Olszewski⁷ concluye que la simple sección de los canales linfáticos no es suficiente para la formación

del linfedema, para ello se requiere que la red linfática superficial no pueda restaurar su flujo. Este modelo resultó doloroso para los animales, de elevada duración, costoso y de mucha precisión (requería una cirugía muy exacta y larga).

En otro modelo experimental, propuesto por Clodius⁹ proponía la escisión de todo el tejido blando de la pierna del perro, excepto por unos puentes de piel anterior y posterior junto a los nervios y vasos principales. Para proteger las estructuras neurovasculares se colocaba un disco de Etheron (esponja de poliuretano) con aperturas apropiadas en el defecto que actuaría como barrera de la regeneración linfática. La fibrosis resultante ocasionó linfedema a los 5 meses aproximadamente¹⁰.

En las orejas de cobayas, Yong et al.¹¹ demostró que la resección de troncos linfáticos a partir de los 2 mm. no causa regeneración. Sin embargo, el método más exitoso para producir linfedema y prevenir la regeneración linfática es la resección de 2 cm. de longitud de los canales linfáticos. Una conclusión principal de estos estudios fue que la regeneración de los vasos linfáticos puede ocurrir si el defecto de los canales linfáticos es pequeño, menor a 2 mm.

En un intento por crear un modelo experimental simple, reproducible y duradero de linfedema crónico, se propuso el modelo experimental en la oreja de conejo¹²⁻¹⁶. Eloesser¹⁷ fue el primero en usar la oreja de conejo para estudiar el edema y la obstrucción linfática. El modelo consistió en realizar una incisión simple sobre el dorso de la oreja que ocasionaba una obstrucción linfática. Sin embargo, no fue suficiente para producir linfedema^{15,17}.

Numerosas ventajas han sido asociadas al modelo experimental animal con conejo, entre estas se destaca que es un área bastante homogénea de tejido, el drenaje se realiza a través de un tronco vascular central al cual se puede acceder mediante intervenciones quirúrgicas¹⁸. Otra ventaja del modelo de la oreja de conejo para linfedema es que es fácilmente reproducible y permite el muestreo para biología molecular y estudios histológicos¹⁸. Usando conejos blancos de Nueva Zelanda, Clodius y

Piller^{9,18} utilizaron azul patente para marcar los vasos colectores linfáticos. La técnica consistía en remover una banda de 4 cm de piel, junto con el tejido subcutáneo y el pericondrio. Identificaban el pedículo vascular y lo separaban de los vasos linfáticos, el pericondrio se preservaba para mantener la estructura de la oreja y los vasos, las heridas se cubrían con una gasa par prevenir la desecación.

Huang y Hsin¹⁵ utilizaron conejos blancos japoneses, una oreja fue intervenida y la otra preservada como control. La técnica consistió en la extirpación de una banda circunferencial de un centímetro de piel, tejido subcutáneo y pericondrio a 2 cm de la base de la oreja; el pedículo neurovascular fue protegido y el cartílago fue preservado. Para la visualización de la canales linfáticos, se inyectó 0,5% de azul de metileno por vía intradérmica en la punta de la oreja. Esta inyección permitió la visualización de 5 a 7 canales linfáticos mayores. Las mediciones y observaciones se realizaron en los días 3, 7, 15 y 30 del postoperatorio. La dilatación linfática se produjo entre el día 5 a 20 del postoperatorio, mientras que el proceso de fibrosis se iniciaba a partir del día treinta del postoperatorio¹⁵. Yoon et al.¹⁹ modificaron el modelo de Huang¹⁵ mediante la creación de un puente de piel. Una tira de la piel, tejidos subcutáneos, y pericondrio de 3 cm. de ancho fue circunferencialmente escindida desde la base de la oreja a excepción de la parte central de la piel del dorso de la oreja, lo que permitía dejar un "puente de piel" de 1 cm de ancho debajo del cual quedaba protegido el pedículo neurovascular. Posteriormente se realizaba una incisión en el borde distal del puente de piel para disecar y reseca los canales linfáticos bajo el microscopio. Los bordes de la piel se suturaban inversamente al pericondrio para evitar reaproximación de bordes de la piel y la recanalización de los vasos linfáticos. Esta técnica fue efectiva en conejos mayores de 4 años, los conejos más jóvenes no desarrollan linfedema. La razón de esta variabilidad es desconocida²⁰.

1.3. ANASTOMOSIS LINFATICOVENOSA.

El tratamiento del linfedema ha sido tradicionalmente conservador y no quirúrgico. Sin embargo, las opciones quirúrgicas para tratar esta condición están siendo abordadas desde el siglo pasado. Los primeros procedimientos fueron invasivos y desfigurantes y a largo plazo el éxito era limitado. Actualmente las técnicas microquirúrgicas son mucho menos invasivas y han demostrado ser eficaces para reducir el exceso de volumen de la extremidad afectada, el riesgo de celulitis, la necesidad de usar prendas de compresión, y tratamiento posterior. Los procedimientos microquirúrgicos tales como anastomosis linfaticovenosas, transferencia de ganglio linfático vascularizados, y el bypass linfático-linfático pueden tratar el exceso del componente fluido del linfedema que se presenta como edema. Hoy en día, estas técnicas quirúrgicas están siendo cada vez más populares.

La anastomosis linfático venosa es un tratamiento radical destinado a permitir el drenaje de la linfa directamente al sistema venoso mediante la creación de un bypass. Esta técnica surge como propuesta al fracaso de la terapia de compresión¹⁰. La técnica consiste en identificar un vaso linfático subdérmico y anastomosarlo a una vénula subdérmica de menor presión que el sistema venoso profundo. Estos vasos tienen diámetros menores de 0,8 mm por lo que la técnica empleada se denomina supramicrocirugía o supermicrocirugía²¹

1.4. ANASTOMOSIS GANGLIONAR

El avance más reciente en el tratamiento del linfedema quirúrgico es la transferencia de ganglio linfático vascularizado. El ganglio, una arteria y una vena se trasplantan desde la axila, región inguinal o submental al área afectada²²⁻²⁶. Una hipótesis es que los ganglios linfáticos transferidos actúan como una bomba y vía de aspiración para el drenaje linfático.

Para la investigación en prevención y tratamiento del linfedema se requiere modelos animales que permitan determinar la fisiopatología de la evolución de la enfermedad. Es importante además, identificar el momento ideal para evitar el progreso del linfedema y según la evolución de la enfermedad especificar las intervenciones adecuadas para estos pacientes²⁷. Generar linfedema crónico y consistente en animales de experimentación es altamente problemático. Históricamente, los esfuerzos para replicar el linfedema humano en modelos animales mediante cirugía, radiación, y/o toxicología han sido difíciles y complicados. El principal obstáculo para la creación de modelos animales satisfactorios se debe a una incapacidad para generar enfermedades crónicas en un ejemplar reproducible y estable en el tiempo²⁷. Modelos murinos han sido creados para evaluar los resultados de la transferencia de ganglio linfático²⁸⁻³⁰. En un modelo ovino, se trasplantaron ganglios linfáticos vascularizados para lograr mayor transferencia linfática. Se evidenció mejores resultados que en el caso de los trasplantes de ganglios linfáticos avasculares³¹. El modelo de conejo experimental³², es capaz de reproducir un linfedema similar al de los humanos y de duración suficiente para permitir el tratamiento con una variedad de técnicas.

El tamaño del cuerpo del conejo permite la transferencia de ganglios linfáticos periféricos vascularizados. En mamíferos más pequeños, esto sólo puede realizarse con el ganglio linfático mesentérico, lo que dificulta tanto el abordaje quirúrgico como la recuperación del animal. La anatomía linfática de la extremidad posterior y el suministro de sangre del ganglio poplíteo de conejo está bien documentado³³. Además, el ganglio poplíteo se identifica fácilmente y se puede explorar con un procedimiento menor (palpación).

Según Suami et al.³⁴, el sistema linfático de un conejo tiene tres o cuatro vasos linfáticos en la pata sin clara separación entre vasos linfáticos superficiales y profundos. Esto contrasta con los vasos linfáticos en patas de perros y en pies humanos, que están separados por una fascia profunda³⁴⁻³⁵. Sin embargo, se ha demostrado que la linfa de la extremidad inferior es drenada por dos sistemas linfáticos: Un sistema superficial que comprende

dos juegos de vasos, uno de los cuales drena la piel medial hacia los ganglios inguinales en la ingle y el otro drena la piel lateral hacia el ganglio poplíteo; mientras que un sistema linfático profundo drena los tejidos profundos del pie y la extremidad inferior al ganglio poplíteo.

En este estudio, primero evaluamos la posibilidad de generar linfedema en la extremidad posterior de un conejo, para lo cual escindiremos el ganglio linfático poplíteo y, en un segundo tiempo realizaremos el tratamiento quirúrgico del linfedema mediante la transferencia del ganglio linfático poplíteo contralateral con técnica microquirúrgica.

2

Hipótesis

Hipótesis

El modelo experimental en el conejo permite el desarrollo de linfedema y su tratamiento mediante las técnicas microquirúrgicas como la anastomosis linfáticoovenosa y el trasplante de colgajo libre de ganglio vascularizado, las cuales son efectivas en el tratamiento del linfedema.

3

Objetivos

3.1. Objetivo general.

Comparar la eficacia de la restauración de la vía linfática utilizando la técnica microquirúrgica de anastomosis linfáticoovenosa o el trasplante de colgajo libre de ganglio vascularizado en el tratamiento del linfedema, en un modelo animal.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Justificar el uso del conejo como un modelo animal adecuado para la formación y tratamiento experimental del linfedema.

3.2.2. Demostrar que el modelo experimental de linfedema en la oreja de conejo es reproducible y constante en el tiempo.

3.2.3. Determinar el efecto de las anastomosis linfáticoovenosa realizadas en el modelo experimental y su efecto sobre el linfedema.

3.2.4. Determinar la viabilidad del trasplante del colgajo libre de ganglio vascularizado en el modelo experimental y su efecto sobre el linfedema.

3.2.5. Analizar la efectividad de ambas técnicas en el modelo experimental de linfedema.

4

Justificación

Justificación

El linfedema es una condición patológica, producida por la obstrucción de los canales linfáticos. La dificultad del sistema linfático de drenar los líquidos extravasados en el intersticio de manera eficiente, ocasiona la acumulación de la linfa en el tejido intersticial, por lo que se produce el linfedema. El linfedema es una enfermedad discapacitante. Se han desarrollado y probado diferentes tipo de tratamiento del linfedema, sin embargo los resultados siguen siendo poco alentadores.

La prevalencia de linfedema secundario, debido a tratamiento de cáncer de mama, terapia de cáncer pélvico, infecciones recurrentes, lesiones o cirugía vascular, en el mundo es de aproximadamente 20 millones de personas; cuando se añade la insuficiencia venosa crónica como causa del linfedema las cifras se incrementan hasta los 300 millones de casos³⁶⁻³⁷.

El tratamiento actual del linfedema se enfoca en mejorar la calidad de vida, los síntomas y el dolor mediante el uso de prendas de compresión que tienen como finalidad controlar la progresión de la enfermedad; en muchos casos esta medidas no son suficiente.

El desarrollo de las técnicas microquirúrgicas abre una nueva perspectiva para el manejo de esta patología. Estudios experimentales en modelos animales contribuyen a comprender la patología del linfedema y desarrollar nuevas propuestas en el manejo quirúrgico.

5

Materiales y métodos

5.1. DISEÑO

Esta tesis la conforman dos trabajos, ambos constituyen un estudio de diseño experimental prospectivo.

5.1.1. DISEÑO DE LA PRIMERA PUBLICACION.

Metodología:

Se trata de un estudio experimental prospectivo. La ejecución se inició en el mes de octubre de 2014 y finalizó en octubre de 2015. Todos los procedimientos a los que fueron sometidos estuvieron evaluados y aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal y por la Comissió d'Experimentació Animal de la Generalitat de Catalunya (CEA). La autorización corresponde con el número de registro 6645.

Este estudio fue financiado por el Fondo de Investigaciones en Salud (FIS) del Ministerior de Saninad y Consumo de España, Instituto Carlos III. Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Proyecto numero PI1303793.

5.1.2. DISEÑO DE LA SEGUNDA PUBLICACION.

Metodología:

Se trata de un estudio experimental prospectivo. La ejecución se inició en el mes de octubre del 2015 y finalizó en octubre de 2017. Todos los procedimientos a los que fueron sometidos estuvieron evaluados y aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal y por la Comissió d'Experimentació Animal de la Generalitat de Catalunya (CEA). La autorización corresponde con el número de registro 6645.

Este estudio fue financiado por el Fondo de Investigaciones en Salud (FIS) del Ministerior de Saninad y Consumo de España, Instituto Carlos III. Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Proyecto numero PI1303793.

5.2. LUGAR DE REALIZACION DE LA TESIS:

El proyecto se realizó en el Servicio de Cirugía Plástica y Reparadora y el Institut Català de Ciències Cardiovasculars (ICCC), ambos ubicados en el Hospital de la Santa creu i Sant Pau de Barcelona.

