



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

DEPARTAMENT DE CIRURGIA

**Estudio sobre la viabilidad de la
anastomosis vascular microquirúrgica
en población irradiada.**

Estudio en modelo animal en rata

Memoria presentada por

Sergi Barrera Ochoa

para la obtención del grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Directores:

Enric Càceres Palou

Joan Nardi Vilardaga

Roberto Vélez Villa

Barcelona, Septiembre 2014

AGRADECIMIENTOS

Al **Hospital Universitario Vall d'Hebrón (HUVH)**, al **Institut de Recerca Vall d'Hebrón (VHIR)** y a la **Universidad Autónoma de Barcelona (UAB)** por colaborar y apoyar la investigación.

A la **Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (SECOT)** y a la **Sociedad Catalana de Cirugía Ortopédica y Traumatología (SCCOT)** por financiar la investigación experimental.

Al **Dr. Enric Cáceres**, por sus aportaciones y sugerencias en la realización del trabajo, y por las oportunidades que siempre me ha ofrecido.

Al **Dr. Joan Nardi**, por su orientación en la realización de este trabajo.

Al **Dr. Roberto Vélez**, por tantas cosas, primero adjunto, después compañero y gran amigo, por sembrar en mi la semilla de la investigación y del esfuerzo constante, y por brindarme la maravillosa oportunidad de poder unir nuestras pasiones a la investigación.

Al **Dr. Marius Aguirre**, por su entusiasmo y devoción por la investigación, y por la oportunidad de formar parte del grupo de investigación de Ingeniería Tisular Musculoesquelética del VHIR.

A mis compañeros del **Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular Musculoesquelética** del VHIR, Irene, Alba y Víctor por su inestimable ayuda durante tantísimos días de microcirugía y radioterapia.

A la **Dra. Irene Gallardo**, principalmente por su infinita amistad, su paciencia, su ilusión y esfuerzo, por sus muchos consejos y por las innumerables horas dedicadas en este proyecto. Sin ella hubiese sido muy difícil.

A **Alba López**, por su inestimable y generosa colaboración en la recogida, preparación y revisión de todas las muestras histológicas.

A la **Dra. Cleofe Romagosa**, por su ayuda en la supervisión, revisión y evaluación de los resultados histológicos.

A la **Dra. Ramona Vergés**, por su ayuda en la organización y supervisión en la irradiación de los animales.

A **Jordi Saez**, y al **servicio de radiofísica del HUVH** por la profunda colaboración en la planificación del modelo preclínico de irradiación cervical seguro, y por las numerosísimas horas de irradiación.

A **Marta Rosal** y **Alejandro Rojo**, por su colaboración, ayuda y consejo en muchos aspectos del cuidado de los animales.

Al **Dr. Xavier Mir**, uno de mis maestros en la cirugía de la mano, por sus muchas enseñanzas, su confianza y por ofrecerme infinitas oportunidades.

Al **Dr. Manel Llusà**, por su colaboración en la solicitud de las becas para la financiación del proyecto, y por su predisposición y preocupación constante por la docencia.

A la **Dra. Nuria Vidal**, primero mi residente mayor, luego mi adjunta y finalmente mi amiga. Por sus consejos en primeros pasos en la microcirugía y por mostrarme el placer por la cirugía de la mano.

Al **Dr. Alex Lluch**, por demostrarme que el trabajo bien hecho tiene su recompensa.

Al **Dr. Xesco Soldado**, por su amistad, su genialidad y su inspiradora pasión por la microcirugía.

A todos mis compañeros de residencia, y en especial al **Dr. David Barastegui** por su amistad y ayuda en el inicio de este camino.

Al **Dr. Alberto Hernández**, por despertar en un estudiante de medicina el gusto por la cirugía ortopédica y traumatología.

A mi **familia**.

A **Miri y Jana**.

FINANCIACIÓN DEL PROYECTO

- Beca de ayuda a la investigación Sociedad Catalana de Cirugía Ortopédica y

Traumatología (SCCOT) 2012:

- Investigador principal: Roberto Vélez Villa.
- Investigadores asociados: Sergi Barrera-Ochoa.
- Financiación 12.000 euros.



- Beca de investigación científica Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y

Traumatología (SECOT) 2012:

- Investigador principal: Roberto Vélez Villa.
- Investigadores asociados: Sergi Barrera-Ochoa.
- Financiación 12.000 euros.



ÍNDICE

ÍNDICE

1. Justificación del trabajo	13
2. Introducción	21
2.1. Sarcomas de partes blandas	23
2.1.1. Epidemiología y factores de riesgo	23
2.1.2. Aproximación diagnóstica	24
2.2. Tratamiento de los sarcomas de partes blandas	34
2.2.1. Tratamiento de la enfermedad localizada	34
2.3. Radioterapia en el tratamiento de los sarcomas de partes blandas	39
2.3.1. Recomendaciones en SPB de extremidades	39
2.3.2. Técnicas de radioterapia	40
2.3.3. Volúmenes de irradiación	41
2.3.4. Dosis de irradiación	43
2.3.5. Radioterapia preoperatoria	44
2.3.6. Radioterapia postoperatoria	44
2.3.7. Braquiterapia	45
2.3.8. Tratamiento neoadyuvante: quimioterapia y quimioradioterapia neoadyuvante	47
2.4. Reconstrucción asociada a sarcomas de partes blandas	49
2.4.1. Objetivos	49
2.4.2. Métodos reconstructivos	49
2.4.3. Reconstrucción vascular	51
2.4.4. Reconstrucción nerviosa	51
2.4.5. Reconstrucción ósea	52

2.5. Reconstrucción microquirúrgica asociada a radioterapia en SPB	53
3. Hipótesis de trabajo	57
4. Objetivos de la Tesis	61
5. Material y métodos	65
5.1. Material	67
5.1.1. Animal	67
5.1.2. Instrumental para la irradiación	68
5.1.3. Instrumental para la sutura microvascular	70
5.2. Métodos	74
5.2.1. Técnica de anestesia general y cuidados peroperatorios	74
5.2.2. Estudio topográfico cervical mediante TAC	77
5.2.3. Modelo preclínico seguro de irradiación cervical	79
5.2.4. Técnica de la sutura microvascular arterial	82
5.2.5. Técnica de la sutura microvascular venosa	89
5.2.6. Estudio de dificultad técnica de la microsutura	94
5.2.7. Protocolo de eutanasia y obtención de muestras	94
5.2.8. Protocolo de anatomía patológica	95
5.2.9. Análisis estadístico	97
5.2.10. Distribución de los animales	97
6. Resultados	105
6.1. Modelo preclínico seguro de irradiación cervical	107
6.1.1. Evaluación clínica	107
6.1.2. Peso	108
6.1.3. Permeabilidad vascular	109

6.1.4.	Supervivencia/Mortalidad	111
6.1.5.	Estudios histológicos	113
6.2.	Estudio sobre la viabilidad de la anastomosis vascular microquirúrgica en población irradiada	136
6.2.1.	Evaluación clínica	136
6.2.2.	Peso	138
6.2.3.	Permeabilidad vascular	139
6.2.4.	Estudio de dificultad técnica de la sutura	144
6.2.5.	Supervivencia/Mortalidad	148
6.2.6.	Estudios histológicos	150
7.	Discusión	176
7.1.	Nuevo modelo experimental seguro de fibrosis neurovascular mediante radioterapia. Modelo preclínico en rata	176
7.1.1.	Elección del protocolo de irradiación	178
7.1.2.	Elección del animal de estudio	178
7.1.3.	Elección de la dosis de irradiación	178
7.1.4.	Elección de la localización de irradiación	179
7.1.5.	Evaluación del modelo animal experimental	180
7.2.	Viabilidad de la microanastomosis vascular	183
7.3.	Irradiación neoadyuvante en el tratamiento de SPB	188
7.4.	Limitaciones del estudio	193
7.5.	Trascendencia clínica del estudio	196
8.	Conclusiones	200
9.	Bibliografía	204

1. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

1. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Como resultado de los avances en los tratamientos adyuvantes, las técnicas quirúrgicas y los implantes de reconstrucción, el salvamento de extremidad se ha convertido en el estándar de tratamiento en los pacientes afectados de sarcomas de partes blandas (SPB)^{1,2,3}. Además, debido a las mejoras en el tratamiento sistémico adyuvante, sobreviven un mayor número de pacientes, y durante un periodo de tiempo más extenso², lo que aumenta las exigencias de calidad de las técnicas reconstructivas. El tratamiento de esta patología se basa en un enfoque multidisciplinar, generalmente requiere la combinación de cirugía con márgenes amplios y radioterapia (RT) y, ocasionalmente según el subtipo histológico la quimioterapia.

Los protocolos de RT contemplan la RT preoperatoria o neoadyuvante, y postoperatoria o adyuvante^{4,5,6-11}. Ambas opciones logran unos resultados similares en el control local tumoral y en la supervivencia del paciente. La RT neoadyuvante, generalmente requiere campos (cm²) y dosis (Gy) de RT menores^{6,8,9}. Las dosis radioterápicas mayores se asocian a peores resultados funcionales y más efectos secundarios locales. Por otro lado, algunas características tumorales tales como el tamaño, el grado histológico, la profundidad o la localización, se asocian a un peor pronóstico vital^{12,13}. Generalmente, la RT neoadyuvante se reserva para aquellos casos en los que las características tumorales prevén un peor control local⁶⁻⁸. A pesar de estas indicaciones, los protocolos de irradiación externa no están extendidos de forma sistemática y finalmente la decisión terapéutica se toma según el tipo de escuela o la experiencia del centro.

Actualmente, el uso de técnicas microquirúrgicas está ampliamente extendido en la reconstrucción de defectos funcionales (óseos o musculares) y de cobertura cutánea generados durante la resección quirúrgica oncológica^{5,14-18}. La tasa de éxito en procedimientos microquirúrgicos en tejidos no irradiados varía entre el 90 y el 99% según las series^{2,17,18-24,25}.



Figura 1. Imágenes intraoperatorias del tratamiento de un liposarcoma en zona glútea. Resección del mismo con disección y exposición del nervio ciático. Reconstrucción y cobertura mediante colgajo *deep inferior epigastric perforator (DIEP)*. Cortesía del Dr. Vélez (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona).

Existe una amplia controversia sobre si estos resultados se mantienen sobre campos previamente irradiados^{2,17-18}. Está ampliamente aceptado que la mayoría de fracasos en procedimientos microquirúrgicos se deben a fenómenos vasculares como la trombosis arterial, venosa o de ambos vasos^{2-6,8,10,12,26}. La utilización de terapias adyuvantes como la RT, modifica las características histológicas tumorales y del tejido circundante peritumoral^{14,15}. Estos cambios histológicos del tejido sano peritumoral incluyen su vascularización¹⁸. Este hecho aumenta la dificultad técnica y la utilización de métodos de reconstrucción microquirúrgica en lechos receptores que han sido expuestos a radioterapia.

Existe consenso en la literatura sobre la relación entre terapias neoadyuvantes (preoperatorias) y la cirugía amplia, sobre un aumento de la tasa de infecciones, aumento del riesgo de complicaciones intraoperatorias, retraso de la cirugía y aumento del tiempo de hospitalización, aunque no existe consenso a cerca de la tasa de necrosis total o parcial de los colgajos libres vascularizados²⁶⁻³².



Figura 2. Sarcoma partes blandas brazo proximal. Resección amplia del mismo. Cobertura mediante colgajo libre microvascular de dorsal ancho. Cortesía del Dr. Vélez (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona).



Figura 3. Evolución postoperatoria caso clínico figura 2. Necrosis del colgajo microvascular y dehiscencia de la herida quirúrgica. Curación mediante terapia de presión negativa. Cortesía del Dr. Vélez (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona).

A pesar de que trabajos experimentales han detectado menor permeabilidad en vasos previamente irradiados, la realidad es que en las series clínicas actuales existe

mucha variabilidad en cuanto a la tasa de supervivencia de los colgajos libres vascularizados. Es por ello que existe mucha controversia en este sentido³³⁻³⁹.

Halle et al. en 2009, realizan una profunda revisión de la literatura publicada hasta ese momento sobre la evolución de las técnicas microquirúrgicas en pacientes irradiados y determina que estos estudios presentan una serie de limitaciones metodológicas importantes²⁰. Ninguno de ellos obtiene una significación estadística a favor del aumento de las complicaciones postoperatorias en pacientes previamente irradiados e intervenidos microquirúrgicamente, pero sí se observa cierta tendencia subjetiva hacia esa hipótesis. Ante la sospecha de falta de potencia estadística, debido al bajo número de casos de cada serie, y a pesar de las diferencias metodológicas, realizan un metaanálisis con las series clínicas presentadas, y obtienen en esta situación significación estadística a favor de la hipótesis sugerida. También defienden que existen errores metodológicos en los estudios experimentales en ratas presentados previamente²³⁻²⁷. En cuanto a material y métodos, observan que, evaluando el cálculo muestral, los resultados obtenidos se pueden deber al azar. Además, destacan que el estudio de la relación entre la adyuvancia y la microsutura, en todos los casos se ha realizado con microanastomosis arterial, y no se ha estudiado el efecto de la adyuvancia con la microanastomosis venosa. Este es un dato de vital importancia, ya que se ha demostrado que del 5-10% de los flaps libres microvasculares que fracasan, la gran mayoría se atribuyen trombosis venosa³⁰⁻³⁵.

A pesar de la alta tasa de éxito en la utilización de técnicas microquirúrgicas en pacientes irradiados, existe un significativo grupo que varía del 6% al 14% de los mismos que sufren una complicación postoperatoria vascular, y que requieren reexploración quirúrgica urgente³⁰⁻³⁵. Cuando esto sucede, existe un mayor aumento

de la morbilidad del paciente y un mayor coste final para el sistema sanitario. Por lo que, ante las nefastas consecuencias que provoca el fracaso de una técnica reconstructiva microquirúrgica en un paciente tumoral, vista la falta de estudios experimentales bien diseñados metodológicamente, y ante la incongruencia de los resultados clínicos obtenidos hasta hoy, **creemos adecuado plantear la realización de un estudio experimental en ratas con la finalidad de objetivar las diferencias en las tasas de trombosis arterial y venosa entre ratas irradiadas y no irradiadas.**

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Sarcomas de partes blandas

Los sarcomas de partes blandas (SPB) son tumores malignos que se originan en el tejido conectivo en las partes blandas. Existen más de 50 subtipos diferentes de sarcoma, dependiendo del tipo de célula por el que están constituidos³⁰⁻³³. No obstante, poseen muchas características comunes, y por ello se agrupan bajo el término SPB, a efectos de estudiar sus factores pronósticos y analizar los resultados terapéuticos. Generalmente presentan un comportamiento agresivo local y una capacidad metastásica variable. El 60% de los pacientes con SPB debuta con una tumoración en una extremidad³⁰⁻³³.

[2.1.1 Epidemiología y factores de riesgo](#)

Los SPB son tumores poco frecuentes. Constituyen aproximadamente un 1% del total de tumores malignos, y son responsables del 2% de la mortalidad oncológica³⁰. Su incidencia estimada en España es de 2 casos nuevos al año por cada 100.000 habitantes. Los SPB son ligeramente más frecuentes en hombres que en mujeres, y pueden verse en todas las edades. La edad de mayor frecuencia en adultos se encuentra entre los 40 y 60 años. La gran mayoría de casos diagnosticados no están asociados a ningún factor de riesgo conocido. No obstante, en un pequeño número de casos pueden reconocerse factores predisponentes como la presencia de algunas raras enfermedades hereditarias, entre las que destaca la neurofibromatosis o enfermedad

de Von Recklinghausen, y la adyuvancia mediante radioterapia³¹⁻³³.

2.1.2 Aproximación diagnóstica

- ***Exploraciones radiológicas en el diagnóstico y la estadificación de los sarcomas de partes blandas de extremidades***

El método de elección en el diagnóstico y la estadificación local de una masa de partes blandas indeterminada o sospechosa de sarcoma es la resonancia magnética (RMN) con administración de contraste intravenoso³⁰.

En caso de que la RMN esté contraindicada, debería emplearse una tomografía computarizada (TC) con contraste intravenoso, preferiblemente con reconstrucciones adicionales en planos sagital y coronal^{30,31}.

Valoraciones a incluir en el informe radiológico

- Tamaño.
- Localización (superficial o profunda; compartimental o extracompartimental).
- Límites de la lesión.
- Relación con estructuras neurovasculares.
- Extensión del edema peritumoral.
- Patrón de captación de contraste.
- Sugerencias de áreas a biopsiar.

Es aconsejable realizar **radiografías** de la región afectada dado que permite evaluar la existencia de calcificaciones, acotar el diagnóstico diferencial e incluso establecer el diagnóstico en algunas entidades benignas³⁵⁻³⁷.

La realización de radiografías (antero-posterior/lateral) y TC de tórax con contraste intravenoso está indicada en todos los casos de SPB para descartar diseminación tumoral metastásica.

La TC abdominal está indicada en caso de liposarcoma mixoide, dada la alta frecuencia de lesiones a distancia sincrónicas en este subtipo histológico. Debe valorarse individualmente en cada caso el beneficio clínico de realizar una TC abdominal en casos de sarcoma epitelioide, sarcoma sinovial, angiosarcoma y leiomiomasarcoma³⁸.

Se debe valorar la realización de RMN de toda la columna en casos de liposarcoma mixoide, dada su tendencia a presentar metástasis extrapulmonares, especialmente vertebrales, ya que éstas son difíciles de detectar mediante gammagrafía ósea con tecnecio o incluso con tomografía por emisión de positrones (PET).

- ***Biopsia percutánea guiada por métodos de imagen en sarcomas de partes blandas***

El objetivo de la biopsia de los SPB es obtener el grado y el subtipo histológico antes de instaurar el tratamiento^{30,31,32}.

La utilización de técnicas radiológicas (ecografía, TC) como método de guía para realizar una biopsia con aguja gruesa ha mejorado sustancialmente su rendimiento diagnóstico, al permitir localizar con exactitud la lesión y dirigir la biopsia hacia las zonas del tumor más rentables para el diagnóstico y, así, evitar las áreas quísticas, necróticas o hemorrágicas^{30-32,40-44}.

El número de muestras (igual o superior a 4) y la longitud del cilindro obtenido en la biopsia con aguja gruesa son factores que aumentan la rentabilidad diagnóstica.

La estadificación local del tumor mediante RM, o en su defecto con TC, debe realizarse antes que la biopsia, ya que permitirá seleccionar las áreas del tumor en las que la biopsia puede ser más rentable y evita la distorsión de las características y la extensión del tumor en el estudio radiológico⁴²⁻⁴⁵ por la biopsia.

Es recomendable que la biopsia se realice en el hospital donde se tratará al paciente, y que se haga por radiólogos o cirujanos entrenados en realizar estos procedimientos. Es crucial también un trabajo en equipo con el patólogo que interpretará los resultados⁴⁶⁻⁴⁹.

- ***Enfermedad metastásica***

En la estadificación clínica y patológica de los SPB, se recomienda utilizar el sistema TNM (Tumor primario, Nódulos linfáticos regionales, Metástasis) (tabla 1) que incluye tamaño, grado, histología y localización del tumor³⁰⁻³³.

La radiografía simple de tórax y la TC abdominal (para sarcomas retroperitoneales, liposarcoma mixoide, sarcoma epitelioides, angiosarcoma y leiomiomasarcoma) se consideran pruebas de estadificación correctas para pacientes con enfermedad diseminada.

Si la enfermedad sólo afecta a los pulmones y es técnicamente resecable (menos de 5 nódulos), debería realizarse una TC de tórax para descartar la presencia de más lesiones.

La RMN o la gammagrafía ósea podrían estar indicadas en casos concretos.

Tabla 1. Clasificación TNM para sarcomas de partes blandas

Tumor Primario	Tumor primario que no puede evaluarse
TX	No hay evidencia de tumor primario
T0	Tumor >5 cm en su diámetro mayor
T1	T1a tumor superficial ^a T1b tumor profundo ^a
T2	Tumor >5 cm en su diámetro mayor T2a tumor superficial ^a T2b tumor profundo ^a
Nódulos linfáticos regionales	Nódulos linfáticos regionales no pueden evaluarse
NX	Sin metástasis en nódulos linfáticos regionales
N0	Metástasis en nódulos linfáticos regionales
N1	
Metástasis a distancia	Sin metástasis a distancia
M0	Metástasis a distancia
M1	
pTNM clasificación patológica	Las categorías pT y pN se corresponden con las categorías T y N

TNM: Tumor primario, Nódulos linfáticos regionales, Metástasis.

(a) El tumor superficial se localiza exclusivamente encima de la fascia muscular, sin llegar a invadirla; el tumor profundo se localiza bien exclusivamente debajo de la superficie de la fascia muscular o bien sobre la fascia invadiéndola o atravesándola. Sarcomas retroperitoneales, mediastínicos o pélvicos, se clasifican como tumores profundos.

Tabla 2. Grado histopatológico^b

TNM: Sistema de 2 grados	Sistema de 3 grados	Sistema de 4 grados
Grado bajo	Grado I	Grado I Grado II

Grado alto	Grado II		Grado III	
	Grado III		Grado IV	
Estadificación ^c				
Estadio IA	T1a	N0	M0	Grado bajo
	T1b	N0	M0	Grado bajo
Estadio IB	T2a	N0	M0	Grado bajo
	T2b	N0	M0	Grado bajo
Estadio IIA	T1a	N0	M0	Grado alto
	T1b	N0	M0	Grado alto
Estadio IIB	T2a	N0	M0	Grado alto
Estadio III	T2b	N0	M0	Grado alto
Estadio IV	Cualquier T	N1	M0	Cualquier grado
	Cualquier T	Cualquier N	M1	Cualquier grado

(b) El sarcoma de Ewing extraesquelético y los tumores neuroectodérmicos primitivos se clasifican como de grado alto. Si el grado no puede evaluarse, clasificarlo como grado bajo.

(c) Utilizar grado bajo para GX. Utilizar N0 por NX.

- **Diagnóstico anatomopatológico y molecular**

Consideraciones generales

Para una valoración correcta de la biopsia inicial y debido a que diferentes tipos de SPB tienden a aparecer en determinadas localizaciones o grupos de edad, el patólogo debe disponer de todos los datos clínicos y radiológicos del paciente: edad, tiempo de evolución, antecedente de neoplasias previas, localización, profundidad y tamaño del tumor⁵⁰⁻⁵⁴.

En los casos de pacientes previamente biopsiados y remitidos desde otros centros hospitalarios, se recomienda solicitar el material de biopsia y/o resección

(preferentemente bloques de parafina), así como el informe anatomopatológico, para revisión y confirmación histológica.

Para el diagnóstico de los tumores de partes blandas superficiales y menores de 2-3 cm puede ser válida la biopsia escisional. En los tumores de localización profunda y/o mayores de 5 cm se recomienda la biopsia cerrada (tru-cut) como procedimiento diagnóstico inicial. La biopsia abierta (incisional) debe usarse sólo en casos seleccionados³⁰⁻³³.

La punción aspirativa con aguja fina (PAAF) es rentable para el diagnóstico de los sarcomas de células redondas. En el resto de sarcomas está indicada principalmente para confirmar la presencia de recidiva o metástasis de un sarcoma ya conocido. Por lo tanto, salvo en centros con una gran experiencia, la PAAF no se recomienda como método diagnóstico inicial³⁰⁻³³.

Siempre que sea posible y no interfiera con el diagnóstico, se recomienda congelar fragmentos de tumor y conservarlos en el banco de tumores, así como tomar muestras para citogenética (improntas sobre portaobjetos preparados para inmunohistoquímica). Se trata de acciones importantes tanto para el diagnóstico (especialmente en tumores tratados mediante tratamientos neoadyuvantes), como para la investigación traslacional en sarcomas que requieren el consentimiento informado del paciente. Para una buena preservación del tejido tumoral, el intervalo transcurrido entre la toma de biopsia y la congelación no debe ser superior a 30 minutos. Dicho de otro modo, cuando sea posible hay que enviar todo el material desde el quirófano como si se tratase de un estudio intraoperatorio^{46,52-57}.

El diagnóstico anatomopatológico de los SPB se basa principalmente en la morfología y la inmunohistoquímica. El diagnóstico del tipo histológico debe realizarse

de acuerdo a la clasificación de los sarcomas publicada por la Organización Mundial de la Salud en 2002, que integra datos morfológicos, inmunohistoquímicos, citogenéticos y moleculares¹⁹. El grado se establece mediante la evaluación de 3 parámetros histológicos: la diferenciación tumoral, el índice mitótico y el porcentaje de necrosis. En nuestro medio, y por tener mayor reproducibilidad, se recomienda utilizar los criterios de la Federación Nacional de Centros de Lucha contra el Cáncer de Francia, que distinguen 3 grados de malignidad. En algunos sarcomas, el tipo histológico define por sí mismo la agresividad del tumor y el grado no aporta información o pronóstico adicional. Los estudios de inmunohistoquímica permiten determinar el tipo de diferenciación tumoral (muscular, neural, etc.) y descartar otros tipos de tumores que no son mesenquimales (carcinoma, melanoma o linfoma), pero en ningún caso dan información acerca de la benignidad o la malignidad del tumor⁵⁸⁻⁶³.

Si a pesar del estudio morfológico e inmunohistoquímico no puede establecerse un diagnóstico, puede estar indicado el estudio molecular. Su objetivo habitual, en el caso de los SPB, es hallar la presencia de translocaciones cromosómicas y sus fusiones génicas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en transcriptasa inversa (RT-PCR) o hibridación in situ fluorescente (FISH). La utilización de técnicas moleculares no es imprescindible para el diagnóstico de todos los casos de sarcomas. Algunas indicaciones son: aparición de una variante morfológica poco habitual de un sarcoma (p. ej., un sarcoma sinovial pobremente diferenciado con una morfología de células redondas); aparición de un sarcoma de aspecto morfológico habitual, pero en una edad y/o localización anómalas; o detección de mutaciones puntuales en genes clave para la señalización celular. El grupo español de investigación en sarcomas (GEIS) y la Sociedad Española de Anatomía Patológica disponen de

listados de centros de referencia para cada tipo de estudio molecular³⁰. Conforme a la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, puede ser necesario contar con el consentimiento informado del paciente para realizar estudios moleculares.

Biopsia tru-cut

La biopsia por aguja (tru-cut) es el método recomendado actualmente, porque resulta poco invasivo y no dificulta actuaciones quirúrgicas posteriores. El papel de la biopsia por aguja es documentar la presencia de malignidad, establecer si la lesión es mesenquimal y descartar que se trate de un carcinoma metastásico, melanoma o linfoma. En los tumores mesenquimales permite clasificar el tumor (tipo histológico) y proporcionar el grado. Debido a la limitación de la muestra, en ocasiones no es posible establecer con seguridad un diagnóstico histológico. En estas situaciones puede ser necesaria una biopsia incisional. Por otro lado, los SPB son tumores heterogéneos y en una muestra pequeña puede infravalorarse el grado histológico. De este modo, a no ser que aparezca un alto grado obvio en la biopsia por aguja, el grado histológico definitivo se establece en la pieza quirúrgica⁶³⁻⁶⁸.

En el informe anatomopatológico de una biopsia tru-cut de un sarcoma deben constar: el tipo histológico (cuando esto no es posible, puede ser útil intentar clasificar en las categorías de pleomórfico, fusocelular, mixoide o de células redondas), el grado histológico (con la salvedad expresada en el párrafo anterior) y el resultado de las pruebas complementarias que se hayan llevado a cabo (inmunohistoquímica y/o biología molecular)^{20,21}.

Piezas de resección

A partir de la pieza de resección, y de manera adicional respecto a la biopsia tru-cut, el patólogo debe aportar la información siguiente²⁰⁻²²:

-Descripción macroscópica de la pieza quirúrgica: medidas, procedimiento quirúrgico (biopsia escisional, exéresis simple, resección local amplia/compartimental, amputación), identificación de los tejidos (piel, tejido celular subcutáneo, fascia, músculo, vasos, nervios, hueso) y de los órganos afectados en tumores toraco-abdominales, pélvicos o retroperitoneales, e identificación de la zona de biopsia previa.

-Descripción del tumor: tamaño, localización, aspecto, color, presencia de necrosis y/o hemorragia (porcentaje aproximado), invasión de estructuras vecinas (vasos, nervios, hueso).

-Márgenes de resección: la mayoría de las piezas contienen 6 márgenes (superficial/profundo, proximal/distal y medial/lateral). Debe medirse la distancia del tumor a los márgenes y especificar los que se encuentran a menos de 2 cm. Se debe señalar si un margen está constituido por una fascia, periostio o adventicia de un vaso. También deben especificarse los márgenes en las piezas de resección de metástasis.

-Nódulos satélite y distancia al tumor principal.

-Ganglios linfáticos: la afectación ganglionar es poco frecuente en los SPB, salvo en algunos tumores, como sarcoma epiteliode, sarcoma sinovial y angiosarcoma.

Debe realizarse un muestreo adecuado. En general se recomienda una sección por cada centímetro de tumor. En tumores muy grandes es suficiente con un total de 10-12 bloques. Las secciones correspondientes a los márgenes deben tomarse perpendicularmente a ellos. Si un margen se encuentra a más de 5 cm no es necesario incluirlo, excepto si se trata de un sarcoma epitelioides o de un angiosarcoma, porque estos tumores tienen una tendencia mayor a ser multicéntricos o contar con nódulos satélites^{30-33,61-67}.

El informe anatomopatológico de las piezas de resección por SPB debe incluir: procedimiento quirúrgico, localización y profundidad del tumor, tamaño, tipo y grado histológico, estado de los márgenes de resección, e invasión de estructuras adyacentes y afectación ganglionar si la hay. En los tumores tratados con quimioterapia y/o radioterapia neoadyuvante se recomienda incluir una valoración de la respuesta al tratamiento (porcentaje de necrosis), con sistemas basados en los empleados en los sarcomas óseos²³.

En caso de que se hayan realizado, deben incluirse los resultados de los estudios complementarios (inmunohistoquímica, FISH, RT-PCR).

2.2 Tratamiento de los sarcomas de partes blandas

2.2.1 Tratamiento de la enfermedad localizada

- **Cirugía del tumor primario**

Biopsia

En el caso en que se considere necesario realizar una biopsia incisional en lugar de una biopsia con aguja gruesa, la biopsia la realizará el mismo equipo quirúrgico que llevará a cabo la cirugía definitiva. En caso de que el paciente se vaya a derivar a un centro de referencia, no se debe realizar la biopsia⁶⁶.

En los casos raros en que se indique la biopsia incisional o escisional, ésta debe realizarse en el trayecto de la cirugía definitiva. La incisión debe ser longitudinal al eje del miembro, y si se piensa dejar drenaje, este debe estar en la línea de la incisión definitiva con el objeto que pueda researse posteriormente. El abordaje quirúrgico debe atravesar sólo un compartimento. No se debe realizar una disección intermuscular para llegar a la lesión, ya que la contaminación sería importante⁶⁸⁻⁷⁰.

Cirugía

Se realizará cirugía conservadora del miembro. Únicamente se planteará la posibilidad de amputación cuando no sea posible conseguir márgenes amplios y/o de reconstrucción funcional del miembro⁷¹⁻⁷⁵.

Las etapas fundamentales de la cirugía conservadora son la **resección del tumor**, la **reconstrucción** y la **cobertura de las partes blandas**. La primera fase es la parte oncológica del procedimiento, que debe ser independiente de las siguientes fases y nunca debe ser influida por ellas. La resección se realiza según los márgenes

quirúrgicos oncológicos adecuados para cada tumor. Los márgenes se definen como: **intralesional, marginal, amplio y radical**. El margen debe ser amplio o radical. Se considera margen amplio a aquel que es mayor de 1 cm o que incluye una barrera anatómica indemne (fascia muscular, periostio o perineuro)⁷⁶⁻⁷⁸.

Para llevar a cabo la cirugía no se debe realizar expresión del miembro con venda de Smarch para exanguinar, sino que se debe dejar el miembro en elevación durante 10 minutos y, posteriormente, inflar manguito de isquemia. La herida quirúrgica se realizará longitudinalmente al eje del miembro (no se harán incisiones transversales)⁷⁶⁻⁷⁸.

Si se ha realizado una incisión previa (biopsia o resección inadecuada), se debe reseca todo el trayecto de la biopsia y el trayecto del drenaje (por ello, es importante que el drenaje se coloque en el mismo trayecto de la incisión y lo más cercano a ella)^{75,76}.

Tras la resección del tumor, se debe realizar una hemostasia cuidadosa. Si se ha colocado un manguito de isquemia, se debe soltar y realizar la hemostasia previamente al cierre definitivo de la herida. Se realizará entonces un cambio de guantes y de instrumental quirúrgico, y se procederá a la realización de biopsias intraoperatorias de las zonas más conflictivas y dudosas, dejando clips vasculares de titanio en las zonas más conflictivas para planificación de la radioterapia. Además, se debe revisar la pieza macroscópicamente con el patólogo y asistirle en la orientación de ella y en las zonas de duda, aportando las pruebas de imágenes más demostrativas junto con la pieza tumoral. Se debe marcar la pieza tumoral (proximal, distal, etc.) con puntos de seda o grapas, y describir claramente estas marcas en la hoja de anatomía patológica^{75,76}.

La reconstrucción de los tejidos blandos, posterior a la resección, es fundamental. En el caso que sea difícil o imposible se debería replantear y cuestionar la cirugía conservadora⁷⁴⁻⁷⁸.

El lecho de implantación de los diferentes tipos de reconstrucción tiene que ser adecuado, con una buena vascularización y una adecuada cobertura muscular⁷⁴⁻⁷⁸.

Las técnicas de cirugía plástica, como son la transposición de los músculos gemelos, del músculo dorsal ancho, los injertos libres o pediculados de piel o músculo-cutáneos, colaboran en la cobertura de los diferentes tipos de reconstrucción y en el cierre sin tensión de la herida, lo que contribuye de manera significativa a la disminución de la morbilidad⁷⁸⁻⁸⁹.

- **Cirugía inadecuada en sarcomas. Recidiva local**

Introducción

A pesar del consenso internacional existente sobre la necesidad de que los SPB sean tratados en un centro experto en sarcomas²⁴, tal como se ha comentado anteriormente, según estadísticas del registro del GEIS, en España el 50% de los SPB mayores de 5 cm son intervenidos sin el diagnóstico previo de sarcoma. De esta manera, el tratamiento de estas neoplasias, de por sí complejo, se ve con demasiada frecuencia muy dificultado. Si bien hay controversia sobre la trascendencia que una recurrencia local puede tener en la supervivencia, está claro el seguro menoscabo funcional, sufrimiento físico y psicológico que se derivará de una segunda cirugía o incluso una amputación³⁰⁻³⁵.

Información clínica

Al recibir a un paciente tratado mediante cirugía inadecuada se debe intentar recabar el máximo de información: los cristales con cortes histológicos para la revisión anatomopatológica del caso; las pruebas radiológicas realizadas anteriores a la cirugía que nos permitirán conocer la localización anatómica del tumor e intentar la ampliación de márgenes quirúrgicos; y la hoja operatoria (o, en su defecto, se contactará directamente con el cirujano que realizó la intervención anterior) para recabar información sobre la intervención. Además, se solicitará una RMN al recibir al paciente con la finalidad de detectar recidivas tempranas o restos tumorales que puedan quedar de la cirugía previa⁴⁵⁻⁴⁹.

Tratamiento

La actitud terapéutica variará de acuerdo con la situación con la que nos encontremos²⁵:

1. En un sarcoma de grado I con informe anatomopatológico de “márgenes no afectados”, pero sin precisar la naturaleza y la dimensión de dichos márgenes, se aconseja sólo valorar la indicación de radioterapia postoperatoria.

2. En un sarcoma de grado I con informe anatomopatológico de “márgenes afectados” se aconseja cirugía de ampliación de márgenes quirúrgicos y valorar después la indicación de radioterapia postoperatoria.

3. En un sarcoma de grado II o III no considerado con seguridad amplia según los criterios de Enneking^{11,26}, se aconseja cirugía de ampliación de márgenes y radioterapia postoperatoria.

Recurrencia local

Aconsejamos cirugía con márgenes de resección amplia según los criterios de Enneking²⁶, o amputación si cumple cualquiera de los criterios para ella. No se aconseja radioterapia postoperatoria si el paciente la recibió con anterioridad.

Amputación

Los criterios clásicos de amputación²⁷ (localización en más de un compartimento, afectación del paquete vascular o de un nervio principal), aunque deben tenerse en cuenta, pueden cuestionarse en muchos casos. La mejora en las técnicas quirúrgicas con la utilización de injertos vasculares, las reconstrucciones de defectos masivos por parte de microcirugía pueden conseguir resultados satisfactorios en términos de control local. Antes de plantear la amputación, siempre se debe contar con la opinión de un cirujano experto en técnicas reconstructivas que valore la posibilidad de una cirugía conservadora⁴²⁻⁴⁹.

2.3 Radioterapia asociada a sarcomas de partes blandas

2.3.1 Recomendaciones en SPB de extremidades

Las recomendaciones que se exponen a continuación se basan en las del Grupo de Sarcomas de la Sociedad Española de Oncología Radioterápica (SEOR) y del GEIS³⁰.

- **Los objetivos de la radioterapia en el tratamiento de los SPB son:**
 - Control locorregional, evaluado mediante la supervivencia libre de recidiva locorregional y la supervivencia causa-específica.
 - Preservación funcional, evaluada mediante la aparición de complicaciones locales o secuelas funcionales, como linfedema, fibrosis, radionecrosis cutánea, fractura ósea o déficit funcional⁹⁰.
- **De acuerdo con la presentación clínica y los estudios iniciales de evaluación, los pacientes pueden asignarse a una de las categorías siguientes:**
 - Tumores de grado bajo (Estadio I).
 - Tumores de grado alto (Estadios II y III) resecables.
 - Tumores irresecables.
 - Recidiva local.

En la [tabla 3](#) se resumen las recomendaciones sobre la realización de radioterapia en función de las categorías mencionadas.