5.3. POBLACION

Se utilizaron conejos machos de la raza Nueva Zelanda. con un peso entre 2,5-3kg (figura 1). Los animales se alojaron en el Servicio de Experimentación animal del L'Institut Català de Ciències Cardiovasculars (ICCC), en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Figura 1. Conejos de la raza Nueva Zelanda (NZW)



5.4. PROTOCOLO DE ESTUDIO

Ver la sección de metodología del primer artículo. Sin embargo, deseamos destacar la siguiente información.

Primer artículo:

ANASTOMOSIS LINFATICO VENOSA.

En los animales control se realizó la medición de la longitud de ambas orejas mediante el uso de una regla recta milimetrada, la cual se colocaba verticalmente al cráneo, se juntaban una oreja contra la otra hasta hacerlas quedar paralelas, estos valores fueron registrados. El espesor de cada oreja se midió en un punto medio de cada oreja ubicado a 7 cm. desde la punta de cada oreja; para ello se utilizó un pie de rey o vernier milimetrado (figura 2).

Figura 2. Mediciones de la oreja del Conejo.



a.- Ubicación de Punto Centra a 7 cms. de La punta de la oreja.



b.- Medicion del Espesor de la oreja con Pie de Rey o Vernier.

En el grupo 1 se indujo la formación de linfedema en la oreja mediante la técnica descrita por Huang¹⁵ modificada. Esta consistió en realizar una incisión en la piel respetando el pericondrio para evitar la desecación del cartílago y su necrosis. Los vasos linfáticos fueron identificados mediante tinción de Blue Patent V®. La tinción permitió identificar y asegurar la

destrucción total de las vías linfáticas en las zona intervenidada, a 1 cm de la base de la oreja. Culminado este procedimiento, se realizó la cura de la herida. Las mediciones se hicieron los días 0, 3, 7 y 15 del postoperatorio (figura 3).

Figura 3. Secuencia quirúrgica y creación de Linfedema en oreja de conejo.



a. Preparación Preoperartoria



b.- Marcación del área a resear.



c.- Marcación de Pedículo Vascular



d.- Linfedema al 7mo día Postoperatorio

El día 15 postoperatorio y posterior a la creación de linfedema se procedió a realizar anastomosis linfaticavenosa (figura 4), la cual se inició con la identificación del colector linfático principal, mediante la tinción del vaso linfático. Posteriormente se procedió a realizar la anastomosis linfaticovenosa usando el cabo distal del linfático y el cabo proximal de la vena. Como control se deja la oreja contralateral. Las mediciones se

realizaron los días 3, 7 y 15 postanastomosis (los días postintervención 18, 22 y 30 respectivamente) y se sacrificaron el día 15 postanastomosis (día 30 postintervención).

Figura 4. Anastomosis Linfático Venosa.



a.- Vista Macroscópica



b.- Vista Microscópica.

Segundo artículo:

TRANSFERENCIA GANGLIONAR.

Para identificar los canales linfáticos y el ganglio linfático poplíteo, se infiltraron 0,3 cc de Blue Patent V®. intradérmicamente en el segundo y tercer espacios interdigitales. La parte posterior de la extremidad trasera izquierda se rasuró. A nivel de la fosa poplíteo se realizó una incisión longitudinal a lo largo de la extremidad trasera. La capa de grasa debajo de la piel fue retirada para visualizar los vasos linfáticos (teñidos en azul), sobre el fascia muscular. Se localizó el ganglio poplíteo, que constituye un solo

ganglio linfático de 0.8 mm de diámetro. Distal a este ganglio linfático se observa dos vasos linfáticos principales corriendo paralelo a una vena central. Estos vasos alcanzan el ganglio linfático por el lado medial, envolviendo el ganglio en una red de microvasos (figura 5). Para extirpar el ganglio linfático se ligan y se cauterizan los vasos linfáticos proximales, al igual que la arteria medial (rama de la arteria poplítea) y la vena lateral que irrigan el ganglio. El tejido interno fue suturado con Vicryl 4/0 con puntos continuos y la piel fue suturada con seda 3/0 con puntadas simples invaginantes. El ganglio linfático extraído se conserva como control para estudios histológicos posteriores.

Figura 5. Vista macroscópica del ganglio linfático poplíteo y del canal linfático aferente.



Siguiendo este procedimiento, la inducción del linfedema se realizaba en la extremidad posterior izquierda, mientras que la extremidad posterior derecha del mismo animal era conservada como control (figura 6).

Figura 6. Transferencia ganglionar. Modelo animal.



Después de la cirugía de transferencia del ganglio linfático se cuantifica la reducción de volumen de la extremidad posterior izquierda (tratada). Las medidas se compararon con los valores obtenidos del control (extremidad posterior derecha), antes de extraer su ganglio linfático para la transferencia a la extremidad posterior izquierda.

Durante la primera parte del estudio el día 1 después de la cirugía, se midió con una cinta métrica, desde el tobillo a la rodilla, el perímetro de las extremidades posteriores a una distancia de 2 cm. Posteriormente se calculó el volumen total de la pierna utilizando la fórmula de cono truncado. Todas las medidas fueron hechas por el mismo investigador en todos los animales. La evolución del volumen de las extremidades posteriores operadas (izquierda) y control (derecha) se midió en los días 0, 3, 7, 10 y 15 después de retirar el ganglio linfático. Se realizaron mediciones iniciales y finales. Quince días después de la cirugía, los animales fueron anestesiados de

nuevo y se les inyectó intradérmicamente 0,3 ml de Blue Patent V®. en la parte distal de las extremidades posteriores. El ganglio linfático derecho era extirpado, como se explicó anteriormente, preservando la arteria y las venas lateral y medial. Se realizó una incisión en la extremidad posterior izquierda a nivel de la fosa poplítea; se extrajo el tejido fibrotico preservando la fascia muscular donde se realizó la transferencia del ganglio linfático derecho. Se realiza la anastomosis de la arteria y venas poplíteas. El día 1, 3, 7 y 15 después de esta cirugía se midió el perímetro de ambas extremidades traseras como se explicó anteriormente, se cuantificó el volumen de ambas extremidades (la reducción en volumen del linfedema en la pierna izquierda e inducción de linfedema en la pierna derecha). El día 30 del estudio los animales se sacrificaron, inmediatamente se disecó el ganglio linfático transferido junto con la grasa circundante la arteria, vena y vaso linfático, que se fijaron y prepararon para histología e inmunquímica. Se comparó la arquitectura del ganglio transferido con la anatomía del ganglio linfático homólogo, obtenido durante la primera cirugía.

5.5. ANALISIS ESTADISTICO

El número de animales a utilizar en el procedimiento fue calculado utilizando la fórmula basada en la valoración de las incidencias³⁸.

Para la primera publicación las variables continuas se expresan como media \pm SEM. Las diferencias entre los grosores de las orejas se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía, seguido de la comparación de Scheffe. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete de software estadístico StatView.

Para la segunda publicación la evolución del volumen de linfedema en los animales posterior a la transferencia ganglionar se realizó mediante el cálculo del volumen de las extremidades posteriores. Como está involucrado la adición de varios conos truncados, la medición del radio inferior (más cerca del tobillo) y los radios superiores (más cerca de la rodilla) se obtuvieron midiendo cada uno de forma independiente en segmentos de

2cm cada uno. La altura corresponde a la distancia entre cada medida. Se analizó la diferencia de volumen en ambos procedimientos (inducción y tratamiento del linfedema) en el mismo animal. Los volúmenes obtenidos en las extremidades posteriores derecha e izquierda se redujeron a tres niveles de medidas, repetidas por grupo: 1) Volumen basal (antes de linfedema); 2) Volumen día de transferencia (día 15 posterior de la inducción del linfedema en la extremidad posterior izquierda y el día 30 para el miembro posterior derecho), y el volumen final (día de culminación del estudio). Los valores fueron analizados por análisis bidireccional de la varianza (evolución del volumen y tratamiento grupal). El volumen (cc) se expresa como media \pm SD. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativo. El software utilizado para procesar los datos fue IBM-SPSS.

6

Resultados

6.1. RESULTADOS PRIMERA PUBLICACION

Los resultados se muestran en el apartado de resultados.

6.2. RESULTADOS SEGUNDA PUBLICACION

Los resultados se muestran en el apartado de resultados.

7

Publicaciones

7.1. PRIMERA PUBLICACION

Fernández Peñuela R, Pons Playa G, Casaní Arazo L, Masiá Ayala J. An Experimental Lymphedema Animal Model for Assessing the Results of Lymphovenous Anastomosis. *Lymphat Res Biol* 2018;16(3):234-39.

An Experimental Lymphedema Animal Model for Assessing the Results of Lymphovenous Anastomosis

Randolfo Fernández Peñuela, MD, MSc,¹ Gemma Pons Playa, MD, PhD,¹
Laura Casaní Arazo, DVM, PhD,² and Jaume Masiá Ayala, MD, PhD¹

Abstract

Background: The lymphatic system is the least studied of the body's systems, and as a result its contribution to human health and diseases is not well known. The failure of the lymphatic system to drain extravasated fluid efficiently leads to accumulation of lymph in the interstitial tissue, thus causing lymphedema. Despite developments in microsurgery procedures, the results of lymphedema treatment remain disappointing. The aim of this study was to develop an experimental animal model that is able to reproduce the disease and to apply various surgical and therapeutic approaches.

Methods and Results: Lymphedema was induced in New Zealand white rabbits by a total skin denudation and destruction of the lymph channels via microsurgery in the right ear, leaving the left ear as control. Lymphedema generation was observed between days 7 and 15 after intervention. On day 15, a terminal venous lymphatic anastomosis was performed on the posterior edge of the right ear. Serial measurements of ear thickness were made during the study. Ear thickness was significantly ($p < 0.05$) increased after lymphedema induction compared to baseline (3.2 ± 0.4 vs. 1.3 ± 0.04 mm). After anastomosis, ear thickness was reduced (2 ± 0.26 mm).

Conclusion: This animal model of lymphedema induction in the ear proved to be a reproducible alternative for studying new approaches to lymphedema treatment and for developing microsurgical skills.

Keywords: animal model, rabbit model, lymphatic research

Introduction

THE LYMPHATIC SYSTEM is undoubtedly the least studied of the body's systems, and as a result its contribution to human health and diseases is not well understood.¹ If the lymphatic system is unable to drain fluid extravasation efficiently, lymph accumulates in the interstitial tissue, thus leading to lymphedema.²

Lymphedema may be primary or secondary. The secondary form is much more common and is an acquired impairment of the lymphatic system, typically due to infection or trauma or as a complication of medical treatment, especially oncological surgery and radiation. It may also result from damage to lymphatic vessels due to chronic venous insufficiency.³ Different therapeutic approaches, medical and surgical, such as autologous transplant of lymph nodes, venous lymphatic anastomosis, and other,² have been developed for lymphedema management.

Despite recent advances in microsurgery procedures for treatment of lymphedema, the results remain disappointing.⁴

Reliable reproducible experimental animal models are needed to replicate the pathophysiology of the condition and thus to allow performance of surgical procedures and therapeutic approaches.

Numerous experimental animal models have been described for recreating chronic lymphedema, but the costs are high and the results are inconsistent.⁵

The development of experimental models began with Halsted, a pioneer in the use of radical mastectomy as a treatment for breast cancer.

In 1936, working in a series of dogs, Halsted and Reichert divided all the tissues in the mid thigh, with the exception of the femur, the femoral artery and vein, and the sciatic nerve. Normal healing was allowed to ensue. During the first days postsurgery, edema was observed but did not progress toward lymphedema.⁶

Drinker and others attempted to reproduce a model by injecting sclerosing substances in the hind leg of dogs, with inconsistent results.

In 1977, Olszewski⁷ reported a very encouraging experimental model of lymphedema using the thigh of a dog and

¹Department of Plastic Surgery, Hospital Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

²Catalan Institute of Cardiovascular Sciences, Hospital Santa Creu i Sant Pau, Pavilion of the Convent, Barcelona, Spain.

concluded that the single section of the lymph channels did not suffice for the formation of lymphedema. He noted that lymph stagnation and chronic, resistant lymphedema could be obtained if, in addition to transection of lymphatics, a circular strip of skin, subcutaneous tissue, fascia, and periosteum were removed from the thigh, leaving a gap for the secondary healing by granulation.^{7,8} However, this model was very expensive and time-consuming and required very precise surgery.

In an experimental model, Clodius in 1976⁹ proposed the excision of soft tissue around the dog leg, except for bridges of anterior and posterior skin along the major vessels and nerves. The resulting fibrosis caused lymphedema for about five months.¹⁰

In guinea pigs' ears, Yoon et al.¹¹ demonstrated that the resection of 2 mm lymphatic trunks does not cause regeneration. However, the most successful method for producing lymphedema and preventing lymphatic regeneration was the resection of 2 cm length of the lymphatic channels. A major conclusion of these studies was that the regeneration of lymph vessels can occur if the defect in the lymphatic channels is small, below 2 mm.