Tabla 3. Recomendaciones para la radioterapia en función del estadio

Categoría	G-TNM	Condiciones	GEIS / GS-SEOR
Estadio I reseccable	T1a-T1b N0 M0	Márgenes >1cm o Plano fascial	No
	Grado bajo	Márgenes <1cm	RT adyuvante opcional
	T2a-T2b N0 M0	Márgenes >1cm o Plano fascial	RT adyuvante opcional
	Grado bajo	Márgenes <1cm	RT adyuvante
Estadio II reseccable	T1a-T1b-T2a N0 M0 G.	Márgenes >1cm	RT adyuvante opcional
	moderado-alto	Márgenes <1cm	RT adyuvante
Estadio III reseccable	T2b N0 M0	-	RT adyuvante
	G. moderado-alto	-	RT paliativa en
	M1 (multimetastásico)	-	pacientes sintomáticos
Recidiva local	-	No RT previa	RT adyuvante
	-	RT previa	Valoración individual

Tabla 3. Recomendaciones en la terapia adyuvante según el estadiaje de la enfermedad.
RT: radioterapia (adyuvante o neoadyuvante según protocolo de cada centro).

2.3.2 Técnica de radioterapia

La técnica de irradiación (disposición de campos) y la energía de la radiación deben adaptarse al caso individual. No pueden establecerse reglas generales, salvo en los puntos siguientes:

1. La radioterapia debe ser tan conformada como sea posible con las técnicas disponibles en cada centro. Es recomendable disponer de un estudio dosimétrico tridimensional basado en imágenes de TC y completado con imágenes de RMN. En la radioterapia postoperatoria es útil contar con estudios de imagen preoperatorios.

2. La adquisición de las imágenes de TC deberá realizarse cada 3 mm al menos, para conseguir radiografías digitales reconstruidas de suficiente calidad.

3. Para poder realizar fusión con las imágenes diagnósticas de RMN, es necesario que ambas exploraciones radiológicas incluyan la pelvis, lo que permite

realizar la fusión con garantías de precisión. Sería conveniente que la RMN se realice con la misma inmovilización que el tratamiento radioterápico.

4. La extremidad debe inmovilizarse de un modo efectivo y reproducible.
5. No debe irradiarse la circunferencia completa de un miembro.
6. Debe respetarse parte de la sección de los huesos largos siempre que sea posible.
7. Deben respetarse las articulaciones, siempre que sea posible.
8. Los tumores grandes y de grado alto se deben tratar con campos más grandes que los tumores pequeños y de grado bajo.
9. El tejido subcutáneo y la piel no se encuentran en riesgo de infiltración tumoral, salvo que el tumor asiente en ellos o hayan sido transgredidos por maniobras diagnósticas o terapéuticas.

2.3.3 Volúmenes de tratamiento

Los SPB tienden a diseminarse a lo largo de los planos musculares y tendinosos, respetando las fascias, membranas interóseas y periostio, barreras naturales de contención de la diseminación del tumor. Por tanto, los márgenes longitudinales deben ser más amplios que los radiales. Las recomendaciones aquí formuladas se aplican a los tumores de grado moderado/alto. Es posible que estos márgenes puedan reducirse en tumores de grado bajo⁹⁰⁻⁹².

En la radioterapia preoperatoria, el volumen blanco clínico (CTV, del inglés *Clinical Target Volume*) inicial (CTV1) debe incluir el volumen tumoral (VT definido sobre imágenes de RMN en secuencias T1 con gadolinio), el edema peritumoral (definido sobre imágenes de RMN en secuencias T2) y un margen adicional de 1,5-2

cm. Si no pudiera evaluarse el edema peritumoral, los márgenes en torno al VT definido mediante secuencias T1 debe ser de 2 cm radial y 5 cm longitudinalmente. En caso de que el margen radial sobrepase un plano fascial, debe quedar limitado por este. En caso de que el margen longitudinal sobrepase los límites de un compartimento anatómico, debe quedar limitado por las inserciones tendinosas, con un margen adicional no mayor de 2 cm⁹³⁻⁹⁵.

El volumen blanco de planificación (PTV) debe tener en cuenta las incertidumbres geométricas en la administración del tratamiento. Por ser estas dependientes de las técnicas de inmovilización y de la experiencia del personal técnico en cada centro, no pueden concretarse recomendaciones generales. Al menos debe añadirse un margen de 0,5 cm al CTV para generar el PTV. Se encuentran en curso estudios para evaluar la seguridad de márgenes de CTV inferiores a los especificados en la radioterapia preoperatoria^{30-32,90-96}.

En la radioterapia postoperatoria, no hay propiamente volumen tumoral (VT). Sin embargo, la definición de un área de riesgo alto puede facilitar la definición de los volúmenes subsiguientes. En el área de riesgo alto debe incluirse el lecho quirúrgico, definido con la ayuda de imágenes de RMN postoperatoria (las secuencias T2 pueden identificar tejidos con cambios inducidos por la cirugía y las imágenes de TC pueden identificar clips metálicos) y de RMN preoperatoria, la cicatriz cutánea y los trayectos de drenajes quirúrgicos. En caso de presentarse un hematoma o linfocele, deben incluirse en el área de riesgo alto. En caso de linfadenectomía, el lecho quirúrgico de ésta se considerará también área de riesgo alto. El CTV debe incluir el área de riesgo alto con márgenes longitudinales de 5 cm⁴⁵ y radiales de 2 cm, limitados por barreras

anatómicas naturales (planos fasciales y planos óseos). Es práctica habitual administrar una dosis más alta al área de riesgo alto, para lo que debe definirse un CTV2 que incluya la misma con un margen de 2 cm. Al menos un margen de 0,5 cm debe añadirse al CTV para generar el PTV. Se encuentra en curso un ensayo fase III para comparar márgenes reducidos (1,5 cm longitudinal-2 cm radial), frente a márgenes estándar (5 cm longitudinal-3 cm radial) en radioterapia postoperatoria⁹⁰⁻⁹⁸.

Recomendación: la planificación geométrica de la radioterapia debe hacer un uso intensivo de las imágenes médicas, particularmente de la RMN preoperatoria y postoperatoria, y de la TC de simulación.

2.3.4 Dosis de radiación

La dosis prescrita en la radioterapia adyuvante se ha determinado empíricamente a partir de estudios retrospectivos. Hay pocos datos acerca de la respuesta de la dosis para orientar la prescripción en cada situación concreta, por ejemplo, en función del estado de los márgenes quirúrgicos^{45,46}.

La dosis debe especificarse de acuerdo con las recomendaciones de la Comisión Internacional de Medidas y Unidades Radiológicas (ICRU, en sus siglas en inglés), es decir, en el punto ICRU, punto incluido en el PTV y que representa la dosis recibida por la mayor parte del volumen PTV. Generalmente, este punto se encuentra situado en la intersección de los ejes centrales de los haces de radiación. Es recomendable la aceptación de planes dosimétricos ajustados a las recomendaciones de homogeneidad ICRU: la dosis en todos los puntos del PTV debe oscilar entre -5 y +7% de la dosis prescrita. La dosis prescrita quedará condicionada por la tolerancia de los tejidos

normales anejos al PTV, por lo que será frecuente realizar prescripciones adaptadas a situaciones particulares⁹⁰.

2.3.5 Radioterapia preoperatoria

La dosis en el PTV1 empleadas más comúnmente son 50 Gy en fraccionamiento convencional (1,8-2 Gy). En caso de márgenes de resección positivos (resección R1), la dosis de radioterapia postoperatoria en el PTV2 prescrita comúnmente es de 16 Gy. Algunos estudios recientes ponen en duda la necesidad de este segundo tratamiento⁴⁷. En los estudios de asociación de quimioterapia a la radioterapia preoperatoria se han empleado dosis de radiación ligeramente más bajas: 44 Gy^{48,49,90-95}.

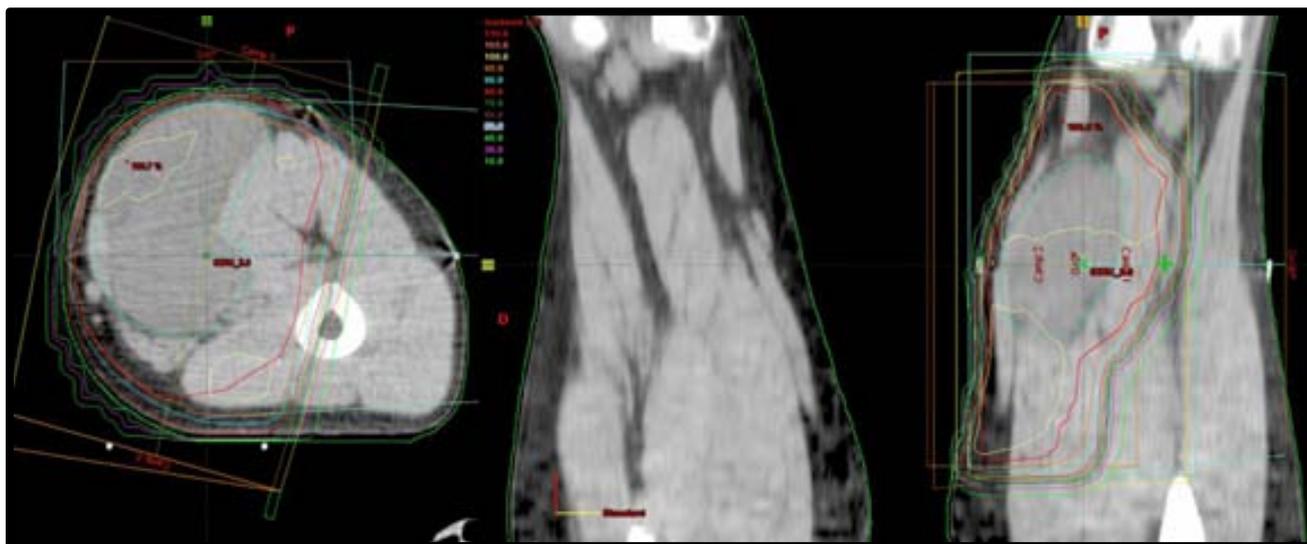


Figura 4. Planificación de tratamiento mediante radioterapia neoadyuvante en un paciente afecto de liposarcoma mixoide en muslo. Cortesía de la Dra. Vergés (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona).

2.3.6 Radioterapia postoperatoria

Las dosis empleadas más comúnmente en el PTV1 son 45-50 Gy y en el PTV2 de 60-66 Gy. Los valores más bajos se prescriben sobre tumores de grado bajo con márgenes quirúrgicos negativos y los valores más altos se prescriben sobre tumores de grado alto con márgenes quirúrgicos microscópicos positivos o escasos (<1 cm). En

caso de afectación macroscópica de los márgenes de resección y ante la imposibilidad clínica o técnica de ampliarlos quirúrgicamente, la dosis total recomendada es de 70 Gy. Se emplea habitualmente fraccionamiento convencional (1,8-2 Gy)^{50,51,90-95}.

2.3.7 Braquiterapia

La mayor experiencia en el tratamiento de los SPB se concentra en el tratamiento con radioterapia externa. El tratamiento con braquiterapia presenta varias ventajas frente a la radioterapia externa: la delimitación en el acto operatorio del CTV con precisión; la administración de una dosis uniforme y con dosis por fracción superior a la de la radioterapia externa (3-4 Gy), lo que mejora la eficacia biológica del tratamiento; la reducción del tiempo total de tratamiento al administrarse la braquiterapia durante el tiempo de estancia postoperatoria del paciente; y finalmente, la mayor protección de tejidos sanos, al presentar una rápida caída de la dosis en cuanto nos alejamos del implante⁹⁷⁻⁹⁹.

Los criterios de selección para realizar un tratamiento con braquiterapia como monoterapia son pacientes con SPB completamente resecaos, de grado intermedio o alto y con bordes negativos (RO)⁹⁷⁻¹⁰⁰.

El tratamiento con braquiterapia asociado a radioterapia externa disminuye el porcentaje de recidivas locales en pacientes con SPB, y resulta más eficaz en pacientes con factores desfavorables, como en el caso de márgenes positivos⁵⁸. Los candidatos a tratamiento de braquiterapia asociada a radioterapia externa son pacientes con SPB de grado intermedio o alto con márgenes negativos o positivos, pacientes con infiltración inicial de la piel, pacientes en los cuales no es posible cubrir perfectamente el CTV por el implante con total garantía para una monoterapia, o

pacientes con sospecha de contaminación del campo quirúrgico por rotura intraoperatoria del tumor^{59,99-100}.

La dosis de braquiterapia se ha extrapolado de los tratamientos de tasa de dosis baja y calculado mediante el modelo lineal cuadrático^{60,61}. En los tratamientos de monoterapia se recomienda administrar una dosis equivalente a 45-50 Gy de tasa baja que, trasladada a tasa alta, representaría una dosis equivalente a 32 Gy en 8 fracciones de 4 Gy. En el tratamiento de braquiterapia como *boost* en tasa baja se recomienda administrar una dosis de 15-25 Gy, seguida de una dosis de radioterapia externa de 45-50 Gy. En los tratamientos de tasa alta en SPB como *boost* hay una cierta variabilidad de dosis, teniendo en cuenta que los dos parámetros que conforman la prescripción son la dosis por fracción y el número de fracciones. El HDR *Brachytherapy Working Group* recomienda una dosis de braquiterapia de tasa alta como *boost* de 18 Gy administrada en 6 fracciones de 3 Gy en caso de R0 o R1, y de 21 Gy en 7 fracciones si R2. La dosis se prescribe a 0,5 cm de las fuentes y cada fracción debe separarse de la anterior en más de 8 horas⁶². La dosis de radioterapia externa deberá estar en el rango de 45-50,4 Gy. Aunque no hay estudios aleatorizados en SPB de tasa alta comparada con tasa baja, en algún estudio comparativo se señala una tasa menor de complicaciones (grados 2-4 del *National Cancer Institute*) de la herida quirúrgica en los pacientes tratados con tasa alta del 18, frente al 40% de los tratados con tasa baja en la misma institución⁶³.

Recomendación: la braquiterapia es un tratamiento eficaz en el control local de la enfermedad, y su principal ventaja es la reducción del volumen irradiado y, por tanto, de las complicaciones.

2.3.8 Tratamiento neoadyuvante: quimioterapia y quimiorradioterapia neoadyuvante

Los criterios que definen al grupo de pacientes con riesgo alto de recaída local o sistémica son la presencia de sarcomas de grado alto, localización profunda y tamaño superior a 5 cm⁶⁹. Algunos estudios que han analizado el impacto de la quimioterapia neoadyuvante en sarcomas de riesgo alto indican que esta tiene una eficacia superior a la observada en la enfermedad diseminada. Sin embargo, en un ensayo aleatorizado, la quimioterapia neoadyuvante no demostró beneficio en comparación con la cirugía sola⁷⁰. Por su parte, en un ensayo clínico aleatorizado en pacientes con sarcomas de extremidades que cumplían criterios de riesgo alto⁷¹, la radioterapia preoperatoria mostró un beneficio discreto sobre la supervivencia en comparación con la radioterapia postoperatoria, aunque con una tasa significativamente superior de complicaciones en la cicatrización de la herida^{94,95}.

Algunos estudios más recientes han evaluado la administración concomitante de quimioterapia y radioterapia preoperatoria. En un estudio de fase III se comparó la administración de doxorrubicina intraarterial frente a intravenosa asociada a radioterapia en pacientes con sarcomas de extremidades, sin que se demostrara un beneficio de la administración intraarterial. En un estudio de fase I se demostró la viabilidad de administrar doxorrubicina asociada a radioterapia⁷². De los 22 pacientes que recibieron doxorrubicina combinada con radioterapia preoperatoria estándar y que posteriormente fueron sometidos a cirugía, 11 pacientes mostraron una necrosis tumoral de al menos el 90% y, entre ellos, 2 pacientes presentaron ausencia de tumor viable^{72,94,95}.

En dos estudios se ha explorado el tratamiento con el régimen MAID intercalado con la radioterapia en dos fases de 22 Gy, para evitar la toxicidad de la

doxorrubicina. En el primero de ellos, de los 48 pacientes tratados en todos los casos se pudo realizar cirugía conservadora y la mediana de necrosis tumoral fue del 95%; tanto la toxicidad hematológica como local fue importante en todos los casos⁷³. En otro estudio de diseño similar del *Radiation Therapy Oncology Group* las conclusiones fueron similares^{48,94,95}.

El tratamiento con quimioterapia o quimiorradioterapia neoadyuvante previo al tratamiento quirúrgico definitivo de la enfermedad local debe considerarse como una estrategia en investigación en pacientes con enfermedad resecable.

2.4 Reconstrucción asociada a sarcomas de partes blandas

La cirugía reconstructiva debe contemplarse siempre y desde un inicio en el tratamiento de un SPB.

2.4.1 Objetivos

- **Garantizar márgenes oncológicos negativos.**
- **Proporcionar la máxima calidad de vida a los pacientes:** la reconstrucción primaria está destinada a salvaguardar órganos, funciones, extremidades y, en definitiva, a preservar la apariencia física, pero también está destinada a facilitar los tratamientos de radioterapia y quimioterapia^{29,30}.

2.4.2 Métodos reconstructivos

- **Cobertura cutánea**

Ya sea por afectación tumoral directa, para conseguir unos márgenes adecuados por proximidad del tumor, o porque para la extirpación tumoral haga falta una amplia disección cutánea que deje la piel desvascularizada, en muchas ocasiones la piel debe extirparse ampliamente⁷⁰⁻⁷⁸.

Todos los métodos reconstructivos deben estar disponibles para el tratamiento de los SPB. De una menor a mayor complejidad, estos métodos incluyen³¹:

1. *Cierre simple.*
2. *Cierre simple + malla u otros materiales sintéticos reabsorbibles o no.* Se utiliza para contener vísceras o proporcionar consistencia de pared (pared abdominal, pelvis, tórax, bóveda craneal).

3. *Injerto cutáneo*. Tendrá especial indicación en tumores superficiales, de bajo grado y extensos que no dejen al descubierto elementos donde el injerto no puede prender, como hueso denudado de periostio, tendón denudado de vaina o paratendón. Es cuestionable la realización de un injerto en zonas donde sabemos que deberán recibir radioterapia complementaria, especialmente si estas zonas serán objeto de traumatismo continuado (p. ej., las zonas de carga “pie” y las pararticulares sometidas a movimientos de flexo-extensión)⁷⁰⁻⁷⁵.

4. *Colgajos locales*. Son procedimientos en general adecuados para pequeños y medianos defectos no subsidiarios de cierre directo ni de injerto cutáneo. Dentro de los colgajos locales deberemos escoger el más fiable para cada ocasión y que, al mismo tiempo, cubra las mejores expectativas funcionales y estéticas. Los colgajos “perforantes” son, en general, una excelente opción⁷²⁻⁷⁸.

5. *Colgajos a distancia*. Entendemos por colgajo a distancia el uso de un tejido con finalidad reconstructiva obtenido de un lugar distante del punto a reconstruir. Existen pediculados o libres⁸⁴⁻⁸⁹.

En general, los colgajos libres son los que cubren mejor las expectativas en el tratamiento de los SPB. Son adecuados para zonas de carga, pararticulares, o moderados y grandes defectos de las extremidades, tórax y abdomen, e imprescindibles en la mayoría de procedimientos complejos de cabeza y cuello y de la base del cráneo^{34,75-79}. Hay un gran abanico de posibilidades y, como regla general, elegiremos el colgajo más fiable y que al mismo tiempo cubra los requerimientos funcionales y estético³⁵. **Los colgajos libres tienen la ventaja de tener una**

vascularización propia, con un período de curación de herida breve que posibilita una radioterapia y quimioterapia a dosis e intervalos adecuados.

2.4.3 Reconstrucción vascular

Es posible la reparación primaria de los ejes vasculares de las extremidades para evitar la amputación por afectación de un eje importante³⁶. Esta reconstrucción puede ser autóloga o con material sintético^{37,80-86}.

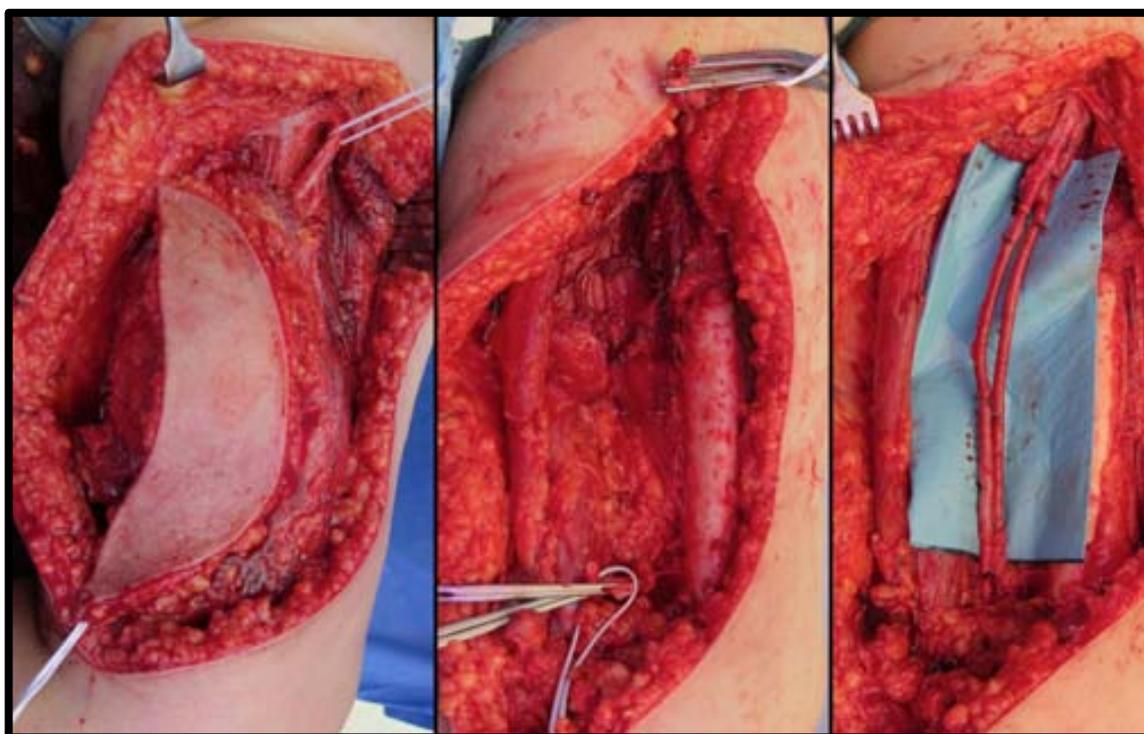


Figura 5. Resección de un liposarcoma mixoide en muslo que incluía el paquete neurovascular femoral. Reconstrucción vascular autóloga mediante bypass con injerto de vena safena. *Cortesía Dr. Pérez y Dr. Vélez (Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona).*

2.4.4 Reconstrucción nerviosa

En los principales nervios de las extremidades la reconstrucción nerviosa tiene, por lo general, unos resultados malos desde el punto de vista motor, aunque pueden aportar una sensibilidad protectora. Por otra parte, existen los procedimientos reparadores mediante trasferencias tendinosas y modificaciones osteoarticulares,

especialmente indicados en la extremidad superior. En determinados casos, se plantea el colgajo muscular con anastomosis motora^{39,84}.

2.4.5 Reconstrucción ósea

La reconstrucción ósea está ampliamente documentada en los sarcomas de las extremidades mediante prótesis y aloinjertos óseos de banco. Recientemente, la asociación de colgajos óseos vascularizados de peroné en combinación con homoinjertos de banco se ha mostrado eficaz, y se han conseguido consolidaciones más rápidas^{40,85,87-89}.

La reconstrucción exclusiva con peroné o cresta ilíaca vascularizada está ampliamente demostrada como útil en cabeza y cuello y en extremidades, sobre todo la superior^{41,42,82-88}.

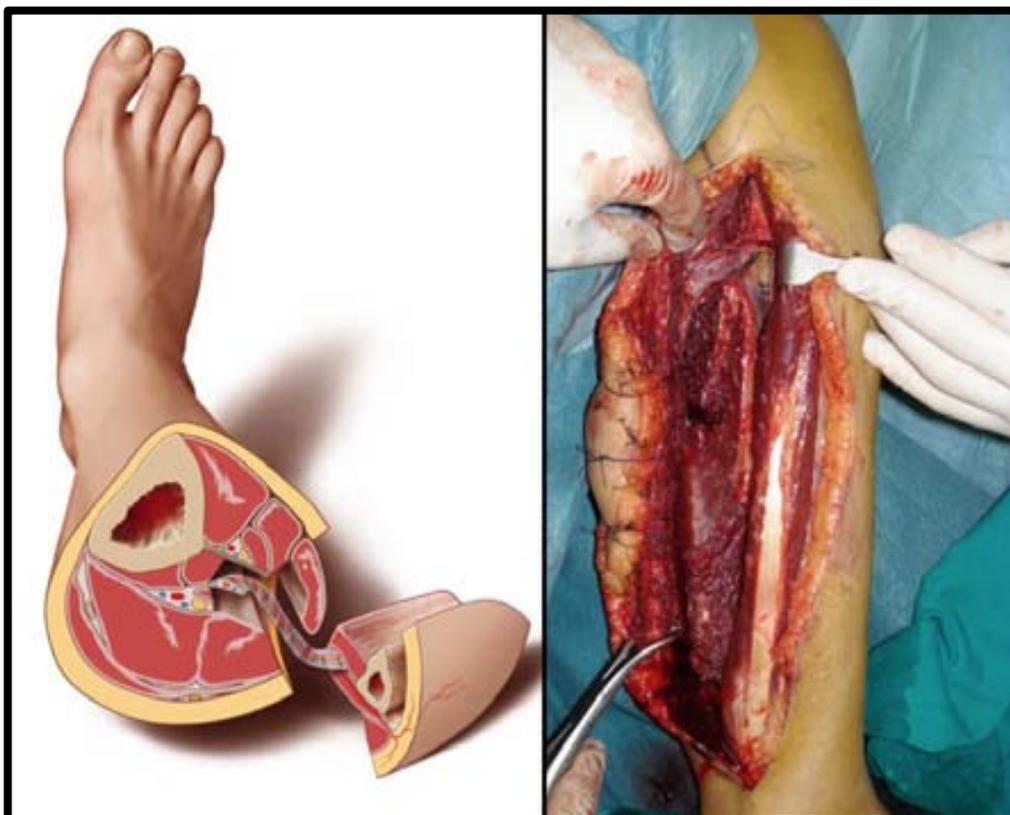


Figura 6. Colgajo óseo vascularizado (peroné). A la izquierda observamos un esquema de la disección del mismo, y a la derecha observamos una fotografía intraoperatoria de la disección de los vasos peroneos. Cortesía Dr. Llusa y Dr. Lluch (Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona).

2.5 Radioterapia asociada a reconstrucciones microvasculares en el tratamiento de los sarcomas partes blandas

Los protocolos de irradiación externa contemplan la irradiación preoperatoria y postoperatoria⁹⁰⁻⁹⁴. Ambas opciones logran unos resultados en el control local tumoral y en la supervivencia del paciente similar. A favor de la utilización de la RT neoadyuvante encontramos que requiere menor dosis de irradiación y un campo de irradiación menor, en contra que se asocia a mayor índice de complicaciones en la cicatrización de las partes blandas. Es importante destacar que factores como la profundidad del plano tumoral o el mayor tamaño del mismo, empeoran el pronóstico final. Estos factores normalmente se relacionan con una mayor disección quirúrgica, lo que puede aumentar la tasa de complicaciones en los tejidos blandos. Habitualmente, la RT neoadyuvante se selecciona en estos casos de peor pronóstico con la intención de facilitar la cirugía posterior⁷⁻¹².

Como hemos explicado anteriormente, tras la resección tumoral, en la etapa quirúrgica posterior de reconstrucción, los colgajos libres son los que cubren mejor las expectativas en el tratamiento de los SPB. Se adecuan a zonas de carga y periarticulares, o a defectos moderados y grandes de las extremidades, tórax y abdomen, e imprescindibles en la mayoría de procedimientos complejos de cabeza y cuello³⁴. Son extremadamente versátiles y como regla general, elegiremos el colgajo más fiable y que al mismo tiempo cubra los requerimientos funcionales y estético³⁵. Los colgajos libres tienen la ventaja de tener una vascularización propia, con un período de curación de herida breve que posibilita una radioterapia y quimioterapia a dosis e intervalos adecuados^{86,89}.

Las condiciones clínicas pueden requerir la creación de microanastomosis en vasos receptores irradiados, lo que significa un reto para el cirujano, debido a los cambios histológicos que provoca la RT en la pared vascular y nerviosa⁹⁻¹¹. El efecto de la RT neoadyuvante en el éxito de los colgajos libres microvasculares nunca ha sido estudiado específicamente.

El éxito de la viabilidad del colgajo, y por lo tanto de la fase de reconstrucción quirúrgica, depende de varios factores. Entre los más importantes podemos definir, a pesar de la gran controversia y desconocimiento que existe a su alrededor, la permeabilidad de los vasos del pedículo^{9,11,12,13} y el tiempo de evolución entre la neoadyuvancia y la cirugía de resección tumoral y reconstrucción posterior^{14,15}.

Actualmente, existe amplia controversia sobre si en aquellos casos de peor pronóstico, en los que se precise RT neoadyuvante, y posteriormente una reconstrucción asociada a un procedimiento microquirúrgico, el índice de fracaso o pérdida del colgajo es mayor que en los casos asociados a RT adyuvante¹³.

A nivel clínico algunos autores han obtenido resultados en los que no se observan diferencias en la tasa de complicaciones clínicas postoperatorias en pacientes sometidos a neoadyuvancia y procesos de reconstrucción microquirúrgica posterior. Sin embargo, advierten del aumento de complicaciones intraoperatorias y de la modificación de algunos parámetros de activación endotelial, que pueden aumentar la trombogénesis posterior en estos vasos. Hay que tener en cuenta que la mayoría de estos datos han sido obtenidos en series clínicas tumorales con localización en cabeza y cuello o tumores mamarios, donde se ha observado menor efecto de la irradiación preoperatoria ya que el centro del campo de irradiación (tumoral) está

relativamente alejado del campo vascular de reconstrucción. Efecto que sucede en menor medida en los SPB³⁰⁻³³.

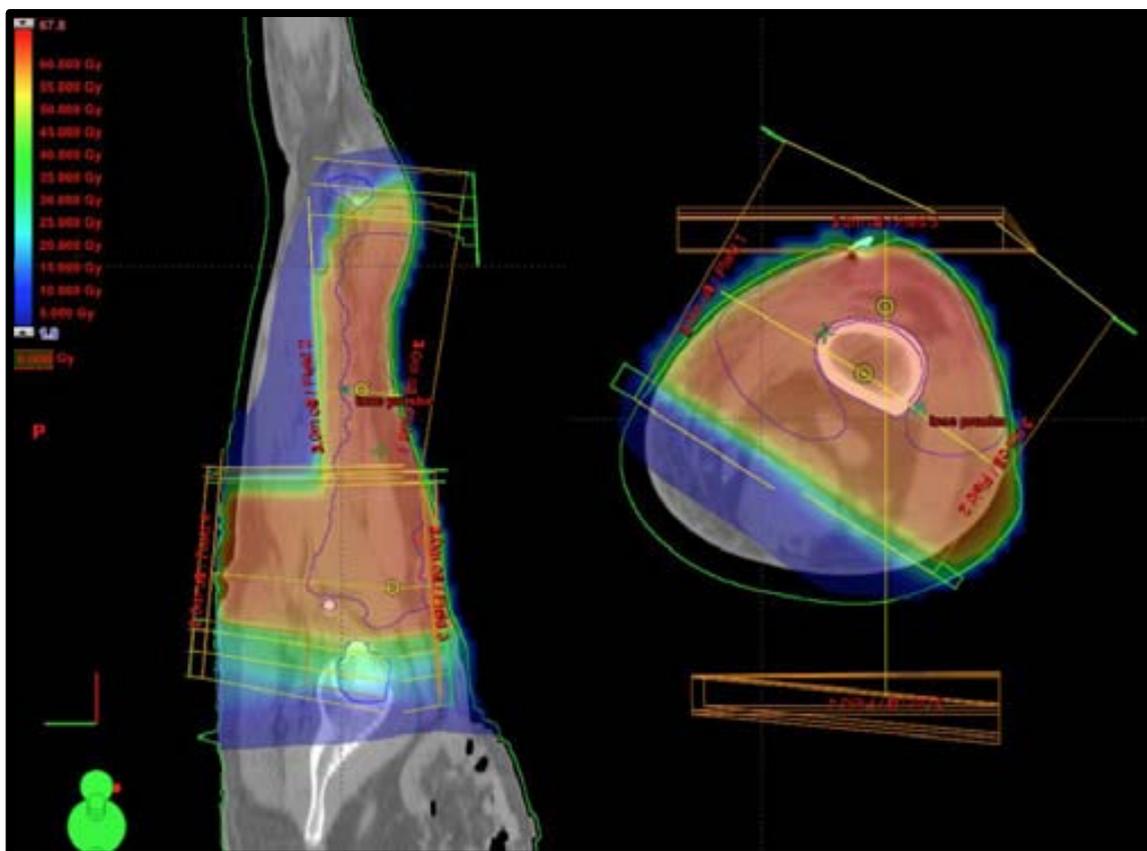


Figura 7. Planificación de tratamiento mediante radioterapia adyuvante en un paciente afecto de sarcoma en muslo. Observamos la amplitud de la zona a irradiar y la mayor dosis de irradiación asociada a la radioterapia postoperatoria. Cortesía de la Dra. Vergés (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona).

Por otro lado, a pesar de la escasez de literatura sobre el efecto de la irradiación en la morbilidad de técnicas de reconstrucción microquirúrgica, algunos estudios clínicos han detectado un aumento de la incidencia de complicaciones postoperatorias microquirúrgicas, debidas a la alteración vascular del tejido irradiado. Aumentando la tasa de necrosis total y parcial de los flaps libres vascularizados, la infección y, por lo tanto, la pérdida de los mismos. Destacan el aumento de las re-exploraciones quirúrgicas en pacientes previamente irradiados respecto a los no irradiados, siendo la causa vascular el factor etiológico de mayor importancia, en concreto la sutura microvascular venosa^{6,90}.

3. HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

“La irradiación externa neoadyuvante de la zona cervical de la rata compromete la viabilidad de la anastomosis termino-terminal microquirúrgica arterial y venosa”.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

- 1) Crear un **nuevo modelo experimental** seguro de fibrosis vascular radioinducida para el estudio de la viabilidad de la anastomosis vascular microquirúrgica en población irradiada.
- 2) Valorar si el efecto de la irradiación externa (20 Gy) neoadyuvante de la zona cervical de la rata compromete la viabilidad de la anastomosis microquirúrgica **venosa** término-terminal.
- 3) Valorar si el efecto de la irradiación externa (20 Gy) neoadyuvante de la zona cervical de la rata compromete la viabilidad de la anastomosis microquirúrgica **arterial** término-terminal.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MATERIAL

5.1.1. Animal

Se utilizaron 212 ratas cepa Sprague-Dawley machos adultos (peso corporal 250-300 gr.) de laboratorios Janvier (Roubaix, Francia).



Figura 8. Rata de la cepa Sprague-Dawley, en el estabulario del Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona.

Ninguna de las ratas había sido utilizada en anteriores estudios y ninguna rata fue excluida. Se alimentaron con pienso estándar para ratas y agua *ad libitum*. Los animales fueron estabulados en jaulas de roedores en grupos de 3 ratas. Se mantuvieron bajo temperatura constante (22°C) y un ciclo de luz/oscuridad de 12

horas. Todos los procedimientos experimentales se adhirieron a las recomendaciones de las leyes locales, nacionales y europeas (Decreto 214 de 1997, el Real Decreto 223 de 1988 y la Directiva Europea 86/609/CEE de 1986, respectivamente) y a los estándares de atención establecidos por *National Institutes of Health* (Guide for Care and Use for Laboratory Animals, publication No. 80-23, revised 1985). Nuestro proyecto también recibió la aprobación del Comité de Ética del Institut de Recerca del Hospital Universitario Vall d'Hebron (Protocolo n^o: 2011 a 64,11).

5.1.2. Instrumental para la irradiación

- Unidad de Tratamiento de RT Theratron de Co⁶⁰.

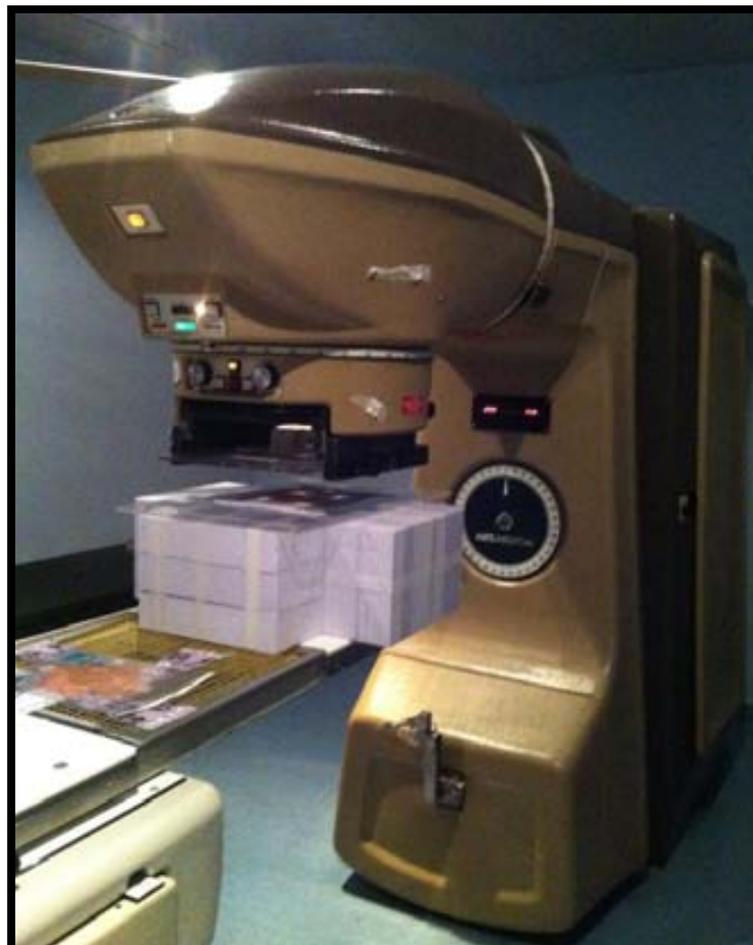


Figura 9. Unidad de Tratamiento de Radioterapia Theratron de Co⁶⁰ con la plataforma diseñada para la irradiación animal, en la Unidad de Radioterapia Oncológica en el Hospital Vall d'Hebron, Barcelona.