In an attempt to create a simple, reproducible, and lasting chronic lymphedema model, an experimental model in the rabbit ear was proposed.¹²⁻¹⁶ Eloesser¹⁷ was the first to use the rabbit ear to study edema and lymphatic blockage. In this procedure, a simple incision was made in the back of the ear that caused lymphatic obstruction; however, it was not enough to produce lymphedema.¹⁵

This model presents numerous advantages. For example, it is a fairly homogeneous area of tissue, and drainage is performed through a central venous trunk, which can be accessed by surgery.¹⁸ Another advantage of the rabbit ear model for lymphedema is that it is accurate and easily reproducible and allows sampling for pathophysiological and microscopic studies.¹⁸

Using New Zealand white rabbits, Piller and Clodius^{9,18} marked the lymph collector vessels with patent blue and removed a 4 cm strip of the skin, subcutaneous tissue, and perichondrium. A band of perichondrium was preserved to cover vessels from drying and wounds were covered with gauze.

With Japanese white rabbits, Huang and Hsin¹⁵ operated on one ear and preserved the other as control. The technique consisted of the removal of a circumferential band of 1 cm of skin, subcutaneous tissue, and perichondrium to 2 cm from the base of the ear; the neurovascular pedicle was protected and the cartilage was preserved. For visualization of the lymphatic channels, 0.5% methylene blue was injected intradermally into the tip of the ear. This injection allowed visualization of the largest lymphatic channels, about five or seven. Measurements and observations were made on days 3, 7, 15, and 30 postoperatively. Lymphatic dilatation occurred between days 5 and 20 after surgery, while the process of fibrosis began on postoperative day 30.¹⁵

Yoon et al.¹¹ modified Huang's¹⁵ model by cleaving a 3 cm wide band of skin, subcutaneous tissue, and perichondrium circumferentially from the base of the ear (1 cm), except for the central part of the skin on the back of the ear, leaving a "skin bridge" that was protected under the main neurovascular pedicle. The edges of the skin were sutured inversely to the perichondrium to avoid the approximation of the borders of skin and the rechanneling of lymphatic vessels. This technique resulted in stable lymphedema within 2 months

and was effective in rabbits above the age of four years, but younger rabbits do not develop lymphedema.¹⁹

We described an experimental model of secondary lymphedema with young rabbits (12-15 weeks, easily achievable) that develop consistent lymphedema within 2 weeks.

Materials and Methods

In the present study, seven male New Zealand White rabbits weighing 2.5-3 kg were used. The animals were housed in the Animal Research Unit of the Catalan Institute of Cardiovascular Sciences (ICCV) at the Hospital de Sant Pau, Barcelona. The experimental procedures were evaluated and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEEI-ICCV) and the Animal Experimentation Commission of the Government of Catalonia (registration number 6645).

Before starting the procedure, the length and thickness of the rabbits' ears were measured. The length of the ear was measured with a ruler placed perpendicular to the skull, placing the ears against each other in parallel. The exact thickness of each ear was measured using a Vernier caliper at 7 cm from the ear tip.

For the induction of lymphedema, the animals were anesthetized with ketamine (1 mg/kg) and medetomidine (1 mg/kg). All animals received a dose of prophylactic antibiotic (Ceftiofur[®]) 0.1 mg/kg. Analgesia was controlled with a dose of Metacam (1 mg/kg, i.m.) and local bupivacaine 0.75% s.c. at the base of the ear. At the end of surgery, a single dose of buprenorphine (0.01 mg/kg) was administered to prevent postoperative pain. Animals were controlled daily to detect suffering or pain using a specific pain score.

Two animals (four ears) were used to standardize the technique in a pilot study. We performed a modification of the Huang's¹⁵ technique. The ear was shaved and the external skin was incised all around the ear creating a wound of 1 cm wide at a distance of 2 cm from the base of the ear. Then, the skin was excised making a thorough destruction of lymph channels and blood vessels and preserving the perichondrium to avoid drying of cartilage. Some vessels were destroyed with the scalpel or thermal cautery electrode, while wider vessels needed to be sutured. The external edges of the wound were fixed with 3/0 silk invagination sutures to induce natural healing by second intention (granulation). This technique was performed under microscopy after staining the lymph vessels with Blue Patent V[®] infiltrated into the subdermal distal portion of the ear.

Animals were left to recover from the anesthesia in their pens. The ears were healed with SSF, iodine, and antibacterial cream and the rabbits wore a recovery collar to prevent them from scratching the ear.

Because measurement of the ear volume to estimate the lymphedema would require anesthetizing the rabbits and could result in a worse welfare condition, it was decided to evaluate lymphedema progression by measuring ear thickness on days 3, 7, and 15 after surgery in awake animals. To standardize the procedure, we observed that thickness increased at these time points and reached a plateau between days 15 and 20 after induction. The animals showed the characteristic clinical presentation of edema in the ear without pain.⁴

Animals in the pilot study were observed and ears measured over 30 days after lymphedema induction. There was

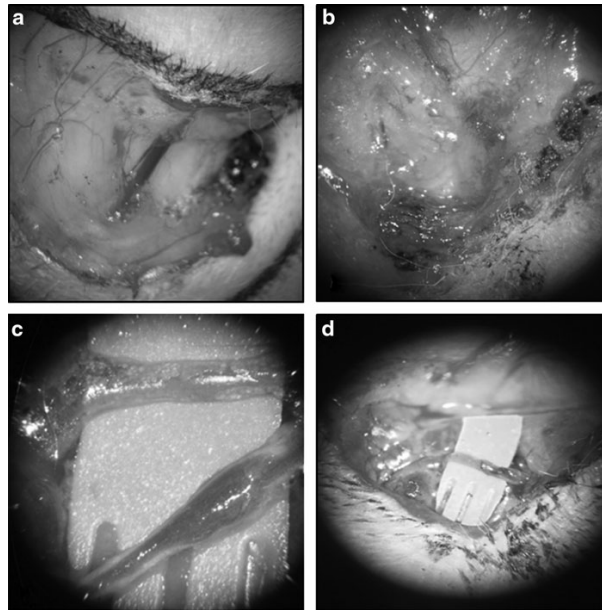


FIG. 1. Surgical sequence in the formation of lymphedema. (a) Lymphatic vessel stained with Blue Patent V. (b) Selective destruction of material by electrocoagulation. (c) Lymphatic vessel dilated with adjacent vein on day 15 after the induction of lymphedema. (d) Lymphatic venous terminal anastomosis, the dye is flowing toward the vein.

no significant reduction in the ear thickness (data not shown) with respect to day 15, and there was an increase in tissue fibrosis under skin, which ruled out experimental anastomosis surgery. The veins and lymph vessels were completely immersed in the fibrotic tissue. These observations determined that day 15 after generation of lymphedema was the best moment to perform the surgery.

The remaining rabbits ($n=5$) were anesthetized following the protocol and surgery was performed in the right ear to induce lymphedema. The left ear rested as own control in each animal.

After 15 days, the main lymphatic collector was identified by staining the lymph vessels with Blue Patent V; an end-to-end lymphovenous anastomosis (LVA) was then performed (Fig. 1) at the trailing edge of the ear and 2 cm from the circumferential scar at the base of the ear. The LVA was performed using the distal end of the main lymphatic vessel (0.5 mm) and the proximal end of the vein (1.0 mm) with 11/0 nylon. The LVA could not be performed in one rabbit due to complications in the recovery and excess of fibrosis.

Measurements were performed on days 3, 7, and 15 after LVA, and animals were euthanized on day 20 postanastomosis (day 35 postintervention).

Samples of tissue (control and treated ears) were obtained at the end of the study. After preserving the tissue with formalin, 6 mm paraffin-embedded serial cuts were performed for con-

ventional staining (hematoxylin/eosin), immunochemistry for detection of lymph vessel wall (anti-LYVE1 antibody; Abcam) (Fig. 2), and histological visualization of interstitial collagen fibers (Picrosirius Red Stain). Images were captured at $\times 400$ magnification with a Nikon eclipse 80i microscope and digitalized by a Retiga-1300i. Staining was calculated by a single blinded observer from an average of six-fields/sample as content (% positive stained area) using ImageJ[®].

To evaluate the immunological response to the lymphedema, immunohistochemistry 6 μ m dewaxed serial sections were incubated with the anti-macrophage mouse monoclonal (ab22506; Abcam) primary antibody according to the ABC method. Target retrieval was necessary. We used 3% hydrogen peroxide to inactivate endogenous peroxidase followed by normal horse serum to reduce nonspecific staining. The sections were incubated for 2 hours. Sections were then incubated with an appropriate biotinylated secondary antibody (1:200; Vector). The chromogen used was 3,3'-diaminobenzidine. Sections were counterstained with hematoxylin.

Statistical analyses

The number of animals to be included in the procedure was calculated using the formula based on serial incidents.²⁰

Continuous variables are expressed as mean \pm SEM. The differences between ear thicknesses were evaluated using a

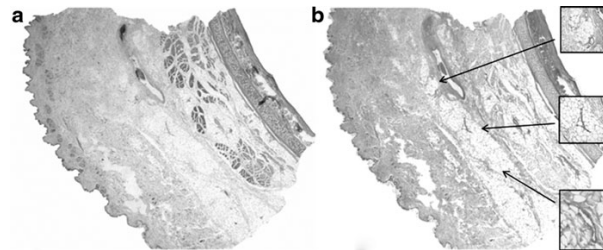


FIG. 2. Healthy ear of a rabbit. Histological cross section from skin to inner side. The same cut is stained with (a) hematoxylin/eosin to show the morphology of the ear and (b) anti-LYVE antibody, staining in brown the endothelium of lymphatic vessels. Framed are detailed vessels of the deep dermis.

one-way analysis of variance, followed by Scheffe's comparison. A value of $p < 0.05$ was considered significant. All statistical analyses were performed with the statistical software package StatView.

Results

No differences were observed at baseline between left (control) and right (treated) ear either in thickness (1.35 ± 0.01 vs. 1.34 ± 0.04 mm) or in total length (12.56 ± 0.1 cm).

After induction of lymphedema, the right ear was significantly thicker ($p < 0.05$) than at baseline. The maximum increase was recorded on day 7 after lymphedema induction (3.2 ± 0.4 mm). The edema then stabilized and day 15 was selected for LVA surgery (Fig. 3). The thickness of the left ear (control) became stable throughout the study (1.41 ± 0.08 mm).

After LVA surgery, the ear thickness progressively decreased; the difference reached significance ($p < 0.05$) at day 15 after surgery (Fig. 3).

The analysis of collagen fibrils by Sirius red staining revealed a dermis with horizontally arranged collagen fibers (Fig. 4). Calculation of the % of positive stained area showed similar results in the different cuts quantified ($8.87\% \pm 1.24\%$) of the animals at the end of the study.

The analysis of histological samples stained to detect inflammation revealed that there were no macrophages in the sample studies (images not shown).

Discussion

This new approach to the generation of lymphedema in rabbits' ears consistently achieved edema formation within a few days. Tissue samples obtained at the end of the study showed fibrosis, poor inflammation, and low infiltration of immune cells. The clinical and histopathological results suggested that the rabbits developed a lymphedema similar to that in humans.

The evolution of lymphedema is faster in rabbits than in humans. By three weeks after induction, the edema is progressively reduced, but the increase in ear thickness is maintained. This is because the condition becomes chronic earlier in young animals than in human adults due to the

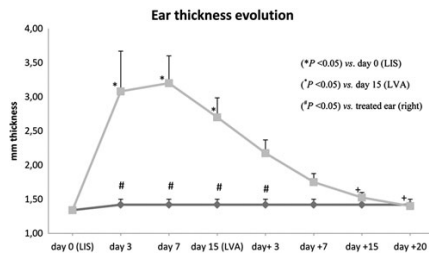


FIG. 3. Ear thickness evolution shows the values of right rabbit ear thickness (gray squares) after surgery for the creation of lymphedema (LIS) and after lymphovenous anastomosis (LVA). The significant increase ($*p < 0.05$) in thickness is evident in the early days. LVA was performed on day 15. Ear thickness decreased progressively, reaching significance ($*p < 0.05$) on day 15 after the LVA and recovering baseline measures. Measures made in the left control ear (gray diamonds) are also shown ($*p < 0.05$) compared with injured/treated ear.

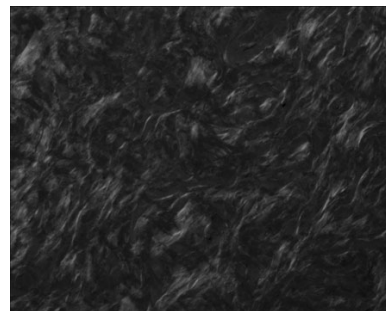


FIG. 4. Picrosirius Red stain in sample connective tissue around LVA. Histological visualization of collagen I and III in parallel pattern.