- Preconformado en cruz de Cerrobend para la creación de 4 campos de irradiación de 2 x 2 cm simultáneos.



Figura 10. Placa de Cerrobend preconformada en cruz que proporciona 4 campos de irradiación de 4 cm², en la Unidad de Radioterapia Oncológica en el Hospital Vall d'Hebron, Barcelona.

- Plantillas de posición de los animales, previamente a la irradiación cervical.

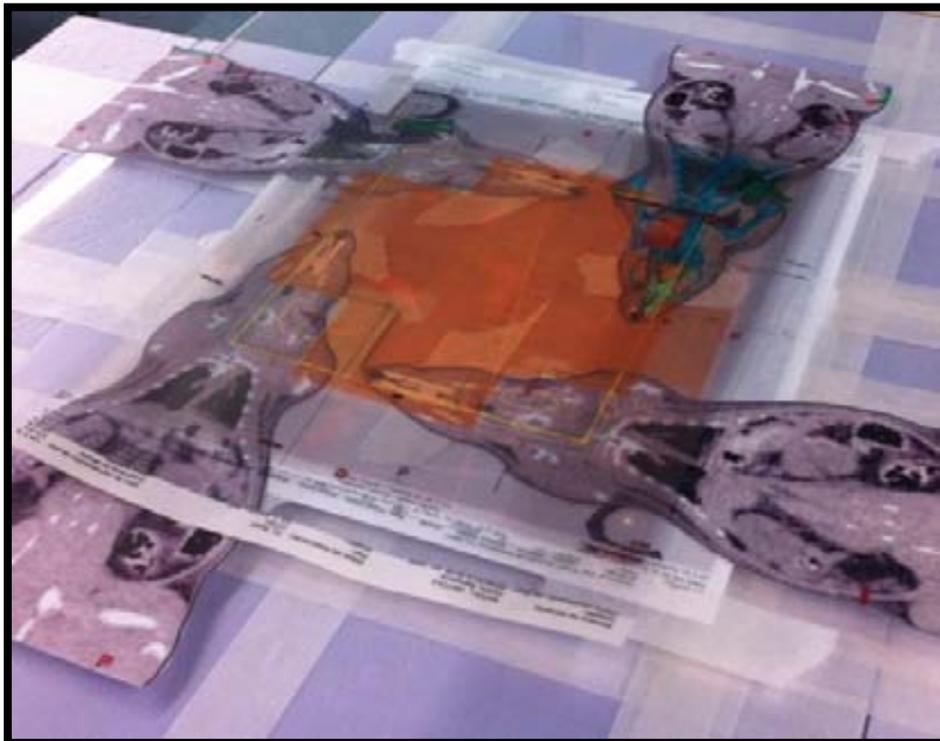


Figura 11. Plantillas de posición de las ratas previamente a la irradiación cervical. Podemos observar exclusión de irradiación de los órganos toraco-abdominales y protección de la zona craneal mediante la placa de Cerrobend.

5.1.3. Instrumental para la sutura microvascular

- Microscopio Carl-Zeiss OPMI 9 - FC (Aumentos: 0,6, 1, 1,6).



Figura 12. Microscopio Carl-Zeiss OPMI 9 – FC, fotografía tomada durante una microsutura arterial en el estabulario del Institut de Recerca Vall d’Hebron, Barcelona.

- Caja de microcirugía:
 - Micro porta-agujas
 - Micro tijera
 - Micro pinza recta

- Micro pinza curva
- Dilatador
- Clamps dobles atraumáticos Edwards
- Clamps simples atraumáticos Edwards
- Sutura Johnson&Johnson Ethilon-Nylon Monofilamento 9.0 5"-13cm
Agujas BV-4

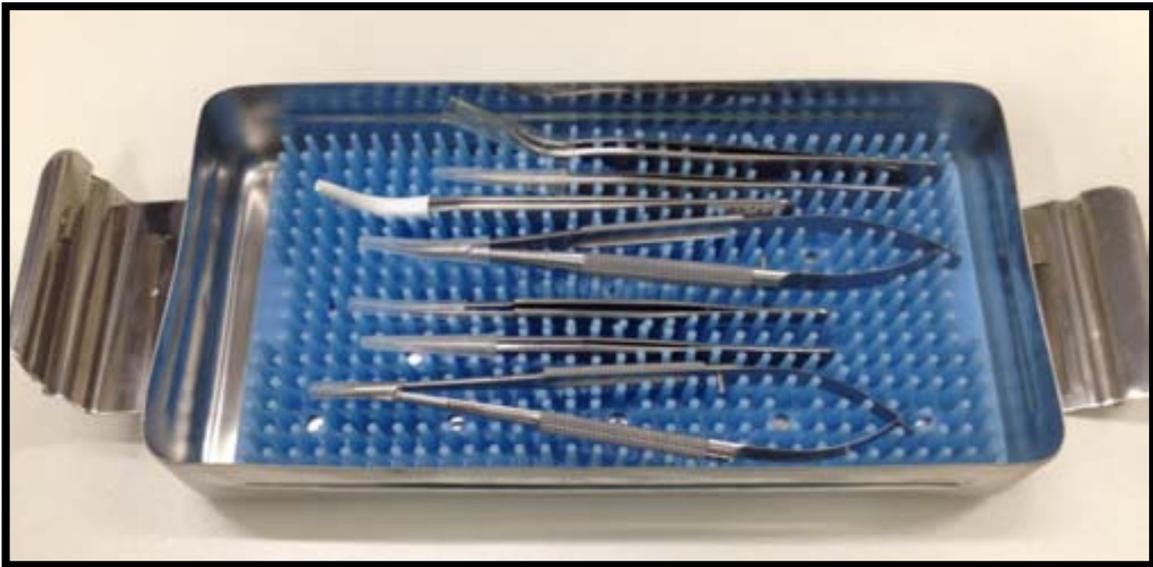


Figura 13. Caja de microcirugía en el estabulario del Institut de Recerca Vall d'Hebrón, Barcelona.

- Caja de cirugía básica.
 - Porta-agujas
 - Tijera Metzemaum
 - Tijera mayo curva
 - Pinza Adson dentada
 - Sutura Johnson&Johnson Ethilon-Nylon Monofilamento 4.0 18"-45cm
Agujas SC-20



Figura 14. Material de cirugía básico y microcirugía, en el estabulario del Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona.

- Cámara de inducción anestésica.



Figura 15. Cámara de inducción anestésica, en el estabulario del Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona.

- Pulsioxímetro.
- Manta térmica con sonda rectal (rata).



Figura 16. Rata en reanimación durante el postoperatorio inmediato con manta térmica, en el estabulario del Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona.

- Balanza Precisa BJ1100D.
- Lámpara portátil quirófano Martin (Chromophare C-450).
- Suero fisiológico.
- Jeringuillas de 10 ml.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Técnica de anestesia general y cuidados peroperatorios

El protocolo de anestesia incluyendo las pautas preoperatorias, intraoperatorias y postoperatorias se utilizó en los siguientes procedimientos de nuestro proyecto experimental:

- Irradiación (2 semanas preoperatorias)
- Microcirugía vascular
- Comprobación vascular (4 semanas postoperatorias)
- Sacrificio
- Estudio topográfico cervical mediante TAC

La rata se trasladaba desde la granja (laboratorios Janvier, Roubaix, Francia) al estabulario del Institut de Recerca en un vehículo autorizado para el transporte de animales de experimentación con 7 días de antelación para su aclimatación en la sala de cuarentena. Una vez en el estabulario se verificaba su correcto estado de salud y su peso para su inclusión en el estudio e inicio del protocolo de anestesia. Posteriormente los animales se trasladaban a la sala de estabulación.

Los animales se trasladaban desde la sala de estabulación al quirófano. Los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de 2,5 ml (1ml por cada 100 g) de una solución de clorhidrato de ketamina (50 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg) y posteriormente fueron pesados. Durante la anestesia, los animales respiraron espontáneamente.



Figura 17. Anestesia intraperitoneal de animal de experimentación, en la Unidad de Radioterapia Oncológica en el Hospital Vall d'Hebron, Barcelona.

Tras la anestesia, se administraron a todas las ratas 5 ml de solución de Ringer lactato por vía subcutánea para evitar la deshidratación, y una única dosis de 0,01 mg/kg de buprenorfina por vía subcutánea como analgesia.

Todos los animales fueron evaluados clínicamente por veterinarios independientes del centro de estabilización. El estudio fue ciego, sin conocer el grupo al que pertenecían las ratas. Los animales fueron evaluados diariamente durante la primera semana postRT y posteriormente semanalmente hasta el final del período de estudio.



Figura 18. Evaluación clínica por veterinarios independientes en el estabulario del Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona.

La observación animal se basaba en la evaluación del aspecto general del animal, postura, movilidad, aspecto y cantidad de heces, temperatura rectal, frecuencia respiratoria, tipo de respiración, frecuencia cardíaca, ocular, estado del pelaje general y de la zona irradiada, conducta y sociabilidad del animal y automutilaciones. Todos los animales se pesaron al inicio del estudio y posteriormente semanalmente hasta el final del período de estudio.

5.2.2 Estudio topográfico cervical mediante Tomografía Axial Computarizada

Las ratas eran trasladadas en grupos de 4 en cajas adaptadas para el transporte de animales de experimentación a la Unidad de Radioterapia Oncológica en el Hospital Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona. Se procedía a la anestesia de la rata siguiendo el protocolo de anestesia anterior. Ya con la rata en un nivel anestésico correcto se posicionaba dentro de la máquina de TAC.

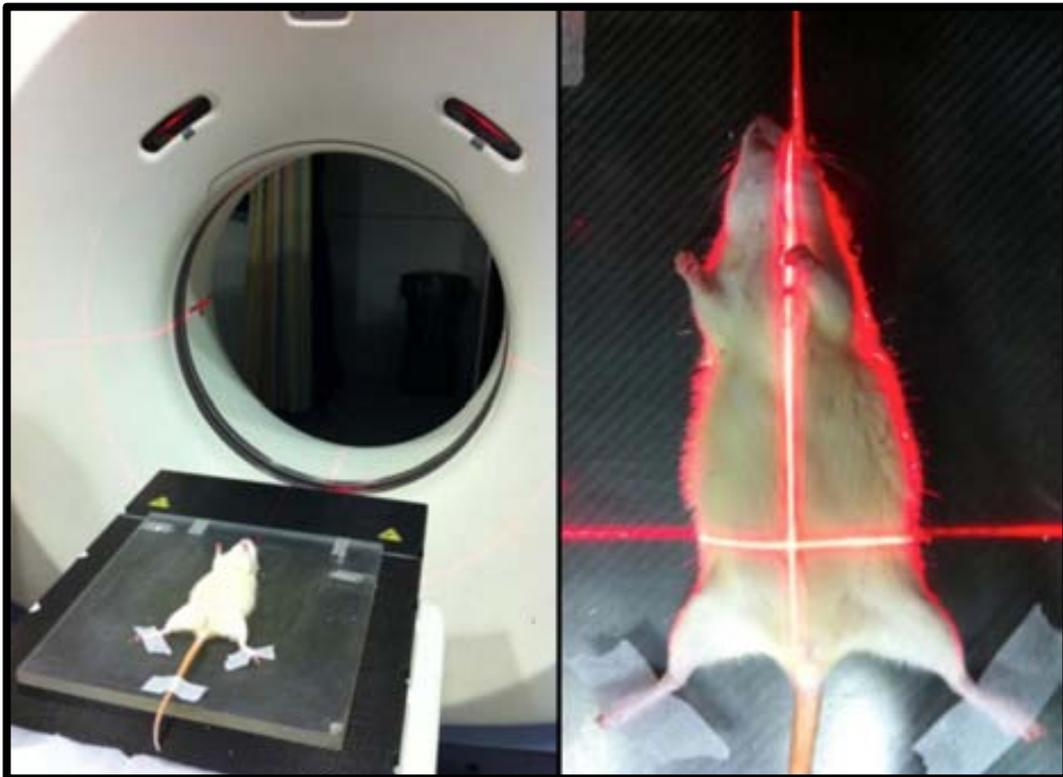


Figura 19. Estudio topográfico del paquete neurovascular cervical mediante TAC, en la Unidad de Radioterapia Oncológica en el Hospital Vall d'Hebron, Barcelona.

El protocolo de imágenes se obtenía en una proyección axial. Los siguientes eran los parámetros de imagen: *weld of view*, 12-14 cm; *section thickness*, 1.0 mm; *matrix size*, 256 x 192. Al terminar la secuencia de imágenes deseadas se revertía a la rata de anestesia general previo al traslado al estabulario del Institut de Recerca. Las imágenes por TAC fueron analizadas por los técnicos del servicio de radio física del Hospital Vall d'Hebron.

Se realizó un estudio topográfico cervical mediante Tomografía Axial Computarizada (estudio de profundidad, características y localización del paquete NV cervical), y su consecuente cálculo dosimétrico de interacción radioterápica con el objetivo.



Figura 20. Escanograma, estudio topográfico del paquete neurovascular cervical. Imagen coronal, sagital y reconstrucción en 3D. Se identifica en rojo la zona a estudiar y posteriormente a irradiar.

Posteriormente se realizó un estudio de tecnificaciones sobre la posición óptima de la rata durante la radioterapia, distancia de la máquina y campo a irradiar.

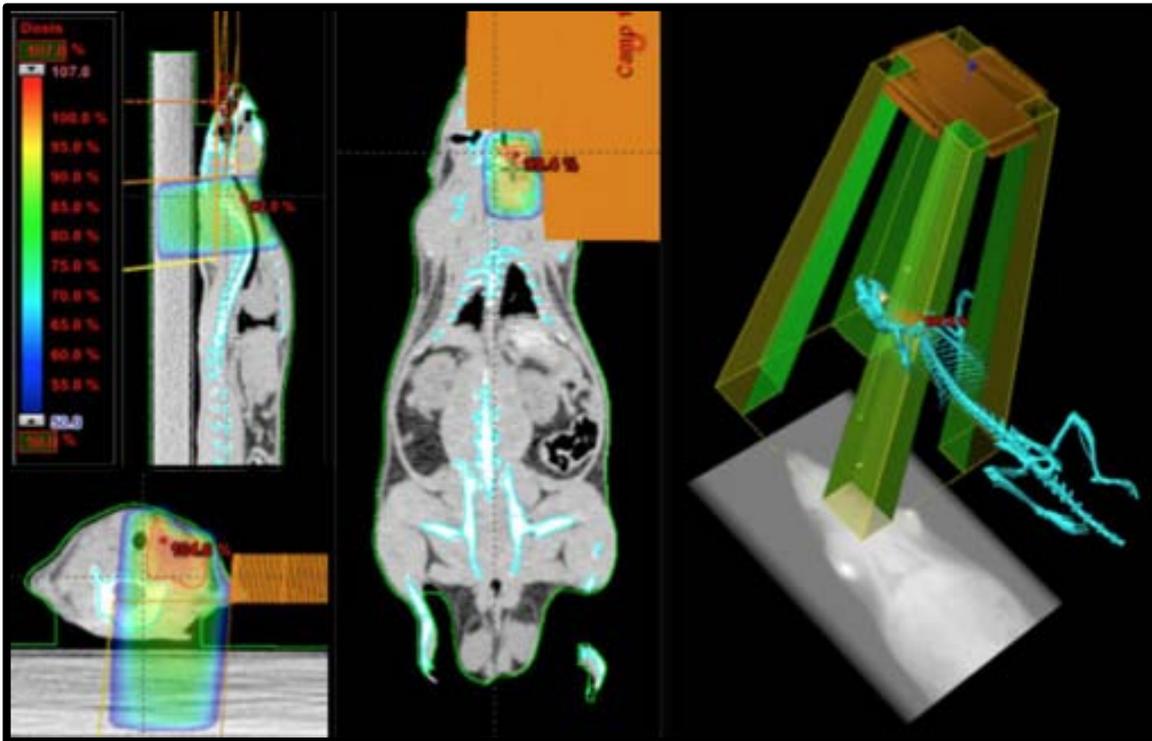


Figura 21. Cálculo dosimétrico cervical. Zona central de irradiación (zona roja y amarilla) sobre el paquete NV 20 Gy e irradiación periférica (zona verde y azul).

5.2.3 Modelo preclínico seguro de irradiación cervical

Las ratas eran trasladadas en grupos de 4 en cajas adaptadas para el transporte de animales de experimentación a la Unidad de Radioterapia Oncológica en el Hospital Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona. Se procedía a la anestesia de la rata siguiendo el protocolo de anestesia anterior. Ya con la rata en un nivel anestésico correcto se posicionaba en la Unidad de Tratamiento de RT Theratron de Co^{60} .

El grupo irradiado fue expuesto en subgrupos de 4 ratas simultáneamente a una única fracción de 20 Gy, con una dosis media de irradiación de 2,0 Gy por minuto. La RT se llevó a cabo mediante una unidad de tratamiento de Radioterapia Theratron de Co^{60} . Se diseñó y colocó una placa de Cerrobend en el centro del haz de irradiación que permitía la RT simultánea de 4 campos de 2 x 2 cm. Se colocaron las ratas en decúbito supino de tal manera que el campo de RT frontal de 2 x 2 cm cubría

únicamente la región hemicervical izquierda. Se trató con 7 electrones MeV a una distancia de la fuente emisora a la piel de 20 cm.



Figura 22. Colocación de las ratas durante el protocolo de irradiación en el modelo de irradiación cervical. En la Unidad de Radioterapia Oncológica en el Hospital Vall d'Hebron, Barcelona.

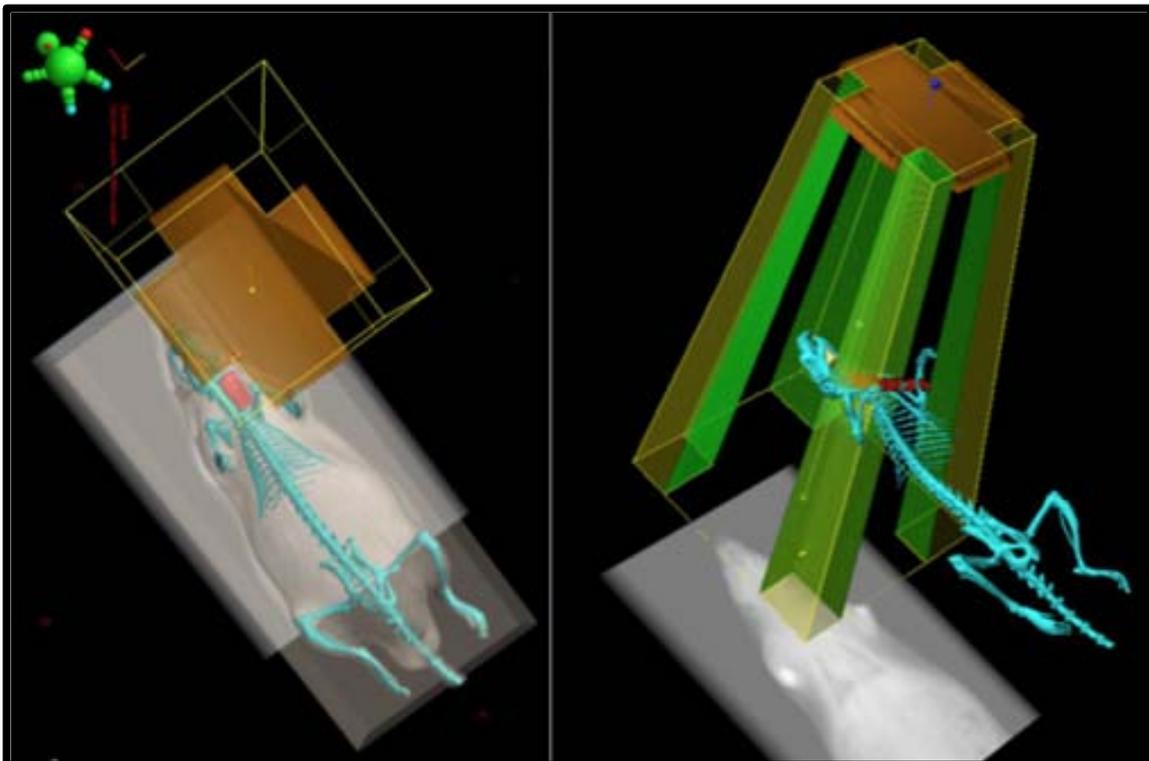


Figura 23. Visión del campo de irradiación (zona roja) desde el haz de RT (verde). Reconstrucción en 3D.

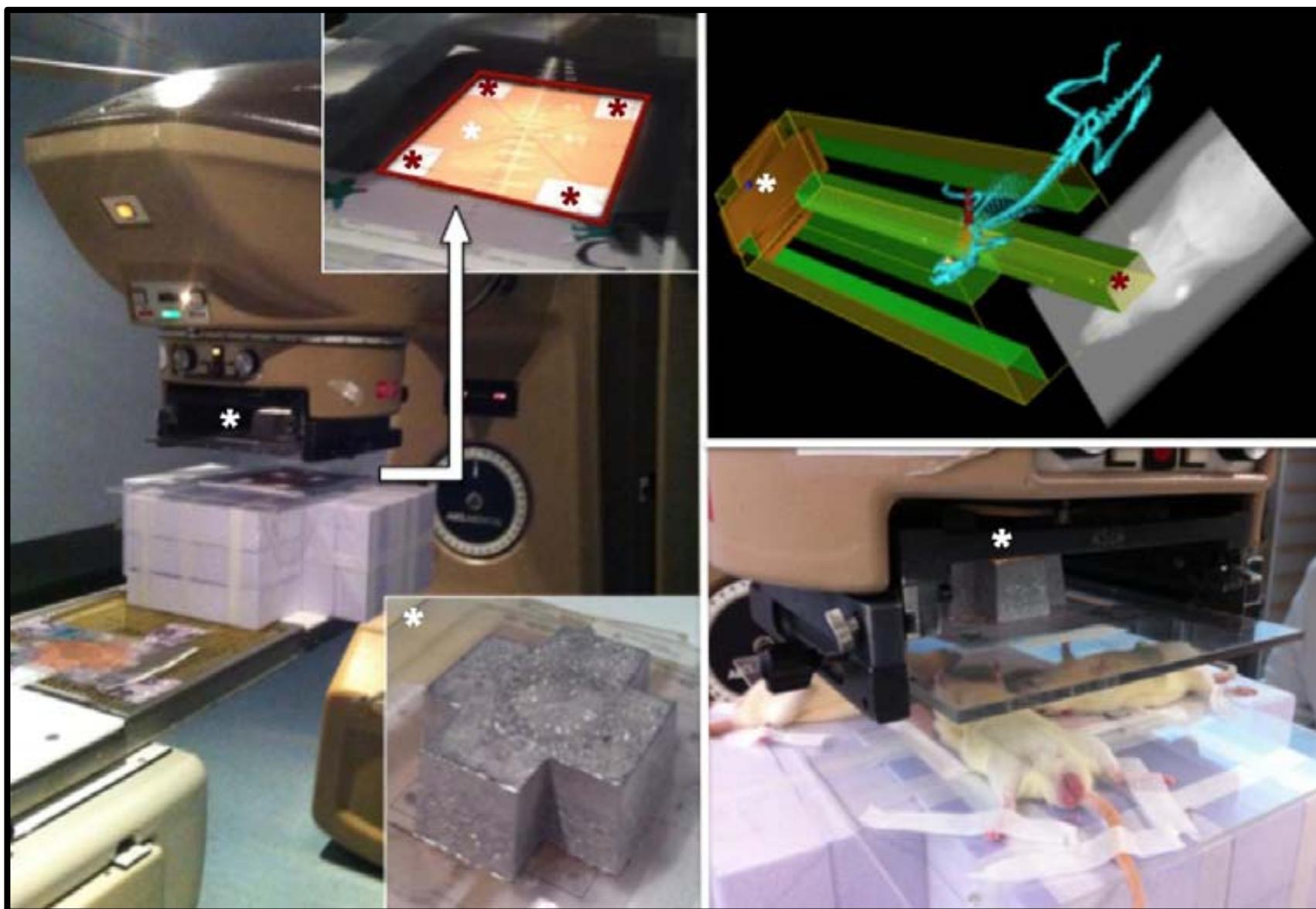


Figura 24. Protocolo de irradiación en el modelo de irradiación cervical seguro. Unidad de tratamiento de RT Theratron de Co^{60} , en el centro del haz de irradiación se dispone la cruz de Cerrobend que cubre la zona central de irradiación (zona naranja) y permite la irradiación de 4 campos de 4 cm^2 .

Antes de iniciar la RT, se procedía a la verificación radiográfica del posicionamiento de las ratas. Al finalizar la RT, se procedía a la verificación radiográfica de la dosis administrada durante la RT.

Todas las sesiones de RT se llevaron a cabo entre las 14:00h y las 15:00h.

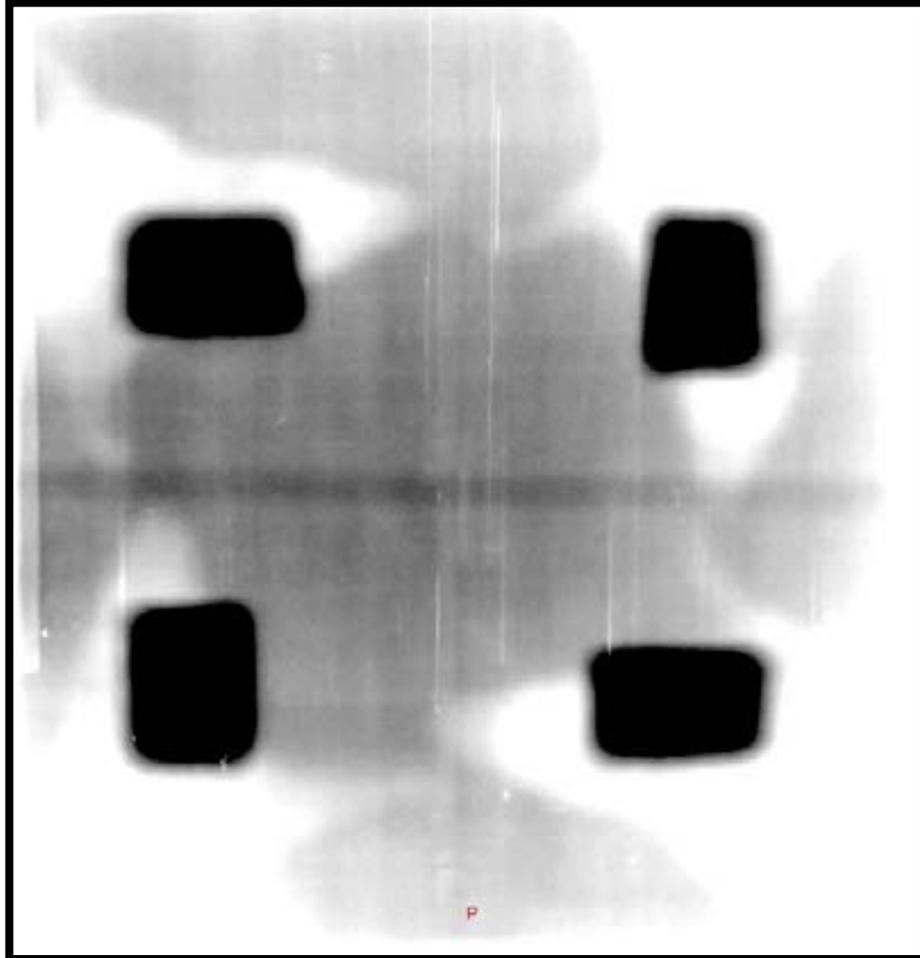


Figura 25. Verificación radiográfica de la dosis administrada durante la RT a las 4 ratas de forma simultánea.

5.2.4 Técnica de la sutura microvascular arterial

Los animales se trasladaban desde la sala de estabilización al quirófano. Las cirugías, la evolución postoperatoria y la estabilización de las ratas se llevaron a cabo en el Estabulario del Institut de Recerca Vall d'Hebron. Todas las microanastomosis fueron realizadas por el mismo cirujano, Sergi Barrera Ochoa.

Este procedimiento se realizaba dos semanas después de la irradiación cervical en los grupos irradiados (grupos IRAR e IRVE), y tras la aclimatación en los grupos no irradiados (grupos NIRAR y NIRVE).

Siguiendo el protocolo de anestesia general y una vez anestesiada la rata se procedía a la inmovilización en la mesa operatoria y su posicionamiento en decúbito supino. Se realizaba rasurado y asepsia de la zona cervical.

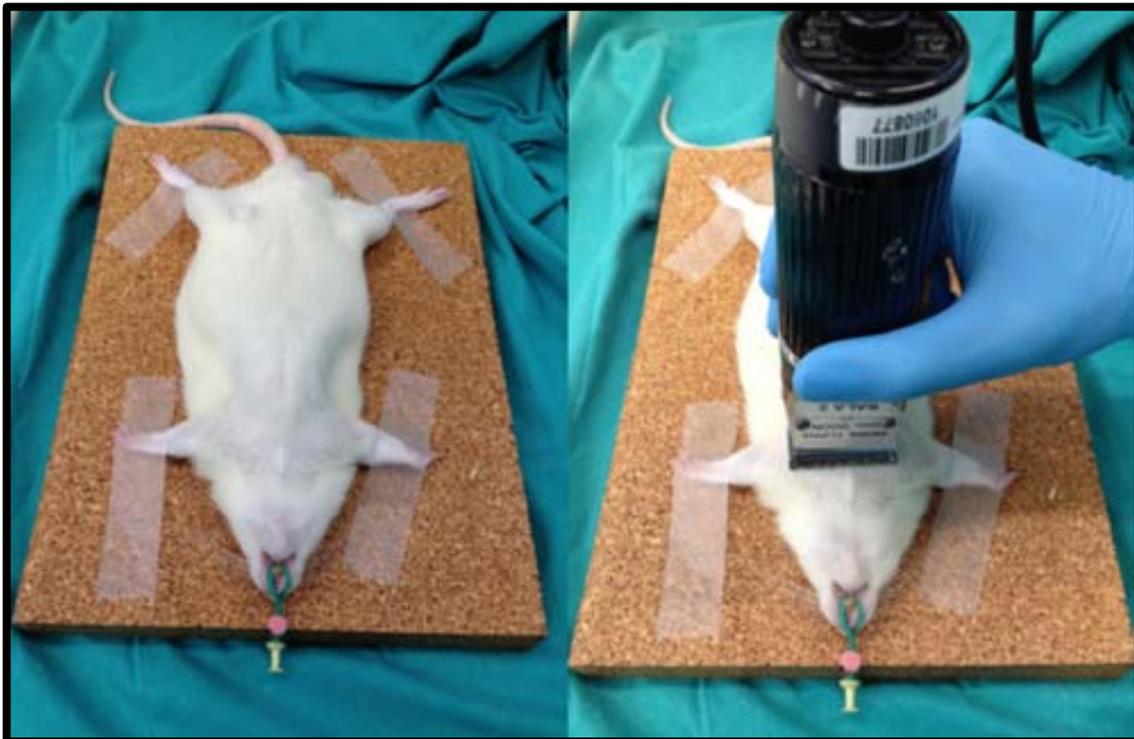


Figura 26. Preparación preoperatoria. Posición en decúbito supino y rasurado de la zona cervical.

Una vez preparado el material quirúrgico, se iniciaba el procedimiento con una incisión longitudinal cervical media y una incisión transversal siguiendo el eje de las clavículas. Se realizó una sección del platisma en línea con las incisiones cutáneas y elevación de dos colgajos triangulares de vértices supero-externos, y se visualizan debajo las glándulas submaxilares. En el centro del campo observamos los músculos esterno-tiroideos y lateralmente los músculos esterno-mastoideos, circundados externamente por la vena yugular externa.

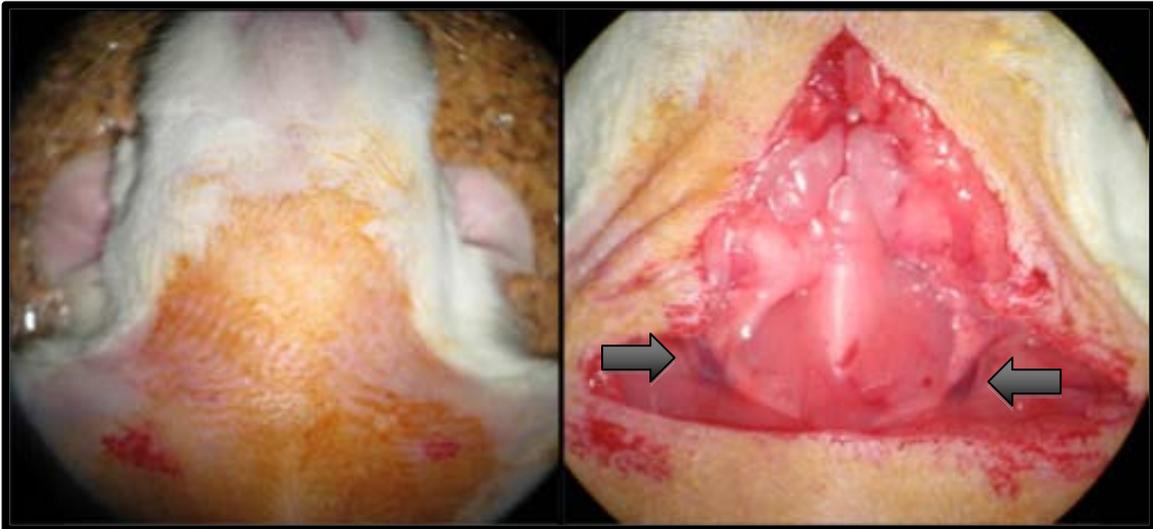


Figura 27. Asepsia del abordaje quirúrgico. Exposición cervical. Observamos la musculatura paratraqueal anterior en la zona central, y las venas yugulares externas lateralmente (flechas).

Entre ambos se disecaron la arteria carótida común junto al nervio vago.

Procedimos a disecar e individualizar la arteria carótida.

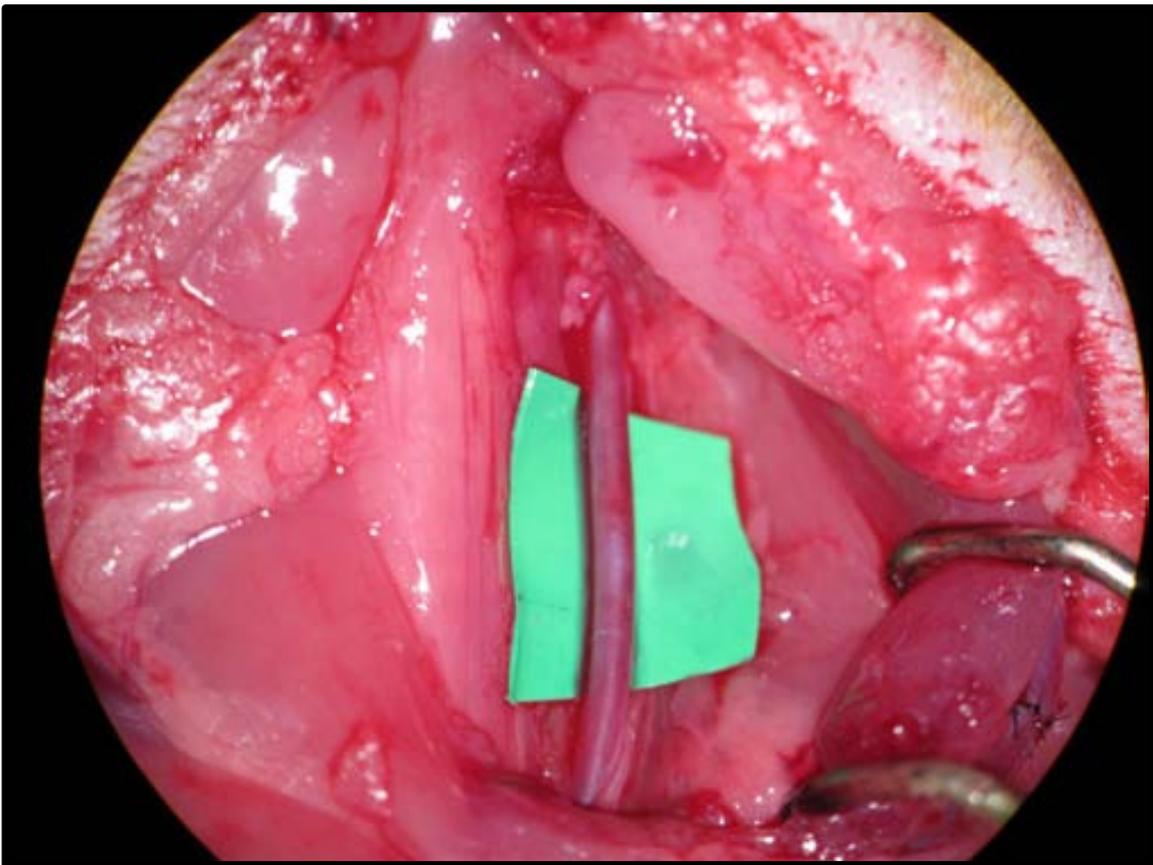


Figura 28. Individualización y disección de la arteria carótida común.

La arteria fue clampada, mediante clamps dobles atraumáticos.