Downloaded by Universitat de Barcelona CRAI from www.liebertpub.com at 01/11/19. For personal use only.

rabbit's ability to heal²¹; the accumulation of interstitial and lymphatic fluid inside the skin and subcutaneous tissue stimulates fibroblasts, keratinocytes, and adipocytes leading to the deposition of collagen and glycosaminoglycans inside the skin and subcutaneous tissue, together with skin hypertrophy and the destruction of elastic fibers¹² as seen in the horizontally arranged collagen fibers. In this rabbit model and due to the rapid ability of rabbits to heal, we cannot observe macrophages, what could suggest a process of healing of the induced lymphedema.

A major problem in experimental lymphatic surgery is that no ideal animal model is available. It is difficult to compare results from different animal models with regard to the degree and permanence of the induced lymphedema, because no standardized parameters have been established to date.² The experimental data show that the structural changes observed in lymphedema patients, such as fibrosis, infiltration of immune cells, and adipose tissue deposits, should be clearly reproduced in the research environment.^{20,22}

Attempts to reproduce lymphedema in the experimental setting and to reconstruct the lymphatic system have been underway since the 1960s and 1970s.^{2,16} LVA has been performed by several authors, especially using large animals, but the results have been inconsistent. Both end-to-end and side-to-side LVAs have been performed and experiments involving the use of growth factors (VEGF-C) in association with LVA have been carried out to accelerate the recovery of the lymphatic function.¹¹ Complications after LVA are reported in up to 38%,²³ although all the animals in our study responded positively to anastomosis.

Rabbit models are widely used in experimental studies, due to the size of the animals and the fact that their general anatomy is well known.^{24,25} However, the anatomy of their lymphatic system has not been thoroughly elucidated.²⁶ In the rabbit, the lymph channels are part of the circulatory system, but they are largely independent of the blood vessels; the nodes and conduits are usually considered to be a separate system.²⁷

Lymphedema studies have focused on the base of the rabbit's tongue and on the animal's upper limbs, although in fact in the upper limbs, there is no evidence of a significant reduction in the condition.^{28,29}

In our model, we performed individual and total destruction of the vessels in the external side of the ear to induce lymphedema, and removed skin and subcutaneous tissue without manipulating the cartilage. We thus achieved consistent lymphedema. Histopathology of control animals showed that lymph vessels are located in the external side of the ear, above the muscle layer and far from the cartilage. No deeper injury in the muscles or in the cartilage was needed to be performed, thus allowing animals to recover easily from surgery and avoiding malformation or twisted ear.

The lymph vessels were still dilated on day 20 after LVA surgery. The total destruction of lymph vessels during lymphedema induction inhibited lymph drainage, but the lymph endothelium continued to carry out its function and the accumulation of lymph in the vessels without drainage caused the vessels to dilate. In this experimental study, the animals were maintained no more than 20 days after LVA so we cannot hypothesize whether the dilated lymph vessels return to their baseline size and flow pressure.

The development of this model in the ears of rabbits, animals with a constant lymphatic anatomy that accompanies

the principal veins, is likely to be of great benefit for training professionals in microsurgical techniques and may open up new lines of research.

Conclusion

The experimental rabbit lymphedema model described in this study is reproducible and permanent. The model is ideal for surgeons wishing to expand their microsurgical skills to treat lymphedema. The new techniques and surgical skills may improve lymphedema management and would help to optimize patient outcomes.

Acknowledgments

This study was funded by Fondo de Investigación (FIS) en salud del Ministerio de Sanidad y Consumo de España, Instituto Carlos III, Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Proyecto Numero PI1302793.

We thank Ignasi Gich, PhD, for his statistical and methodological assistance and Dr. J. Oriol Juan-Babot for performing histopathological sections.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Mortimer PS, Rockson SG. New developments in clinical aspects of lymphatic disease. *J Clin Invest* 2014; 124:915–921.
2. Frueh FS, Gousopoulos E, Rezaeian F, Menger MD, Lindenblatt N, Giovanoli P. Animal models in surgical lymphedema research—A systematic review. *J Surg Res* 2016; 200:208–220.
3. Vojáčková N, Fialová J, Hercogová J. Management of lymphedema. *Dermatol Ther* 2012; 25:352–357.
4. Mehrara BJ, Zampell JC, Suami H, et al. Surgical management of lymphedema: Past, present, and future. *Lymphat Res Biol* 2011; 9:159–167.
5. Lee-Donaldson L, Witte MH, Bernas M, Witte CL, Way D, Stea B. Refinement of a rodent model of peripheral lymphedema. *Lymphology* 1999; 32:111–117.
6. Reichert FL, Mathes ME. Experimental lymphedema of intestinal tract and its relation to regional cicatrizing enteritis. *Ann Surg* 1936; 104:601–616.
7. Olszewski W. Pathophysiological and clinical observation of obstructive lymphedema of the limbs. In: Clodius, ed. *Lymphedema*. Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag; 1977:79–102.
8. Shin WS, Szuba A, Rockson SG. Animal models for the study of lymphatic insufficiency. *Lymphat Res Biol* 2003; 1:159–169.
9. Clodius L. Experimental lymphedema and therapeutic concepts. *Acta Chir Plast* 1976; 18:113–116.
10. O'Brien BM, Sykes P, Threlfall GN, Browning FS. Microlymphaticovenous anastomoses for obstructive lymphedema. *Plast Reconstr Surg* 1977; 60:197–211.
11. Yoon YS, Muraya T, Gravereaux E, Tkebuchava T, Silver M, Curry C, Wecker A, Kirchmair R, Hu CS, Kearney M, Ashare A, Jackson DG, Kubo H, Isner JM, Losordo DW. VEGF-C gene therapy augments postnatal lymphangiogenesis and ameliorates secondary lymphedema. *J Clin Invest* 2003; 111:717–725.

12. Szuba A, Skobe M, Karkkainen MJ, Shin WS, Beynet DP, Rockson NB, Dakhil N, Spilman S, Goris ML, Strauss HW, Quertermous T, Alitalo K, Rockson SG. Therapeutic lymphangiogenesis with human recombinant VEGF-C. *FASEB J* 2002; 16:1985–1987.
13. Fu K, Izquierdo R, Vandevender D, Warpeha RL, Fareed J. Transplantation of lymph node fragments in a rabbit ear lymphedema model: A new method for restoring the lymphatic pathway. *Plast Reconstr Surg* 1998; 101:134–141.
14. Dominici C, De Leo S, Covarelli P, Cordellini P, Scerini D, Glosti D. Experimental model of lymphedema. *Vasc Surg* 1990; 24:30–33.
15. Huang GK, Hsin YP. An experimental model for lymphedema in rabbit ear. *Microsurgery* 1983; 4:236–242.
16. Casley-Smith JR, Clodius L, Piller NB, et al. A model of lymphoedema in the rabbit's ear the effects of the benzopyrones. *Chir Plast* 1977; 4:5.
17. Eloesser L. Obstruction to the lymph channels by scar. *JAMA* 1923; 81:867–1870.
18. Piller NB, Clodius L. Lymphoedema of the rabbit- ear following partial and complete lymphatic blockade; its effects on fibrotic development, enzymatic types and their activity levels. *Br J Exp Path* 1978; 59:319–326.
19. Hadamitzky C, Pabst R. Acquired lymphedema: An urgent need for adequate animal models. *Cancer Res* 2008; 68: 343–345.
20. Rojo-Amigo A. Sample size calculation in animal testing procedures. Rating incidents. *Lab Anim* 2014; 62:31–33.
21. Marttala J, Andrews JP, Rosenbloom J, Uitto J. Keloids: Animal models and pathologic equivalents to study tissue fibrosis. *Matrix Biol* 2016; 51:47–54.
22. Rutkowski JM, Moya M, Johannes J, Goldman J, Swartz M. Secondary lymphedema in the mouse tail: Lymphatic hyperplasia, VEGF-C upregulation, and the protective role of MMP-9. *Microvasc Res* 2006; 72:161–171.
23. Vignes S, Blanchard M, Yannoutsos A, et al. Complications of autologous lymph-node transplantation for limb lymphoedema. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2013; 45:516–520.
24. Cruz Y, Hudson R, Pacheco P, Lucio R, Martinez-Gomez M. Anatomical and physiological characteristics of perineal muscles in the female rabbit. *Physiol Behav* 2002; 75:33–40.
25. Rab M, Neumayer CH, Koller R, Kamolz LP, Haslik W, Gassner R, Giovanoli P, Schaden G, Frey M. Histomorphology of rabbit thigh muscles: Establishment of standard control values. *J Anat* 2000; 196:203–209.
26. Soto-Miranda MA, Suami H, Chang DW. Mapping superficial lymphatic territories in the rabbit. *Anat Rec* 2013; 296:965–970.
27. McLaughlin CA. The muscular system. In: *Laboratory Anatomy of the Rabbit*. Dubuque, IA: WM. C. Brown Company Publishers; 1970:33–57.
28. Cheng MH, Huang JJ, Nguyen DH, Saint-Cyr M, Zen MR, Tan BK, Lee CL. A novel approach to the treatment of lower extremity lymphedema by transferring a vascularized submental lymph node flap to the ankle. *Zhonghua Gynecol Oncol* 2012; 126:93–98.
29. Liu XC, Yang WJ, Zhang CP, Qu XZ, Wang Y, Qui LH, Ji P. An exploration of the surgical modality of sentinel lymph node biopsy in patients with cNO tongue carcinoma: An animal study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; 112:439–445.

Address correspondence to:
 Jaume Masiá Ayala, MD, PhD
 Department of Plastic Surgery
 Hospital Santa Creu i Sant Pau
 Universitat Autònoma de Barcelona
 San Antoni M. Claret 167
 Barcelona 08025
 Spain

E-mail: jmasia@santpau.cat

7.2. SEGUNDA PUBLICACION

Fernández Peñuela R, Casaní Arazo L, Masiá Ayala J. Outcomes in vascularized lymph node transplantation in rabbits: A reliable model for improving the surgical approach to lymphedema. *Lymphat Res Biol.* 2019;00(00):0-0.

Outcomes in Vascularized Lymph Node Transplantation in Rabbits: A Reliable Model for Improving the Surgical Approach to Lymphedema

Randolfo Fernández Peñuela, MD, MSc,¹ Laura Casaní Arazo, DVM, PhD,² and Jaume Masiá Ayala, MD, PhD¹

Abstract

Background: Conservative nonsurgical treatment has traditionally been applied to lymphedema. Early surgical procedures were invasive and disfiguring and their long-term success was often limited. In contrast, contemporary surgical techniques are much less invasive and have been shown to be effective in reducing excess limb volume, the risk of cellulitis, and the need for compression garments. Microsurgical procedures such as lymphovenous anastomosis and vascularized lymph node transfer can treat the excess fluid component of lymphedema and are gaining in popularity. In this study, we first evaluate the possibility of generating lymphedema in the hind limb of a rabbit and then describe its treatment with microsurgical lymph node transfer without lymph vessel transfer.

Methods and Results: In experimental rabbit models, animals first underwent surgery in which the popliteal lymph node was removed to create lymphedema in the hind limb. After 15 days, another operation was performed to excise the contralateral popliteal lymph node and transfer it to the limb with lymphedema. Our model showed that lymph node transfer was able to reduce lymphedema in the rabbit's hind limb; intervened hind limb: basal volume (51.94 ± 11.23), volume day transfer (73.40 ± 26.47), and final volume (50.13 ± 12).

Conclusion: We have developed a feasible model to microsurgically induce and treat lymphedema by lymph node transfer that shows promising results.

Keywords: lymph node, lymphedema, animal model

Introduction

LYMPHEDEMA IS A chronic disease characterized by massive lymphatic fluid stasis, inflammation, and fibroadipose deposition. It commonly affects people after lymphatic injury during the course of cancer treatment. In these individuals, progressive adipose deposition and tissue fibrosis result in increasing limb volume, heaviness, functional difficulties, increased susceptibility to infections, and rare but deadly secondary tumors.¹ Several clinical findings suggest that the pathology of lymphedema is a multistep sequence in which lymphatic injury is the initiator of these events. This hypothesis is supported by the fact that lymphedema develops only in a subset of patients who undergo

lymphadenectomy rather than uniformly in all patients who suffer lymphatic injury.² In addition, some patients develop lymphedema even after apparent trivial injury to the lymphatic system, suggesting that even minor disturbances in lymphatic function can initiate the pathological sequence.³ Finally, in most patients, lymphedema develops slowly, usually months to years after the initial surgical injury, suggesting that intervening secondary events are necessary for development of this pathological process.⁴

The treatment of lymphedema has traditionally been conservative and nonsurgical. However, surgical options for the condition have been reported for over a century; early surgical procedures were invasive and disfiguring and their long-term success was often limited. In contrast, contemporary

¹Department of Plastic Surgery, Santa Creu i Sant Pau Hospital. (Universitat Autònoma de Barcelona), Barcelona, Spain.

²Catalan Institute of Cardiovascular Sciences, Santa Creu i Sant Pau Hospital, Barcelona, Spain.

surgical techniques are much less invasive and have been shown to be effective in reducing excess limb volume, the risk of cellulitis, the need for compression garment use, and subsequent treatment. Microsurgical procedures such as lymphovenous anastomosis, vascularized lymph node transfer, and lymphatic-lymphatic bypass can treat the excess fluid component of lymphedema swelling that presents as pitting edema. Today, these surgical techniques are becoming increasingly popular.