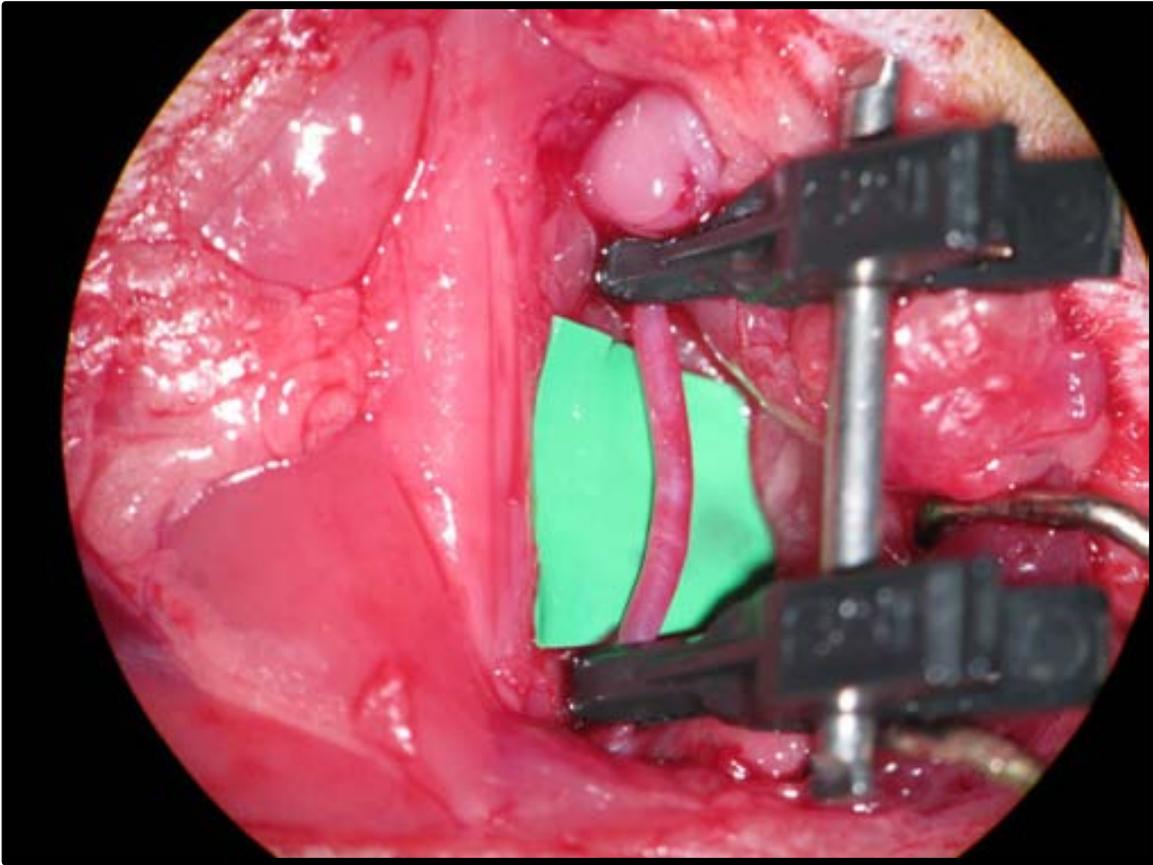


Figura 29. Microclamps vasculares atraumáticos dobles.

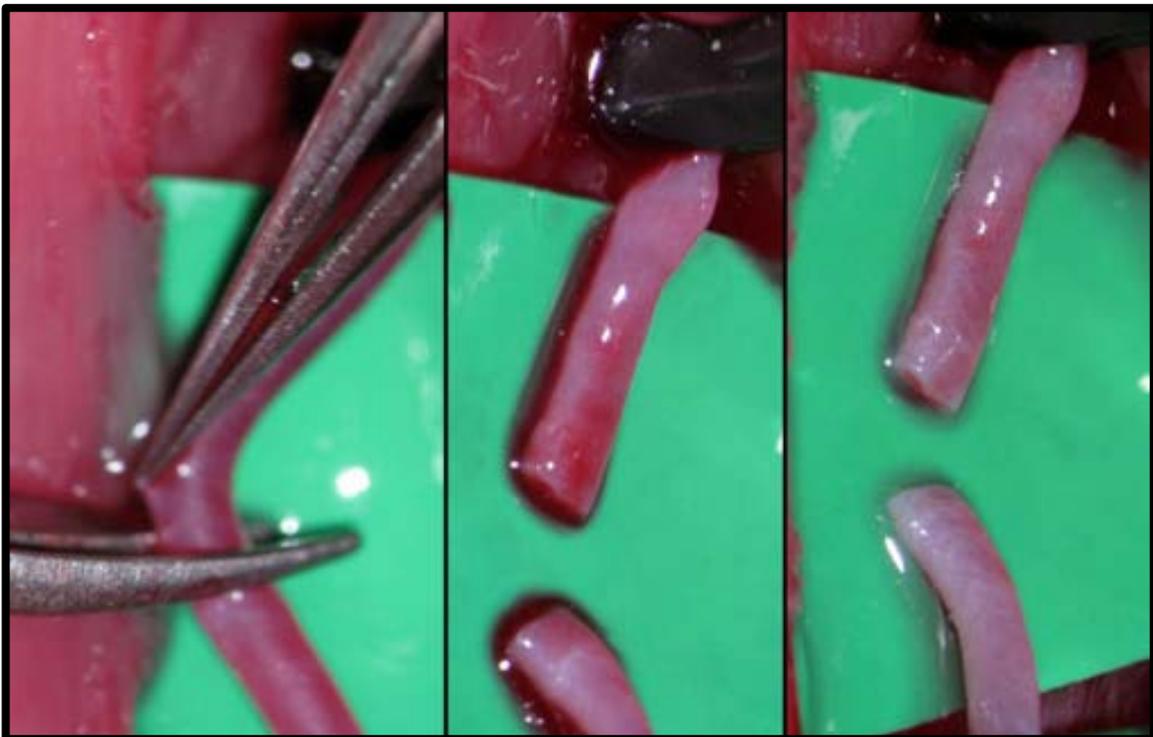


Figura 30. Arteriotomía. Exéresis de la capa adventicia revertida intraluminal. Expresión del contenido hemático endovascular.

Se procedió a realizar una arteriotomía completa de la misma, exéresis de la capa adventicia revertida intraluminal y expresión del contenido hemático endovascular. Posteriormente, se procede a realizar la sutura termino-terminal arterial con sutura nylon 9.0 (Ethilon, J&J). La técnica utilizada fue la biangulación excéntrica de 120° de Cobbett.

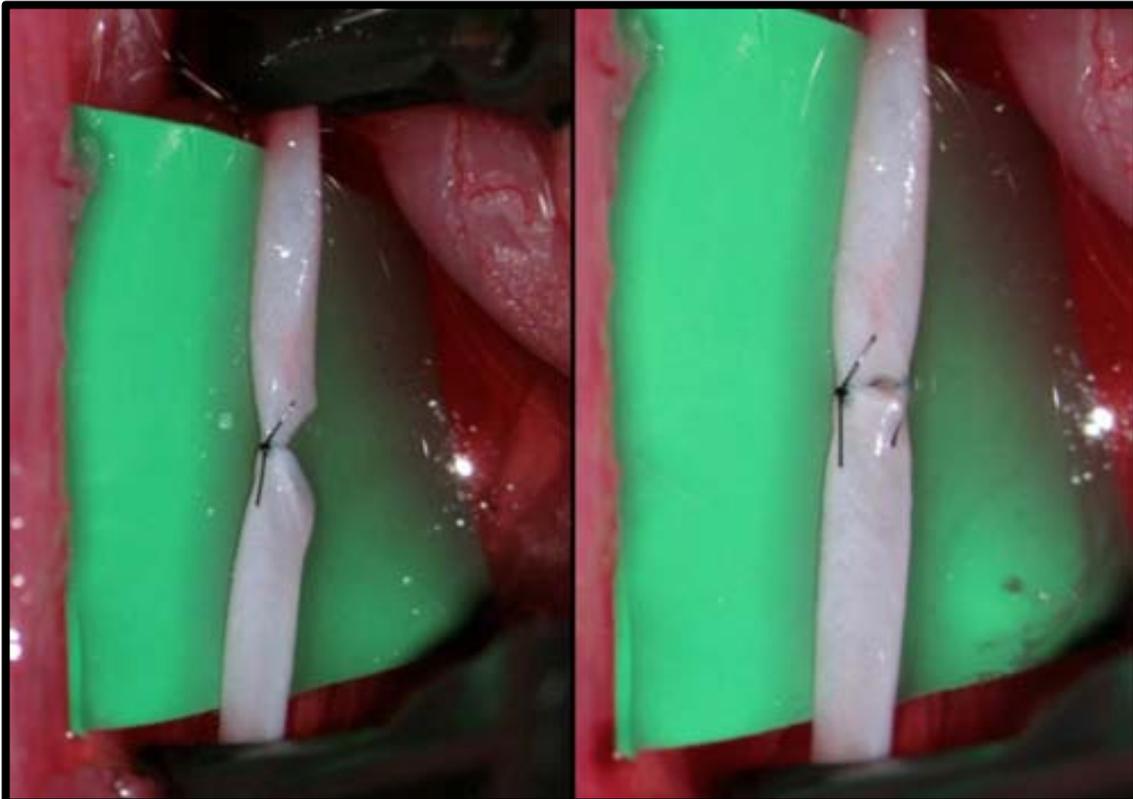


Figura 31. Primer punto cara anterior arterial. Segundo punto cara anterior a 120°, de tal manera que observamos cómo se evagina el margen anterior del lumen vascular.

Intraoperatoriamente, se realizó una valoración de las complicaciones intraoperatorias o de la dificultad técnica de la microsutura vascular. Se registraron algunas variables como el tiempo de abordaje y disección de los vasos (minutos), el tiempo de clampaje de los vasos (minutos), el número de intentos de la microsutura hasta alcanzar la viabilidad de la microsutura (número), el número de puntos de sutura (número) y finalmente el tamaño de los vasos (milímetros).

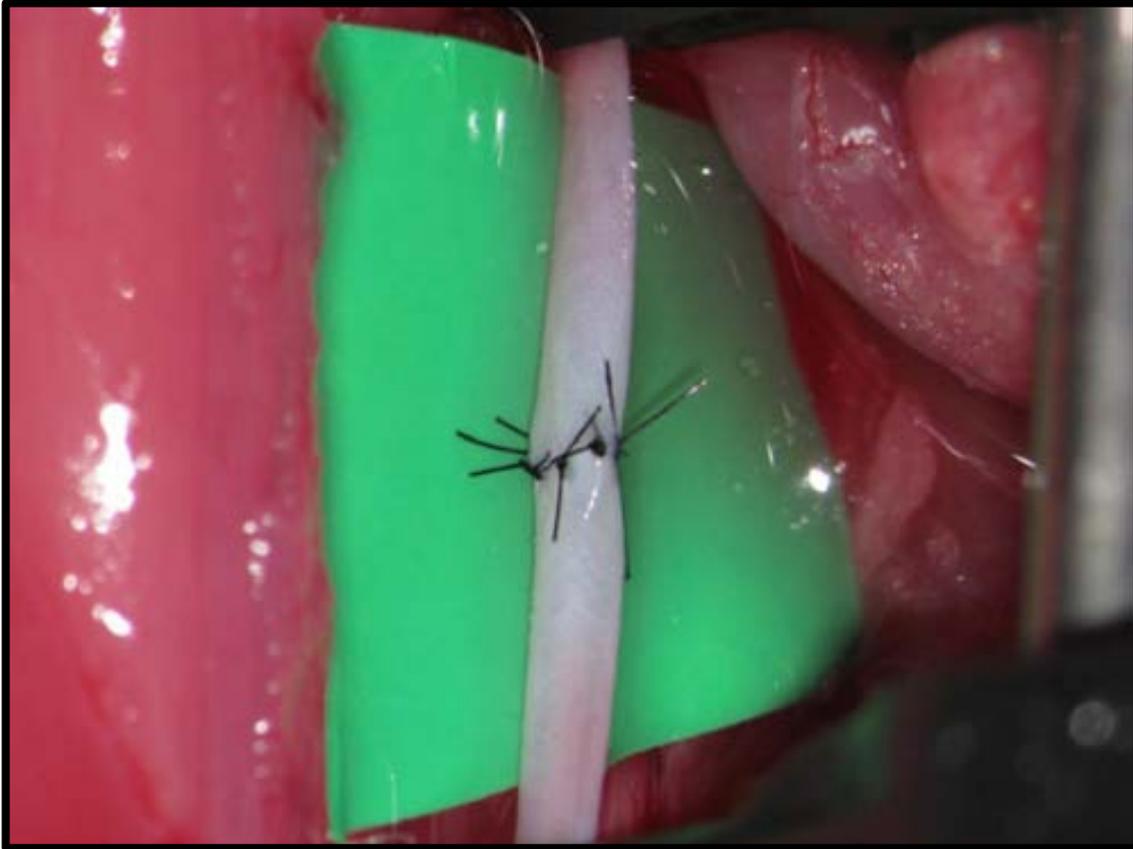


Figura 32. Microsutura arterial completa, cara anterior con 4 puntos de sutura y cara posterior con 4 puntos de sutura.

Finalmente se realiza la valoración intraoperatoria de la permeabilidad de la sutura mediante el test de O'Brien o de la permeabilidad anterógrado y retrógrado al minuto, a los 3 minutos y a los 5 minutos de finalizar la microsutura arterial, tal y como recomienda Acland. La incisión cutánea se cerró mediante sutura Monocryl 4.0 (Ethicon).

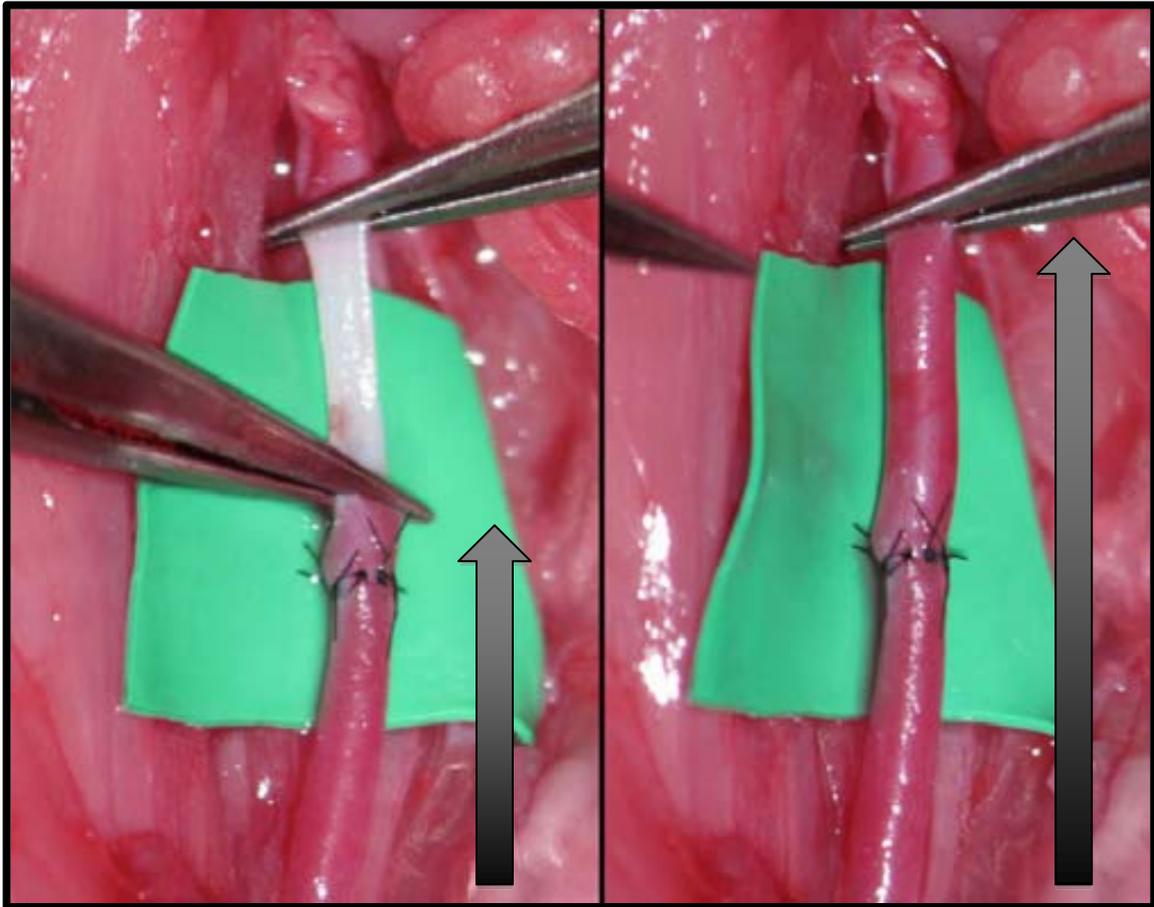


Figura 33. Test de permeabilidad anterógrado positivo.

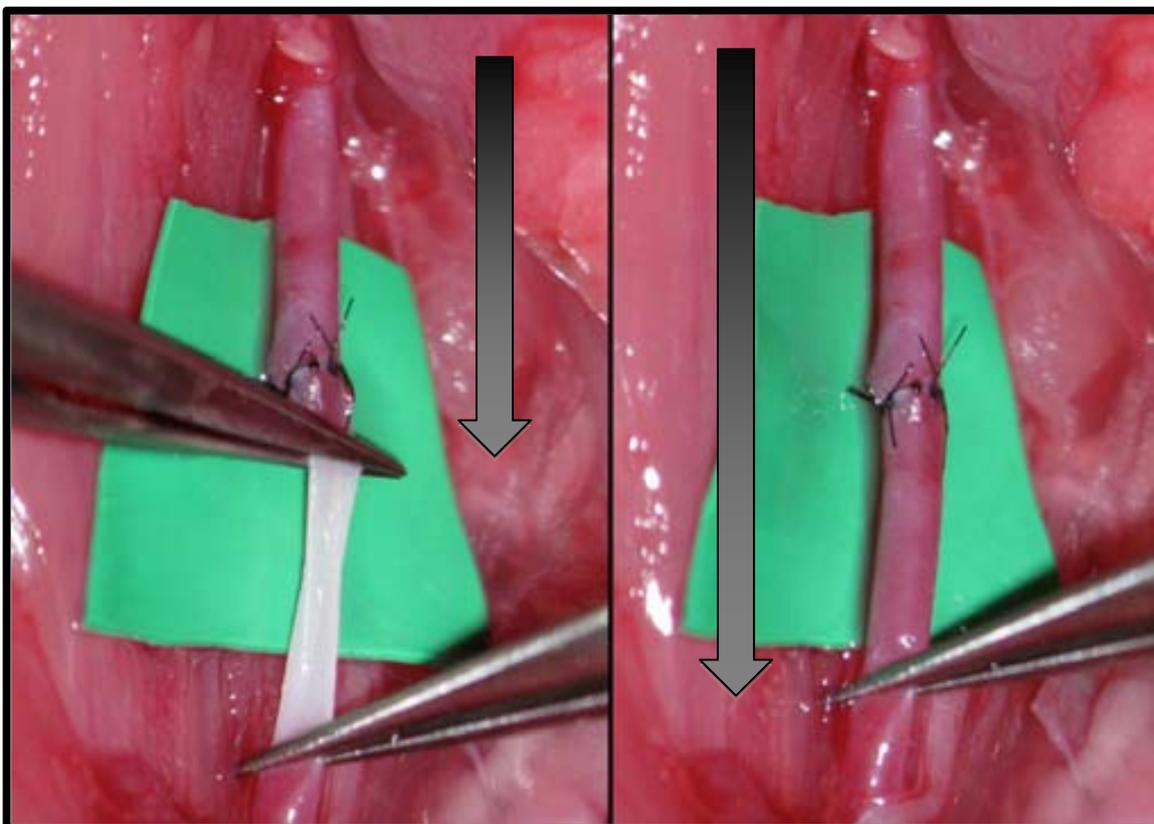


Figura 34. Test de permeabilidad retrógrado positivo.