The most recent advance in surgical lymphedema treatment is vascularized lymph node transfer. Healthy lymph nodes, an artery, and a vein are transplanted from the axilla, groin, or submental region to the affected area.⁵⁻⁹ One hypothesis is that the transferred lymph nodes act as a pump and suction pathway for lymphatic clearance.⁷

Research into prevention and treatment of lymphedema requires animal models to determine the pathophysiology of the disease process and to identify the ideal timing and specific interventions for these patients.¹⁰ Obviously, generating chronic and consistent lymphedema in experimental animals is highly problematic. Historically, efforts to replicate human untreated lymphedema in animals through surgery, radiation, and toxicology have been fraught with difficulties. The main obstacles to creation of satisfactory animal models include an inability to reproduce chronic disease in a format that is reproducible and stable over time.¹⁰ Murine models have been created to evaluate the results of lymph node transfer, including clinical outcome and histology and immunohistochemistry.¹¹⁻¹³ In a sheep model, vascularized lymph node transplants were found to achieve greater lymphatic transfer than avascular lymph node transplants.¹⁴ For this reason, we have created an experimental rabbit model,¹⁵ which is able to induce lymphedema similar to that in humans and lasts long enough to allow treatment with a variety of techniques.

The rabbit's body size permits the transfer of peripheral vascularized lymph nodes. In smaller mammals, this can only be performed with the mesenteric lymph node, which makes both the surgical approach and animal recovery difficult. The lymphatic anatomies of the hind limb and the blood supply of the rabbit popliteal node are well documented, and furthermore, the popliteal node is easily identified and can be explored with a minor procedure.¹⁶

According to Suami et al., the lymphatic system of a rabbit has three or four lymphatic vessels in the paw with no clear separation between superficial and deep lymphatic vessels. This contrasts with lymphatic vessels in paws of dogs and in human feet, which are separated by deep fascia.^{17,18} However, it has been established that lymph from the lower limb is drained by two lymphatic systems: first, the superficial system comprising two sets of vessels, one of which drains the medial skin toward the inguinal nodes in the groin and the other drains the lateral skin to the popliteal node; and second, the deep lymphatic system, which drains the deep tissues of the foot and lower limb to the popliteal node.¹⁹

In this study, we first evaluated the possibility of generating lymphedema in the hind limb of a rabbit, and then treated it with a microsurgical lymph node transfer without lymph vessel transfer. The rabbits first underwent surgery, in which the popliteal lymph node was removed to create lymphedema in the hind limb. After 15 days, another intervention was performed to excise the contralateral popliteal lymph node and transfer it to the limb with the developed lymphedema.

Materials and Methods

In the present study, eight male New Zealand White rabbits weighing 2.5–3 kg were used. The animals were housed at the Animal Experimentation Unit of the Research Institute at Santa Creu i Sant Pau Hospital (Barcelona).

All procedures performed were evaluated and approved by the Internal Animal Care and Use Committee and authorized by the external board of experts of the local government (Comissió d'Experimentació Animal—Generalitat de Catalunya), with the registration number: 6645.

For induction of lymphedema, the animals were anesthetized with ketamine (1 mg/kg) and medetomidine (0.5 mg/kg). All animals received a dose of prophylactic antibiotic (cefotiofur 0.1 mg/kg). Analgesia was controlled with a prior dose of meloxicam (1 mg/kg, i.m.) and local bupivacaine (0.75% s.c.) at the site of the incision. At the end of surgery, a single dose of buprenorphine (0.01 mg/kg) was administered to prevent postoperative pain. Animals were controlled daily to detect suffering or pain using a specific pain score.

To identify lymph channels and the popliteal lymph node, 0.3 cubic centimeters (cc) of patent blue V was infiltrated intradermally in the second and third interdigital spaces.

The back of the left hind limb was shaved and a 2-cm incision longitudinal to the long axis of the hind limb was made over the popliteal fossa. The fat layer under skin was removed to visualize lymph vessels (stained in blue), over the muscular fascia, and to find a single lymph node ~0.8 mm in diameter in the fossa.

Distal to this lymph node are two principal lymph vessels running parallel to a central vein. These vessels reach the lymph node by the medial side, wrapping the node in a net of microvessels (Fig. 1).

To remove the lymph node, the medial artery (branch of the popliteal artery) and the lateral vein irrigating the node were ligated and proximal lymphatic vessels were cauterized. The internal tissue was sutured with 4/0 Vicryl® with continuous stitches and the skin was sutured with 3/0 silk with single invaginant stitches. The discarded lymph node was preserved as a control for further histological studies.



FIG. 1. Macroscopic view of popliteal lymph node and afferent lymphatic channel. Color images available online at www.liebertpub.com/lrb

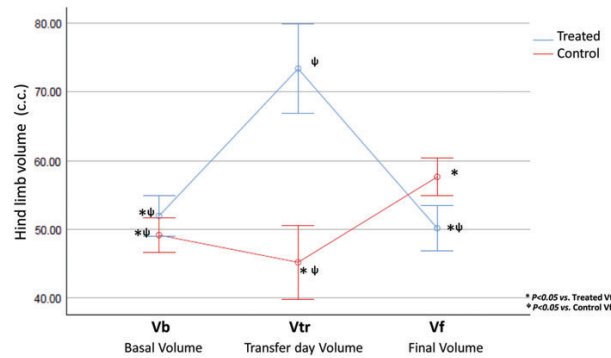


FIG. 2. Hind volume evolution, after performing the volume calculations for a truncated cone, values were obtained in cc with their SD. Intervened hind limb: Vb (51.94 ± 11.23), VTr (73.40 ± 26.47), and Vf (50.13 ± 12) in relation to the control Vb (49.12 ± 4.67), volume day intervention (45 ± 4.74), and Vf (57.63 ± 5.35). $p < 0.05$. cc, cubic centimeters; SD, standard deviation; Vb, basal volume; Vf, final volume; VTr, volume day transfer. Color images available online at www.liebertpub.com/lrb

Following this procedure, each animal was its own control (right hind limb) for induction of lymphedema in the left hind limb (treated). After the lymph node transfer surgery and to compare volume reduction of the left hind limb (treated), the measures were compared with former values obtained in the control (right) hind limb, before removing the lymph node, during the first part of the study.

The day after the surgery, perimeters of the hind limbs of the rabbit were measured with a measuring tape from the ankle to the knee and every 2 cm to calculate the total volume of the leg using the truncated cone formula. All the measures were made by the same researcher in all animals. The volume evolution of the operated (left) and healthy (right) hind limbs was measured on days 0, 3, 7, 10, and 15 after removing the lymph node. Initial and final measurements were performed under anesthesia.

Fifty days after the surgery, the animals were anesthetized again and 0.3 mL of patent blue V was injected intradermally in the distal paw of each limb. The right lymph node was excised, as explained above, but the lateral vein and medial artery were preserved. An incision in the left hind limb was made in the popliteal fossa; the fibrotic tissue was removed, preserving the muscular fascia where the right lymph node was transferred. The node was transferred to the left hind limb with an anastomosis of the vein and artery.

The day after this surgery, the perimeter of both hind limbs was measured as explained above to evaluate reduction in volume of the lymphedema in the left leg and induction of lymphedema in the right leg.

Animals were humanely euthanized on day 30 of the study. The transferred lymph nodes were quickly harvested within the surrounding fat and, with their artery, vein, and lymph vessels, fixed and prepared for histology and immunohistochemistry evaluations.

The architecture of the transferred nodes was evaluated with hematoxylin–eosin and compared with the anatomy of the lymph nodes discarded after the first surgery.

Statistical analysis

The number of animals to be used in the procedure was calculated using the formula based on serial incidents.²⁰

The evolution of the lymphedema volume was performed by calculating the volume of the hind limbs. As this involved the addition of various truncated cones, the lower and upper radii were obtained by measuring each lower (closer to the ankle) and upper (closer to the knee) perimeter of the leg, and the height was the distance between measurements (2 cm).

To analyze differences in volume in both procedures (induction and treatment of lymphedema) in the same animal, the volumes obtained in the right and left hind limbs were reduced to three levels of repeated measures by group (induction and treatment): baseline (before lymphedema induction in the right and left hind limbs), lymph node transfer surgery, and end of the study. Values were analyzed by two-way analysis of variance (volume evolution and group treatment). Volume (in cc) is expressed as mean + SD. p -Values < 0.05 were considered statistically significant.

The software used to process the data was IBM-SPSS (v25.0).

TABLE 1. HIND LIMB VOLUME EVOLUTION

	Group	Mean	SE	$p < 0.05$
Vb	Treated	51.94	3.01	*
	Control	49.13	2.52	*ψ
VTr	Treated	73.40	6.48	
	Control	43.15	5.42	*ψ
Vf	Treated	50.13	3.27	*ψ
	Control	57.63	2.74	*

* $p < 0.05$ vs. VTr of treated hind limb.

ψ $p < 0.05$ vs. Vf of control hind limb.

SE, standard error; Vb, basal volume; Vf, final volume; VTr, volume day transfer.

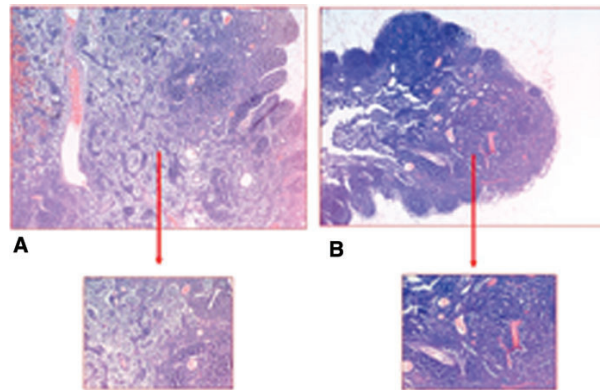


FIG. 3. Histological rabbit popliteal lymph node. **(a)** HE (4×0) shows the normal relationship between cortex and medullar morphology in control lymph node. Framed details of medullar anatomy (HE 10×0). **(b)** HE (4×0) shows the relationship between cortex and medullar morphology after 15 days of transplant. Framed details of medullar anatomy (HE 10×0) show more density of tissue and new blood vessels (HE 10×0). HE, hematoxylin–eosin. Color images available online at www.liebertpub.com/lrb

Results

Hind limb volume

The serial measurements obtained during the study showed a statistical increase ($p < 0.05$) of volume in the hind limb treated from baseline (51.94 ± 3.01 cc) to lymph node transfer day (73.4 ± 6.48 cc) and a statistical reduction ($p < 0.05$) of volume until the end of the study (50.14 ± 3.28 cc). This volume increase of the treated hind limb on lymph node transfer day was also statistically significant ($p < 0.05$) compared with the control hind limb (Fig. 2 and Table 1).

Histology

The transferred lymph nodes kept their architecture similar to the normal excised nodes, and the cortex and medulla of the transferred node kept the same relationship. More concentration of lymphatic and vascular vessels was observed in the cortex area, suggesting revascularization (Fig. 3).

Discussion

Our experimental model showed that lymph node transfer can reduce lymphedema in the hind limb of a rabbit.

The transferred nodes are totally functional in the recipient leg because the amount of lymphatic fluid is reduced, their efferent and afferent lymphatic vessels generate new functional connections with the transferred node, and the lymph node maintains natural architecture after transfer.

Our results may provide answers to the three questions posed by Shesol et al.²¹: (1) the lymph node transferred constituted a continuity of the operated lymphatic vessels; (2) time is a consuming factor for success; and (3) there are vascular requirements for transplantation.

Using this rabbit model, we can confirm that the transferred node establishes new and spontaneous connections

with lymph vessels that were present in the niche. We anastomosed only the artery and vein of the node, and the image of patent blue at the end of the study showed a continuity of lymph vessels from the paw to the inguinal region through the transferred popliteal node.

In our previous study,¹⁵ we showed that in 3 weeks after induction of lymphedema, the edema was progressively reduced, but that the increase in volume was maintained because of the chronic status of the condition. This is why in this study, the surgery to transfer the lymph node was performed 15 days after lymphedema induction; we thus avoided a fibrotic status that complicates the surgery and well-being of the animals.

At least the main node artery and vein must be transferred with the lymphatic node to maintain its function and allow it to create lymphatic connections.

The study must be carried out over an extended period of time to corroborate that the lymph node maintains its function, to determine the evolution of the lymphedema, and to establish the best moment to perform the node transfer. However, even with leakages, this first approach to the surgery obtained promising results and allowed microsurgical training with a realistic lymphedema model. However, it should be borne in mind that lymphedema evolves faster in rabbits than in humans due to the fact that they are animals, their youthfulness, and their capacity for regeneration.^{22–24}

The development of animal models for the study of the lymphatic system has led to an explosion of information on mechanisms governing lymphatic development and diseases associated with lymphatic dysfunction.²⁵ Using this rabbit model, the underlying mechanism of lymphedema can be studied in a practical and realistic setting.

Conclusion

In animal studies of lymphedema, there is a natural resolution of the edema over time, but not of total volume.

Therefore, caution is in order when extrapolating findings from animal models to the clinical setting.

The procedure described here is less extreme than other methods published with interventions such as circumferential denuding of the soft tissue, compression banding, and radiation. The goal is to induce secondary lymphedema while causing minimal degree of morbidity to the animal.

The study sample is small but adequate given the resources available and the need to limit the animal lives used.

Future power calculations may be based on measurements used in this study to calculate study size.

Acknowledgments

This study was funded by Fondo de Investigación (FIS) en salud del Ministerio de Sanidad y Consumo de España, Instituto Carlos III, Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Project No. PI1302793. The authors thank Ignasi Gich, PhD, for statistical and methodological assistance and Dr. J. Oriol Juan-Babot for performing histopathological sections.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Ghanta S, et al. Regulation of inflammation and fibrosis by macrophages in lymphedema. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; 308:H1065–H1077.
- Rockson SG. Secondary lymphedema: Is it a primary disease?. *Lymphat Res Biol* 2008; 6:63.
- McLaughlin SA, et al. Prevalence of lymphedema in women with breast cancer 5 years after sentinel lymph node biopsy or axillary dissection: Objective measurements. *J Clin Oncol* 2008; 26:5213.
- Petrek JA, et al. Lymphedema in a cohort of breast carcinoma survivors 20 years after diagnosis. *Cancer* 2001; 92:1368–1377.
- Becker C, et al. Postmastectomy lymphedema: Long-term results following microsurgical lymph node transplantation. *Ann Surg* 2006; 243:313.
- Cheng M-H, et al. A novel approach to the treatment of lower extremity lymphedema by transferring a vascularized submental lymph node flap to the ankle. *Gynecol Oncol* 2012; 126:93–98.
- Lin C-H, et al. Vascularized groin lymph node transfer using the wrist as a recipient site for management of postmastectomy upper extremity lymphedema. *Plast Reconstr Surg* 2009; 123:1265–1275.
- Saaristo AM, et al. Microvascular breast reconstruction and lymph node transfer for postmastectomy lymphedema patients. *Ann Surg* 2012; 255:468–473.
- Viitanen TP, et al. Donor-site lymphatic function after microvascular lymph node transfer. *Plast Reconstr Surg* 2012; 130:1246–1253.
- Cornelissen AJM, et al. Outcomes of vascularized versus non-vascularized lymph node transplant in animal models for lymphedema. Review of the literature. *J Surg Oncol* 2017; 115:32–36.
- Aschen SZ, et al. Lymph node transplantation results in spontaneous lymphatic reconnection and restoration of lymphatic flow. *Plast Reconstr Surg* 2014; 133:301.
- Joseph WJ, et al. Sterile inflammation after lymph node transfer improves lymphatic function and regeneration. *Plast Reconstr Surg* 2014; 134:60.
- Hayashida K, et al. Adipose-derived stem cells and vascularized lymph node transfers successfully treat mouse hindlimb secondary lymphedema by early reconnection of the lymphatic system and lymphangiogenesis. *Plast Reconstr Surg* 2017; 139:639–651.
- Tobbia D, et al. Experimental assessment of autologous lymph node transplantation as treatment of postsurgical lymphedema. *Plast Reconstr Surg* 2009; 124:777–786.
- Fernández Peñuela R, et al. An experimental lymphedema animal model for assessing the results of lymphovenous anastomosis. *Lymphat Res Biol* 2018; 16:234–239.
- Wolfe JHN, Rutt D, Kinmonth JB. Lymphatic obstruction and lymph node changes—A study of the rabbit popliteal node. *Lymphology* 1983; 16:19–26.
- Suami H, et al. Use of indocyanine green fluorescent lymphography for evaluating dynamic lymphatic status. *Plast Reconstr Surg* 2011; 127:74e–76e.
- Suami H, et al. Perforating lymph vessels in the canine torso: Direct lymph pathway from skin to the deep lymphatics. *Plast Reconstr Surg* 2008; 121:31–36.
- Bach C, Lewis GP. Lymph flow and lymph protein concentration in the skin and muscle of the rabbit hind limb. *J Physiol* 1973; 235:477–492.
- Rojo-Amigo A. Sample size calculation in animal testing procedures. Rating incidents. *Lab Anim* 2014; 62:31–3.
- Shesol BF, et al. Successful lymph node transplantation in rats, with restoration of lymphatic function. *Plast Reconstr Surg* 1979; 63:817–823.
- Marttala J, et al. Keloids: Animal models and pathologic equivalents to study tissue fibrosis. *Matrix Biol* 2016; 51:47–54.
- Ito R, Suami H. Overview of lymph node transfer for lymphedema treatment. *Plast Reconstr Surg* 2014; 134:548–556.
- Osogoe B, Courtice FC. The effects of occlusion of the blood supply to the popliteal lymph node of the rabbit on the cell and protein content of the lymph and on the histology of the node. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1968; 46:515–524.
- Shin WS, Szuba A, Rockson SG. Animal models for the study of lymphatic insufficiency. *Lymphat Res Biol* 2003; 1:159–169.

Address correspondence to:
Jaume Masiá Ayala, MD, PhD
Department of Plastic Surgery
Santa Creu i Sant Pau Hospital
(Universitat Autònoma de Barcelona)
Sant Antoni M. Claret 167
Barcelona 08025
Spain

E-mail: jmasia@santpau.cat

8

Discusión

El modelo experimental en el conejo demostró ser adecuado para el desarrollo de linfedema^{32,39}. Los conejos desarrollaron un linfedema similar al observado en los humanos, lo que quedó demostrado mediante los resultados clínicos e histopatológicos^{32,39}. La evolución del linfedema es más rápida en los conejos que en los humanos. Tres semanas después de la intervención para inducir el linfedema en la oreja, el edema comienza a reducirse, pero el aumento en el espesor de la oreja persiste³², esto se debe a que la condición fisiológica se vuelve crónica. La respuesta rápida de recuperación se observa más temprano en animales jóvenes que en animales adultos debido a la capacidad del conejo para sanar⁴⁰. La acumulación de líquido intersticial y fluido linfático dentro de la piel y el tejido subcutáneo estimula a los fibroblastos, queratinocitos y adipocitos lo que conducen a la deposición de colágeno y glicosaminoglicanos en el interior del tejido subcutáneo y la piel, ocasionando hipertrofia de la piel y destrucción de las fibras elásticas^{12,32}. Las muestras de tejido obtenidas al final del estudio mostraron fibrosis, inflamación deficiente y baja infiltración de células inmunes³². Es de destacar que en ninguna de las biopsias realizadas observamos macrófagos lo que podría sugerir un proceso de curación del linfedema inducido^{32,39}.

Los datos experimentales muestran que los cambios estructurales observados en pacientes con linfedema, como fibrosis, infiltración de células inmunes, y depósitos de tejido adiposo, son reproducido claramente en el entorno de investigación^{21,41}. Estos hallazgos hacen del conejo un modelo animal ideal, destacando además la rápida capacidad de los conejos para curarse.

Los modelos de conejo son ampliamente utilizados en estudios experimentales, debido a su tamaño y al hecho de que su anatomía general es bien conocida^{42,43}. En el conejo, los canales linfáticos son parte del sistema circulatorio, pero son en gran parte independientes de los vasos sanguíneos; los ganglios y los conductos linfáticos por lo general son considerados como un sistema separado. Los estudios de linfedema se han centrado en la base del lengua de conejo y en las extremidades superiores

del animal, en ambos casos no hay evidencia de una significativa reducción de la condición^{23,44}.

La anastomosis linfaticovenosa ha sido realizada por varios autores, especialmente en animales grandes, pero los resultados han sido inconsistentes. En nuestro estudio la respuesta a la anastomosis linfaticovenosa fue exitosa en todos los animales³². En algunos experimentos donde practican la anastomosis linfaticovenosa la asocian con la utilización de factores de crecimiento^{12,19,45} como el VEGF-C, sin embargo la complicaciones reportadas son de hasta un 38%.

En nuestro modelo³², realizamos la destrucción individual y total de los vasos en el lado externo de la oreja para inducir linfedema, además de la extirpación de piel y el tejido subcutáneo. Cuidamos de no manipular el cartílago. Logramos así, la formación de linfedema de manera consistentes. La histopatología de los animales control mostró que los vasos linfáticos se encuentran en el lado externo de la oreja, por encima de la capa muscular y lejos del cartílago. Por lo que se evidencia que no se necesita realizar una lesión más profunda en los músculos o en el cartílago³². Este procedimiento permite a los animales recuperarse fácilmente de la cirugía. Al no manipular el cartílago se evita el posible desarrollo de necrosis, malformaciones y/o orejas retorcidas.

El día veinte después de la cirugía de anastomosis linfaticovenosa los vasos linfáticos todavía estaban dilatados³². La destrucción total de los vasos linfáticos para la inducción del linfedema inhibe el drenaje linfático, pero el endotelio linfático continua desempeñando su función y se inicia la acumulación de la linfa en los vasos ante la imposibilidad de ser drenada, lo que ocasiona dilatación de los vasos linfáticos³². En el primer estudio los animales se mantuvieron menos de veinte días después de la anastomosis linfaticovenosa por lo que no observamos si los vasos linfáticos dilatados regresan a su tamaño basal y se regulaba la presión de flujo³².

El uso del conejo como modelo animal para el estudio de las patologías asociadas al sistema linfático es muy útil puesto que su anatomía linfática es constante³². Además al utilizar las orejas no se realiza ninguna cirugía mayor

que comprometa gravemente la salud y el bienestar del animal y permite utilizar una oreja como estudio y dejar la otra como control del mismo, sufriendo los mismos cambios fisiológicos debidos a la intervención³². Aunque cabe recordar que las orejas son la parte mas sensible del animal y por la que sufre mayor discomfort. Debido a su tamaño y capacidad de sanar es probable que sea de gran beneficio para el entrenamiento profesional en técnicas microquirúrgicas lo que puede contribuir a estimular el tratamiento quirúrgico del linfedema entre los profesionales en un futuro.

Así mismo al evaluar el modelo experimental de linfedema en conejo realizando la técnica de trasplante del colgajo libre de ganglio vascularizado pudimos observar que los ganglios transferidos son totalmente funcionales en el receptor y reducen el linfedema en la extremidad posterior del conejo³⁹. La reducción de la linfa fue evidente, esto se debe a que sus vasos linfáticos eferentes y aferentes generan nuevas conexiones con el ganglio transferido. La arquitectura natural de ganglio se mantiene después de la transferencia³⁹. Nuestros resultados pueden proporcionar respuestas a las tres preguntas planteadas por Shesol et al.⁴⁶: (1) el ganglio linfático transferido constituye una continuidad de los vasos linfáticos operados; (2) el estadio del linfedema en que decida tratarse es un factor importante para el éxito; y (3) se requiere un lecho vascular adecuado para el trasplante. Usando este modelo de conejo, podemos confirmar que el ganglio transferido establece conexiones con los vasos linfáticos que estaban presentes en el lecho receptor³⁹. Al finalizar el estudio y posterior a la administración de Patent Blue V® se evidenció la continuidad de los vasos linfáticos desde la pata hasta la región inguinal a través del ganglio poplíteo transferido³⁹. En nuestro estudio anterior³², utilizando como modelo experimental orejas de conejo mostramos que después de tres semanas de realizada la inducción de linfedema, el edema se redujo progresivamente, pero el aumento en el volumen se mantuvo debido al estado crónico de la condición. Por eso en este estudio, la cirugía para transferir el ganglio linfático se realizó el día quince posterior a la inducción de linfedema, de esta manera evitamos el desarrollo de un estado de fibrosis, lo que complica la cirugía y el bienestar de los animales³⁹.

Durante el procedimiento de transferencia de ganglio debemos garantizar que al menos la arteria y vena ganglionar principal sean transferidas junto con el ganglio linfático, esto permite mantener su función y crear las futuras conexiones linfáticas³⁹.

Es importante realizar el estudio durante un período prolongado, en una primera fase para evaluar la evolución del linfedema y establecer el mejor momento para realizar la transferencia del ganglio. En una segunda fase, posteriormente a la transferencia se debe corroborar que el ganglio linfático mantiene su función y se han realizado las nuevas conexiones de los vasos linfáticos³⁹.

Esta primera aproximación a la cirugía de transferencia de ganglio linfático obtuvo resultados prometedores³⁹. Además, permitió el entrenamiento en la práctica de técnicas de microcirugía con un modelo de linfedema realista. De todos modos, es importante tener en cuenta que el linfedema evoluciona más rápido en conejos que en los humanos debido a que son animales jóvenes con una rápida capacidad de regeneración⁴⁷⁻⁴⁹. El desarrollo de modelos animales para el estudio del sistema linfático ha incrementado la información sobre los mecanismos que regulan su desarrollo y las enfermedades asociada a su disfunción⁵⁰. El uso del conejo como modelo animal permitirá estudiar el mecanismo subyacente del linfedema en un entorno práctico y realista^{32,39}.

En cuanto a los dos modelos microquirúrgicos utilizados observamos que la realización de la técnica del trasplante de colgajo libre de ganglio vascularizado es más fácil que la anastomosis linfaticovenosa, debido a la facilidad de localizar y reubicar el ganglio que se transfiere. Mientras que la utilización de la técnica de anastomosis linfaticovenosa requiere mayor destreza quirúrgica pues es necesario localizar los vasos linfáticos y realizar la correcta anastomosis de los mismos. La función de la anastomosis linfaticovenosa se evalúa mediante linfografía³², por lo que no es posible evidenciarla en el momento de la cirugía. Mientras que la función del ganglio transplantado es más fácil de visualizar y medir inmediatamente después de la cirugía³⁹. La técnica microquirúrgica de anastomosis linfaticovenosa

estaría recomendada efectuarla en pacientes que cursen con linfedema incipiente y en estadios tempranos. Mientras que el trasplante de ganglio linfático vascularizado puede funcionar en estados más avanzados de la enfermedad^{32,39}.

Somos conscientes que la regulación de la presión venosa es esencial para la fisiología de la anastomosis linfático-venosa. Una presión venosa elevada incrementa la presión hidrostática, la filtración capilar y la producción de linfa. Si estos cambios se mantienen de forma crónica, la función del sistema linfático transferido podría fallar¹. La presión venosa elevada impediría que las anastomosis linfático-venosa intratisulares empiecen a funcionar. Estudios experimentales muestran que una presión venosa elevada en el ganglio linfático produce fibrosis, lo que evita que las anastomosis linfático-venosa funcionen⁵¹. Esto hace que el control de la presión venosa constituya un elemento importante a tener en cuenta al momento de realizar la anastomosis linfático-venosa o la transferencia de ganglio linfático vascularizado. Una forma de mejorar ese equilibrio, sería por medio de la selección de vasos receptores cuya presión no sea mayor que la presión del colgajo⁵². Las áreas receptoras proximales (axilas e ingles) serían la opción más fisiológica y adecuada para mantener la viabilidad del colgajo de ganglio linfático-venoso al ser la presión venosa más baja que en zonas distales⁵³.

Una revisión exhaustiva de las comunicaciones linfáticas naturales y su papel en la cirugía del linfedema⁵³, además de la reciente demostración de que el modelo experimental en el conejo permite el desarrollo de linfedema y que su tratamiento mediante las técnicas microquirúrgicas como la anastomosis linfático-venosa y el trasplante de colgajo libre de ganglio vascularizado son efectivas en el tratamiento del linfedema^{32,39}, indican que la continuidad de la línea de investigación que se realiza en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona debe dirigirse al desarrollo de nuevas prácticas que permitan evaluar la parte funcional de las anastomosis y de los lechos receptores.

9

Conclusiones

CONCLUSIONES:

El modelo experimental de linfedema de conejo descrito en este estudio es reproducible y estable.

Se evidenció que posterior a la inducción del linfedema, existe una resolución natural del edema a lo largo del tiempo, pero no del volumen total. Por lo tanto, se debe tener precaución al extrapolar los resultados de los modelos animales al ámbito clínico.

El procedimiento descrito aquí es menos agresivo y mantiene mejor el bienestar animal que otros métodos publicados con intervenciones como la circunferencial, desnudos del tejido blando, bandas de compresión y radiación, etc.

La muestra de estudio es pequeña pero adecuada dados los recursos disponibles y la necesidad de limitar el número de los animales utilizados. Los futuros cálculos de potencia pueden basarse en las mediciones empleadas en este estudio para calcular el tamaño de la muestra.

Se demuestra la eficacia del uso del conejo como modelo animal idóneo en la práctica del desarrollo y tratamiento quirúrgico del linfedema.

En cuanto a las dos técnicas quirúrgicas aplicadas para el tratamiento del linfedema se demuestra que tanto la anastomosis linfático venosa como el trasplante ganglionar vascularizado son efectivos en la resolución del linfedema.

Las nuevas técnicas y habilidades quirúrgicas pueden mejorar el manejo del linfedema y puede ayudar a optimizar los resultados del paciente.

El modelo animal con conejo es ideal para los cirujanos que deseen ampliar sus habilidades microquirúrgicas para tratar el linfedema.

CONCLUSIONS

The experimental model of rabbit lymphedema described in this study is reproducible and permanent.

It was evidenced that after the induction of lymphedema, there is a natural resolution of the edema over time, but not of the total volume. Therefore, caution should be exercised when extrapolating the results of the animal models to the clinical setting.

The described procedure is less extreme than other published methods with interventions such as circumferential, soft tissue nudity, compression and radiation bands, etc

The study sample is small but adequate given the resources available and the need to limit the lives of the animals used. Future power calculations can be based on measurements used in this study to calculate the size of the sample.

The efficacy of the use of the rabbit as an ideal animal model in the development practice and surgical treatment of lymphedema is demonstrated.

Surgical techniques applied to the treatment of lymphedema also show that venous lymphatic anastomosis and vascularized lymph node transplantation are effective in the resolution of lymphedema.

New techniques and surgical skills can improve the management of lymphedema and can help optimize patient outcomes.

The rabbit as an animal model is ideal for surgeons who want to expand their microsurgical skills to treat lymphedema.

10

Referencias

1. Mortimer PS, Rockson SG. New developments in clinical aspects of lymphatic disease. *J Clin Invest* 2014;124(3):915-21.
2. Frueh FS, Gousopoulos E, Rezaeian F, Menger MD, Lindenblatt N, Giovanoli P. Animal models in surgical lymphedema research—a systematic review. *J Surg Res* 2016;200(1):208-20.
3. Vojáčková N, Fialová J, Hercogová J. Management of lymphedema. *Dermatol Ther* 2012;25(4):352-7.
4. Mehrara BJ, Zampell JC, Suami H, et al. Surgical management of lymphedema: past, present, and future. *Lymphat Res Biol* 2011; 9:159-67.
5. Lee-Donaldson L, Witte MH, Bernas M, Witte CL, Way D, Stea B. Refinement of a rodent model of peripheral lymphedema. *Lymphology* 1999;32(3):111-7.
6. Reichert FL, Mathes ME. Experimental lymphedema of intestinal tract and its relation to regional cicatrizing enteritis. *Ann Surg* 1936;104(4):601-16.
7. Olszewski W. Pathophysiological and Clinical Observation of Obstructive Lymphedema of the Limbs. In: Cloudius (ed) *Lymphedema*. Stuttgart: GeorgThieme Verlag 1977, pp 79-102.
8. Shin WS, Szuba A, Rockson SG. Animal models for the study of lymphatic insufficiency. *Lymphat Res Biol* 2003;1(2):159-69.
9. Cloudius L. Experimental lymphedema and therapeutic concepts. *Acta Chir Plast* 1976; 18(3):113-6.
10. O'Brien BM, Sykes P, Threlfall GN, Browning FS. Microlymphaticovenous anastomoses for obstructive lymphedema. *Plast Reconstr Surg* 1977; 60(2):197-211.
11. Yong LC. Regeneration of lymphatic vessels in the ear of the guinea pig. *J Pathol* 1980;131(3):209-19.
12. Szuba A, Skobe M, Karkkainen MJ, Shin WS, Beynet DP, Rockson NB, Dakhil N, Spilman S, Goris ML, Strauss HW, Quertermous T, Alitalo K, Rockson SG. Therapeutic lymphangiogenesis with human recombinant VEGF-C. *FASEB J* 2002; 16:1985-7.
13. Fu K, Izquierdo R, Vandevender D, Warpeha RL, Fareed J. Transplantation of lymph node fragments in a rabbit ear lymphedema model:

a new method for restoring the lymphatic pathway. *Plast Reconstr Surg* 1998; 101:134–41.

14. Dominici C, De Leo S, Covarelli P, Cordellini P, Seerini D, Glosti D. Experimental model of lymphedema. *Vasc Surg* 1990; 24:30-3.

15. Huang GK, Hsin YP. An experimental model for lymphedema in rabbit ear. *Microsurgery* 1983; 4(4):236-42.

16. Casley-Smith JR, Clodius L, Piller NB, et al. A model of lymphoedema in the rabbit's ear the effects of the benzopyrones. *Chir Plastica* 1977; 4:5.

17. Eloesser L. Obstruction to the lymph channels by scar. *JAMA* 1923;81(22):867-1870.

18. Piller NB, Clodius L. Lymphoedema of the rabbit- ear following partial and complete lymphatic blockade; its effects on fibrotic development, enzymatic types and their activity levels. *Br J Exp Path* 1978; 59:319-26.

19. Yoon YS, Muraya T, Gravereaux E, Tkebuchava T, Silver M, Curry C, Wecker A, Kirchmair R, Hu CS, Kearney M, Ashare A, Jackson DG, Kubo H, Isner JM, Losordo DW. VEGF-C gene therapy augments postnatal lymphangiogenesis and ameliorates secondary lymphedema. *J Clin Invest*. 2003 Mar; 111(5):717-25.

20. Hadamitzky C, Pabst R. Acquired lymphedema: an urgent need for adequate animal models. *Cancer Res* 2008; 68(2):343-5.

21. Koshima I, Kawada S, Moriguchi T, Kajiwara Y. Ultrastructural observations of lymphatic vessels in lymphedema in human extremities. *Plast Reconstr Surg* 1996;97:397-405, discussion 406-7.

22. Becker C, Assouad J, Riquet M, Hidden G. Postmastectomy lymphedema: long-term results following microsurgical lymph node transplantation. *Ann Surg* 2006; 243(3):313-5.

23. Cheng MH, Huang JJ, Nguyen DH, Saint-Cyr M, Zenn MR, Tan BK, Lee CL. A novel approach to the treatment of lower extremity lymphedema by transferring a vascularized submental lymph node flap to the ankle. *Gynecol Oncol* 2012;126(1):93-8.

24. Lin CH, Ali R, Chen SC, Wallace C, Chang YC, Chen HC, Cheng MH. Vascularized groin lymph node transfer using the wrist as a recipient site for

management of postmastectomy upper extremity lymphedema. *Plast Reconstr Surg* 2009;123(4):1265-75.

25. Saaristo AM, Nieme TS, Viitanen TP, Tervala TV, Hartiala P, Suominen EA. Microvascular breast reconstruction and lymph node transfer for postmastectomy lymphedema patients. *Ann Surg* 2012;255(3):468-73.

26. Viitanen TP, Mäki MT, Seppänen MP, Suominen EA, Saaristo AM. Donor-site lymphatic function after microvascular lymph node transfer. *Plast Reconstr Surg* 2012;130(6):1246-53.

27. Cornelissen AJ, Qiu SS, Lopez Penha T, Keuter X, Piatkowski de Grzymala A, Tuinder S, van der Hulst R. Outcomes of vascularized versus non-vascularized lymph node transplant in animal models for lymphedema. Review of the literature. *J Surg Oncol* 2017;115(1):32-6.

28. Aschen SZ, Farias-Eisner G, Cuzzone DA, Albano NJ, Ghanta S, Weitman ES, Ortega S, Mehrara BJ. Lymph node transplantation results in spontaneous lymphatic reconnection and restoration of lymphatic flow. *Plast Reconstr Surg* 2014;133(2):301-10.

29. Joseph WJ, Aschen S, Ghanta S, Cuzzone D, Albano N, Gardenier J, Savetsky I, Torrisi J, Mehrara BJ. Sterile inflammation after lymph node transfer improves lymphatic function and regeneration. *Plast Reconstr Surg* 2014;134(1):60-8.

30. Hayashida, K, Yoshida S, Fujioka M, Saijo H, Migita K, Kumaya M, Akita S. Adipose-derived stem cells and vascularized lymph node transfers successfully treat mouse hindlimb secondary lymphedema by early reconnection of the lymphatic system and lymphangiogenesis. *Plast Reconstr Surg* 2017;139(3):639-51.

31. Tobbia D, Semple J, Baker A, Dummont D, Johnston M. Experimental assessment of autologous lymph node transplantation as treatment of postsurgical lymphedema. *Plastic Reconstruct Surg* 2009;124(3):777-86.

32. Fernández Peñuela R, Pons Playa G, Casaní Arazo L, Masiá Ayala J. An Experimental Lymphedema Animal Model for Assessing the Results of Lymphovenous Anastomosis. *Lymphat Res Biol* 2018;16(3):234-39.

33. Wolfe, JH, Rutt D, Kinmonth JB. Lymphatic obstruction and lymph node

- changes--a study of the rabbit popliteal node. *Lymphology* 1983;16(1):19-26.
34. Suami H, Chang DW, Yamada K, Kimata Y. Use of indocyanine green fluorescent lymphography for evaluating dynamic lymphatic status. *Plast Reconstr Surg* 2011;127(3):74e-76e.
35. Suami, H, O'Neill JK, Pan WR, Taylos GI. Perforating lymph vessels in the canine torso: direct lymph pathway from skin to the deep lymphatics. *Plast Reconstr Surg* 2008;121(1):31-6.
36. Mortimer PS, Bates DO, Brassington HD, Staton AWB, Strachan DP, Levick JR. The prevalence of arm oedema following treatment for breast cancer. *QJMed* 1996;89(5):377-80.
37. Logan V. Incidence and prevalence of lymphedema: A literature review. *J Clin Nurs* 1995;4:213-9.
38. Rojo-Amigo A. Sample size calculation in animal testing procedures. Rating incidents. *Laboratory animals* 2014; 62:31-3.
39. Fernández Peñuela R, Casaní Arazo L, Masiá Ayala J. Outcomes in vascularized lymph node transplantation in rabbits: A reliable model for improving the surgical approach to lymphedema. *Lymphat Res Biol*. 2019;00(00):0-0.
40. Rutkowski JM, Moya M, Johannes J, Goldman J, Swartz M. Secondary lymphedema in the mouse tail: lymphatic hyperplasia, VEGF-C upregulation, and the protective role of MMP-9. *Microvasc Res* 2006;72:161-71.
41. Vignes S, Blanchard M, Yannoutsos A, Arrault M. Complications of autologous lymph-node transplantation for limb lymphoedema. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2013;45(5):516-20.
42. Rab M, Neumayer CH, Koller R, Kamolz LP, Haslik W, Gassner R, Giovanoli P, Schaden G, Frey M. Histomorphology of rabbit thigh muscles: establishment of standard control values. *J Anat* 2000;196(2):203-9.
43. Soto-Miranda MA, Suami H, Chang DW. Mapping superficial lymphatic territories in the rabbit. *The Anatomical Record* 2013; 296:965-70.
44. Liu XC, Yang WJ, Zhang CP, Qu XZ, Wang Y, Qui LH, Ji P. An exploration of the surgical modality of sentinel lymph node biopsy in patients with cN0 tongue carcinoma: an animal study.

45. Cruz Y, Hudson R, Pacheco P, Lucio R, Martinez-Gomez M. Anatomical and physiological characteristics of perineal muscles in the female rabbit. *Physiol Behav* 2002;75:33-40.
46. Shesol BF, Nakashima R, Alavi A, Hamilton RW. Successful lymph node transplantation in rats, with restoration of lymphatic function. *Plast Reconstr Surg* 1979;(63)6:817-23.
47. Marttala, J, Andrews JP, Rosenbloom J, Uitto J. Keloids: Animal models and pathologic equivalents to study tissue fibrosis. *Matrix Biol* 2016;51:47-54.
48. Ito, R, Suami H. Overview of lymph node transfer for lymphedema treatment. *Plast Reconstr Surg* 2014;134(3):548-56.
49. Osogoe, B.; Courtice, F. C. The effects of occlusion of the blood supply to the popliteal lymph node of the rabbit on the cell and protein content of the lymph and on the histology of the node. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1968;46(5):515-24.
50. Shin, W. S.; Szuba, A.; Rockson, S. G. Animal models for the study of lymphatic insufficiency. *Lymphat Res Biol* 2004;1(2):159-69.
51. Hidden G, Menard P, Zorn JY. Lymphaticovenous communications. Role of the lymph nodes. *Anat Clin* 1985;7(2):83-91.
52. Heymans O, Verhelle NA, Nelissen X, Dondelinger RF. Embolization of a free flap nutrient artery to reduce late postoperative edema. *Plast Reconstr Surg* 2004;113(7):2091-4.
53. Miranda Garcés, M, Mirapeix R, Pons G, Sadri A, Masià J. A comprehensive review of the natural lymphaticovenous communications and their role in lymphedema surgery. *J Surg Oncol* 2016; 113 (4):374-380.

11

Anexos

ANEXO I. Figura 1 del primer artículo

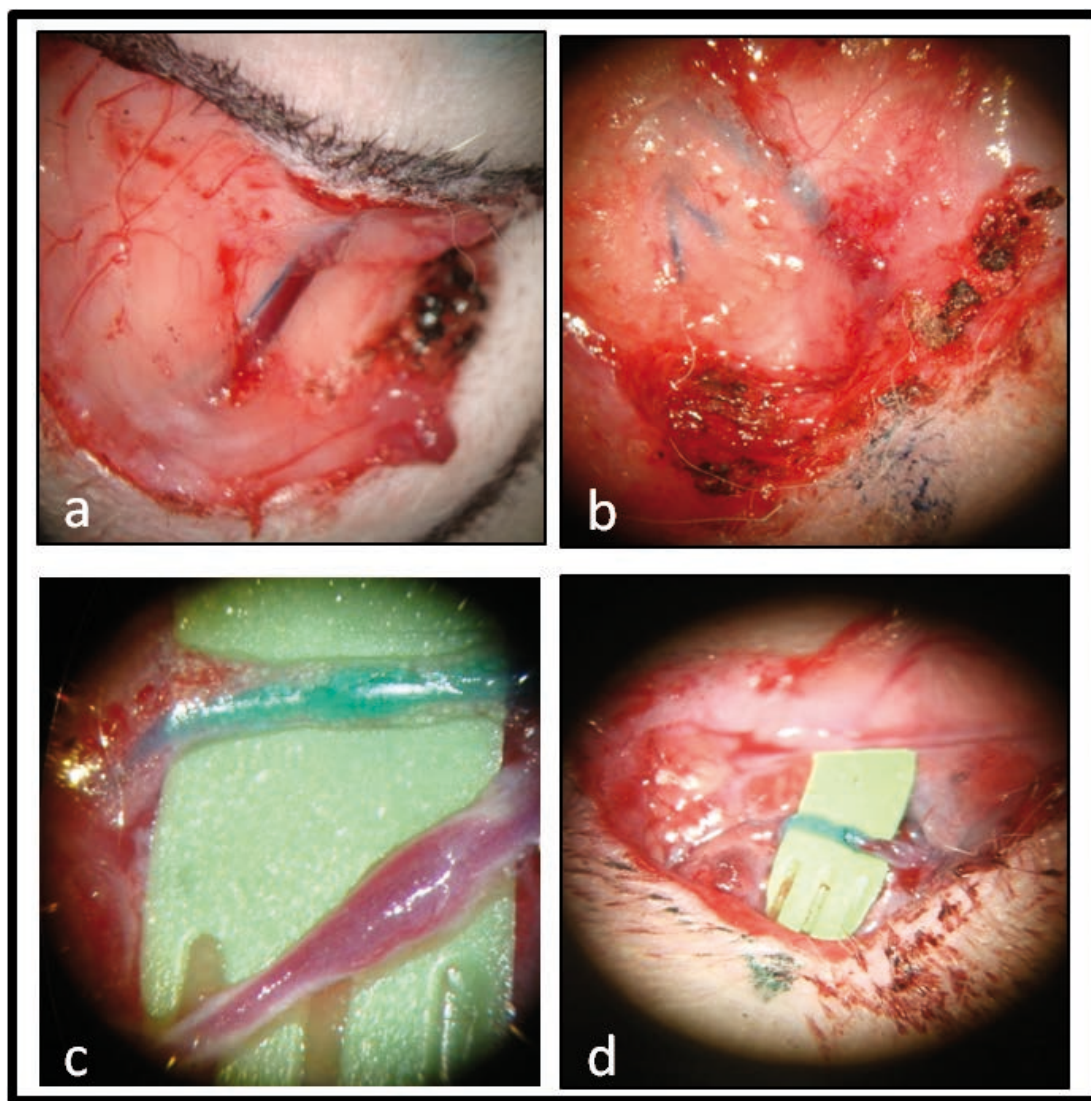


FIG. 1. Surgical sequence in the formation of lymphedema. (a) Lymphatic vessel stained with Blue Patent V. (b) Selective destruction of material by electrocoagulation. (c) Lymphatic vessel dilated with adjacent vein on day 15 after the induction of lymphedema. (d) Lymphatic venous terminal anastomosis, the dye is flowing toward the vein.

ANEXO II. Figura 2 del primer artículo

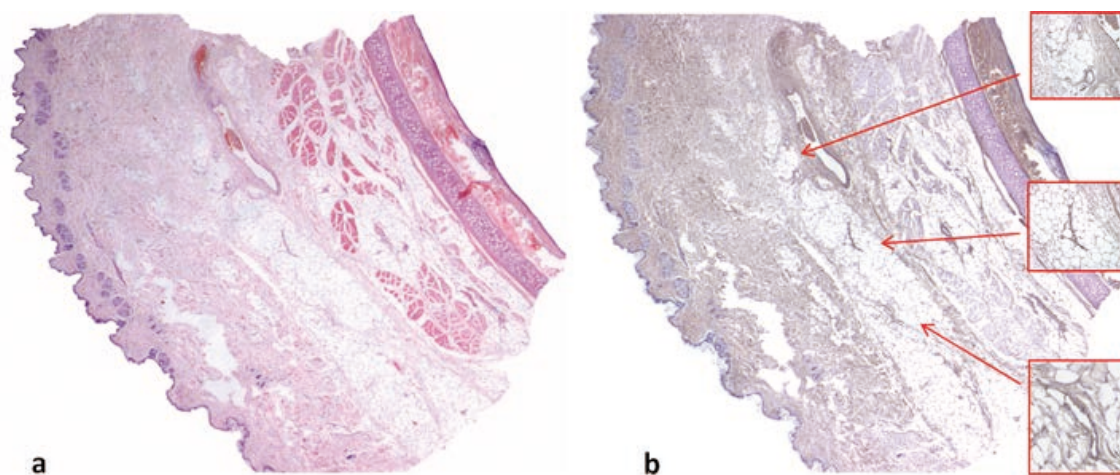


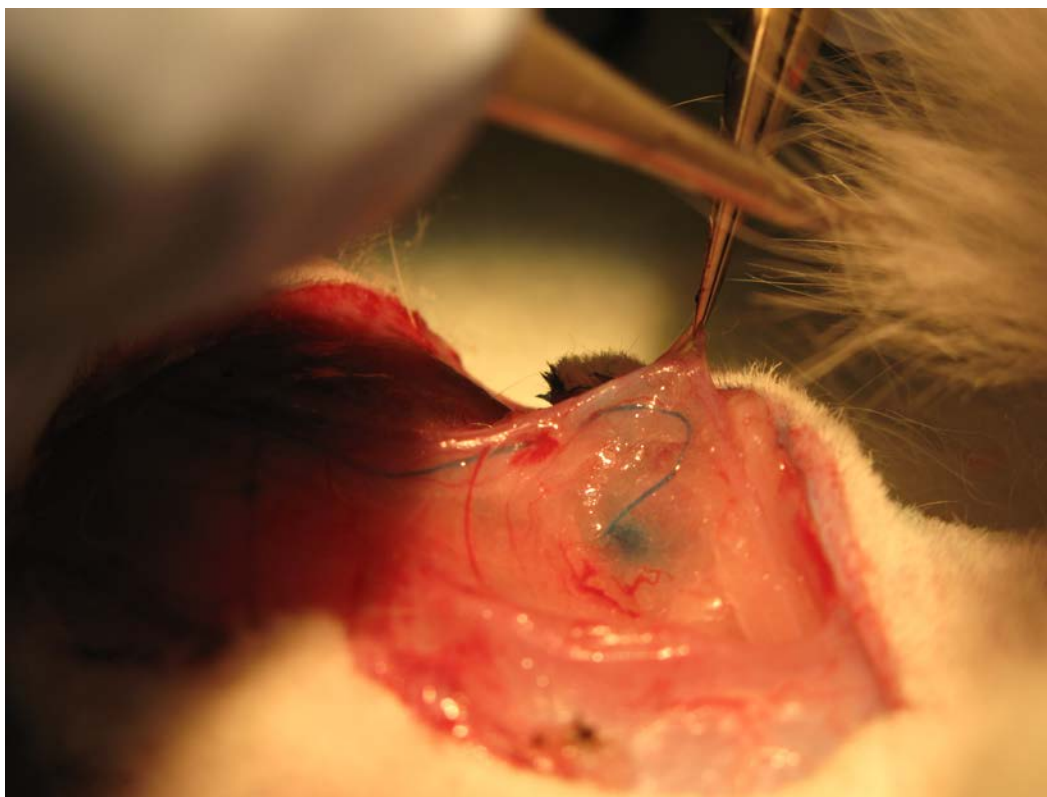
FIG. 2. Healthy ear of a rabbit. Histological cross section from skin to inner side. The same cut is stained with (a) hematoxylin/eosin to show the morphology of the ear and (b) anti-LYVE antibody, staining in brown the endothelium of lymphatic vessels. Framed are detailed vessels of the deep dermis.

ANEXO III. Técnica de infiltración en la pata de conejo



Técnica de infiltración en la pata de conejo de Patent Blue V® en el espacio interdigital de la pata posterior de conejo.

ANEXO IV. Visualización del canal linfático



Visualización del canal linfático aferente drenando al ganglio linfático poplíteo.



**Universitat Autònoma
de Barcelona**