5.2.5 Técnica de la sutura microvascular venosa

Los animales se trasladaban desde la sala de estabilización al quirófano. Las cirugías, la evolución postoperatoria y la estabilización de las ratas se llevó a cabo en el Estabulario del Institut de Recerca Vall d'Hebron. IR-HUVH Número de Registro DMAH (Departamento de Medio Ambiente y Vivienda): B9900062.

Este procedimiento se realizaba dos semanas después de la irradiación cervical en los grupos irradiados. Siguiendo el protocolo de anestesia general y una vez anestesiada la rata se procedía a la inmovilización en la mesa operatoria y su posicionamiento en decúbito supino. Se realizaba la asepsia de la zona cervical y se montaba un campo estéril quirúrgico alrededor. Una vez preparado el material quirúrgico, se iniciaba el procedimiento con una incisión longitudinal cervical media y una incisión transversal siguiendo el eje de las clavículas.

Procedimos a disecar e individualizar ambas venas yugulares externas. Se procedió a ligar las venas colaterales que podían interceder en la microsutura.

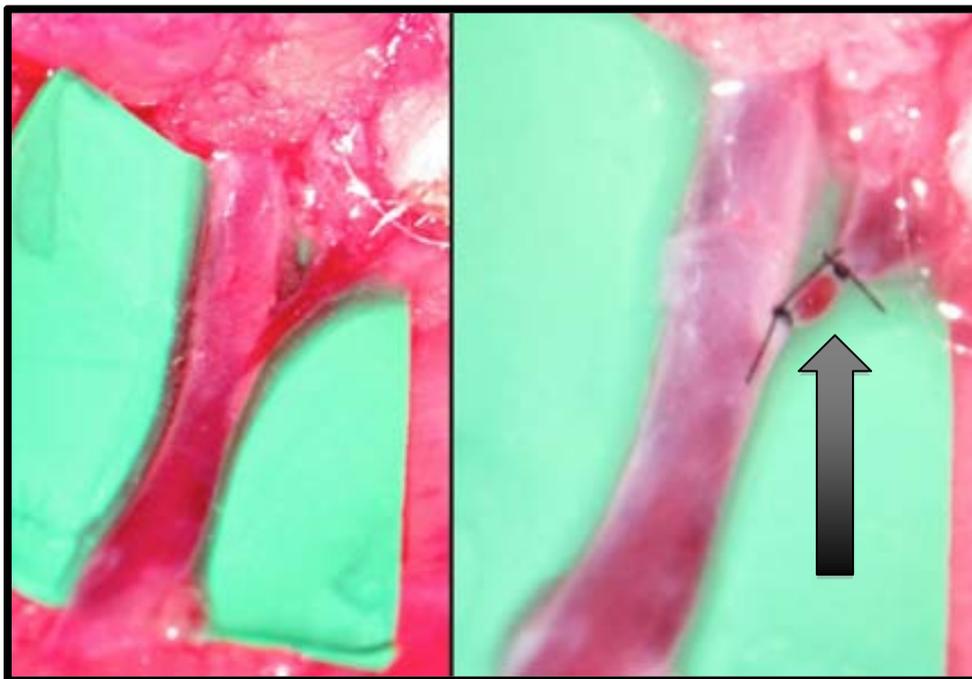


Figura 35. Ligadura venas colaterales (flecha).

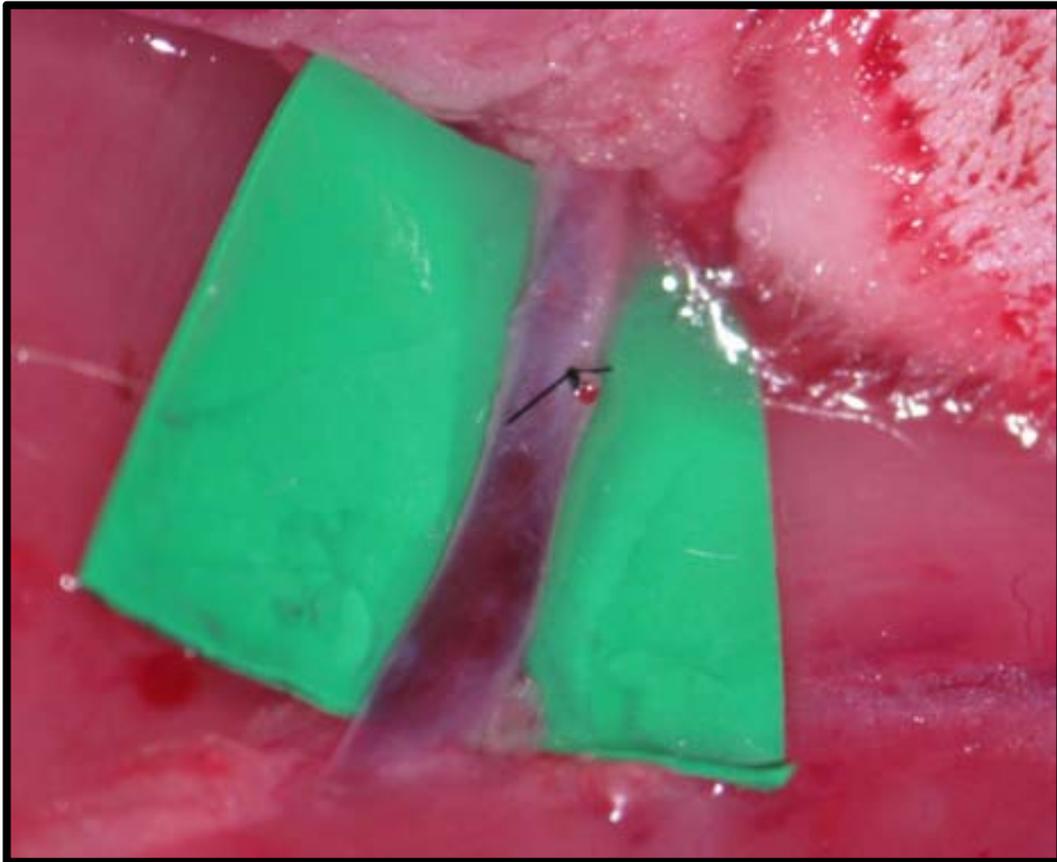


Figura 36. Vena yugular externa tras disección, individualización y ligadura venas colaterales.

La vena contralateral fue clampada con el objetivo de aumentar el retorno venoso y la distensión de la vena yugular externa a suturar.

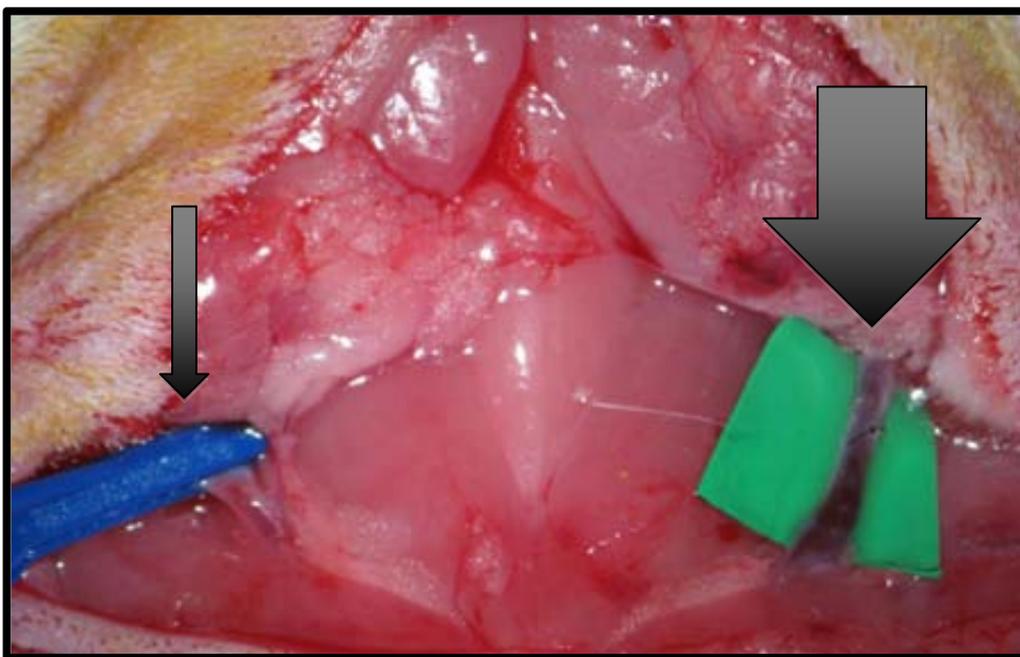


Figura 37. Clampaje venoso contralateral para aumentar el flujo sanguíneo venoso .

Mediante clamps dobles atraumáticos. Se procedió a realizar una venotomía completa de la misma.

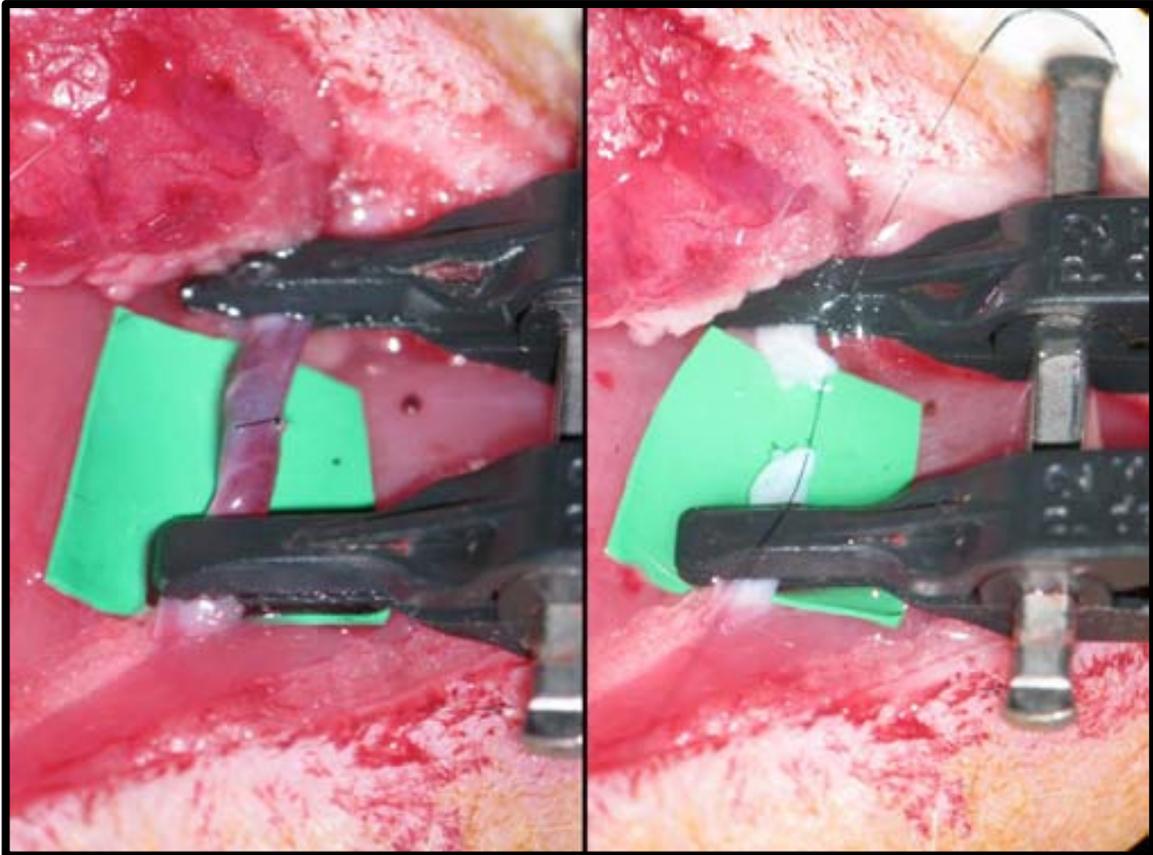


Figura 38. Clampaje venoso. Venotomía circunferencial. Primer punto de sutura venosa.

Posteriormente, se procede a realizar la sutura termino-terminal venosa con sutura nylon 9.0 (Ethilon, J&J). La técnica utilizada fue la biangulación excéntrica de 120° de Cobbett.

Finalmente se realiza la valoración intraoperatoria de la permeabilidad de la sutura mediante el test de O'Brien o de la permeabilidad al minuto, a los 3 minutos y a los 5 minutos de finalizar la microsutura venosa. La incisión cutánea se cerró mediante sutura Monocryl 4.0 (Ethicon).

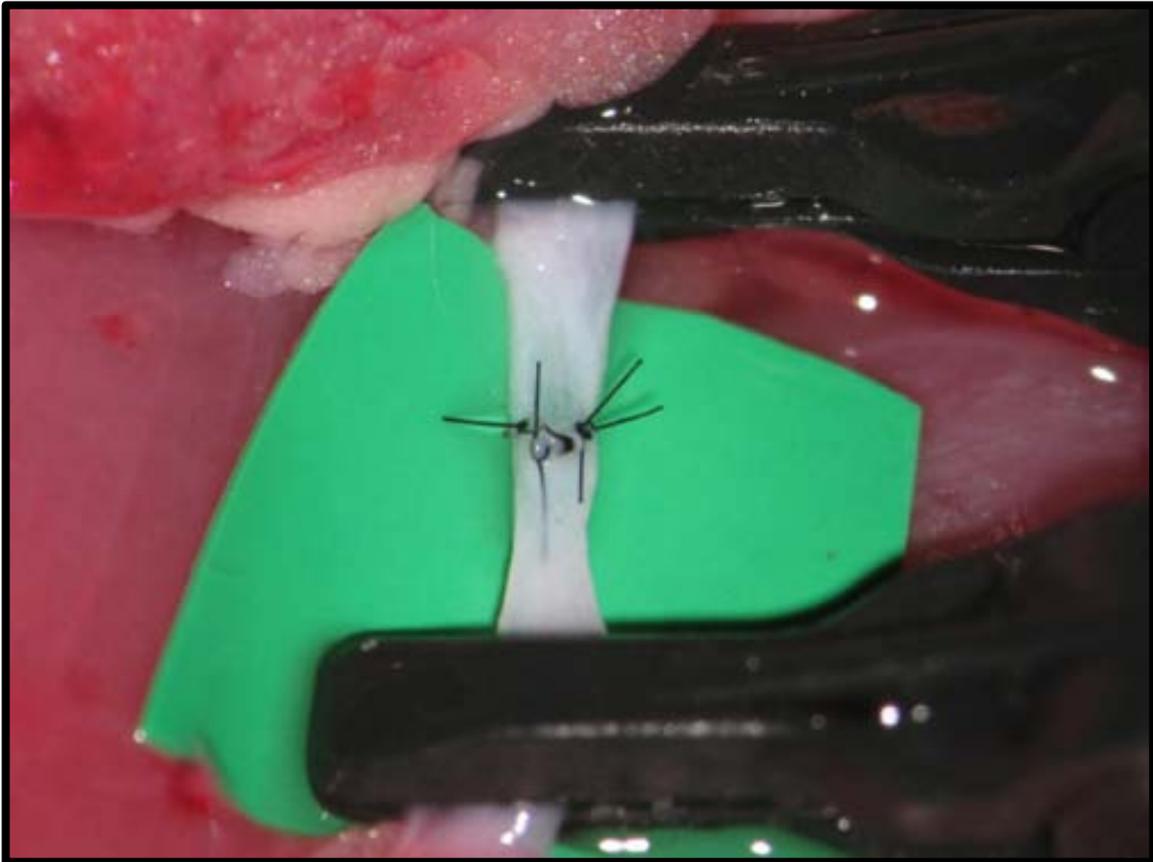


Figura 39. Sutura completa cara anterior venosa (4 puntos).

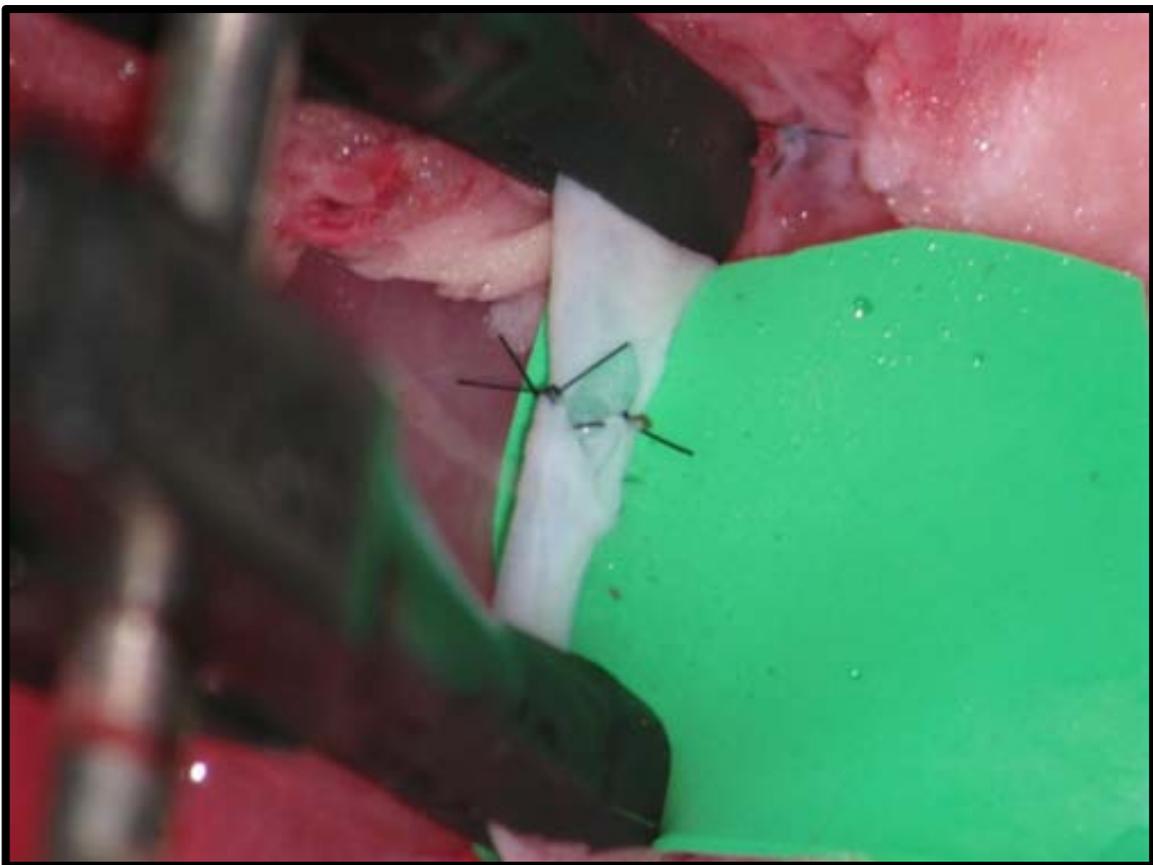


Figura 40. Exposición de la cara posterior venosa. Giro del clamp vascular 180°.

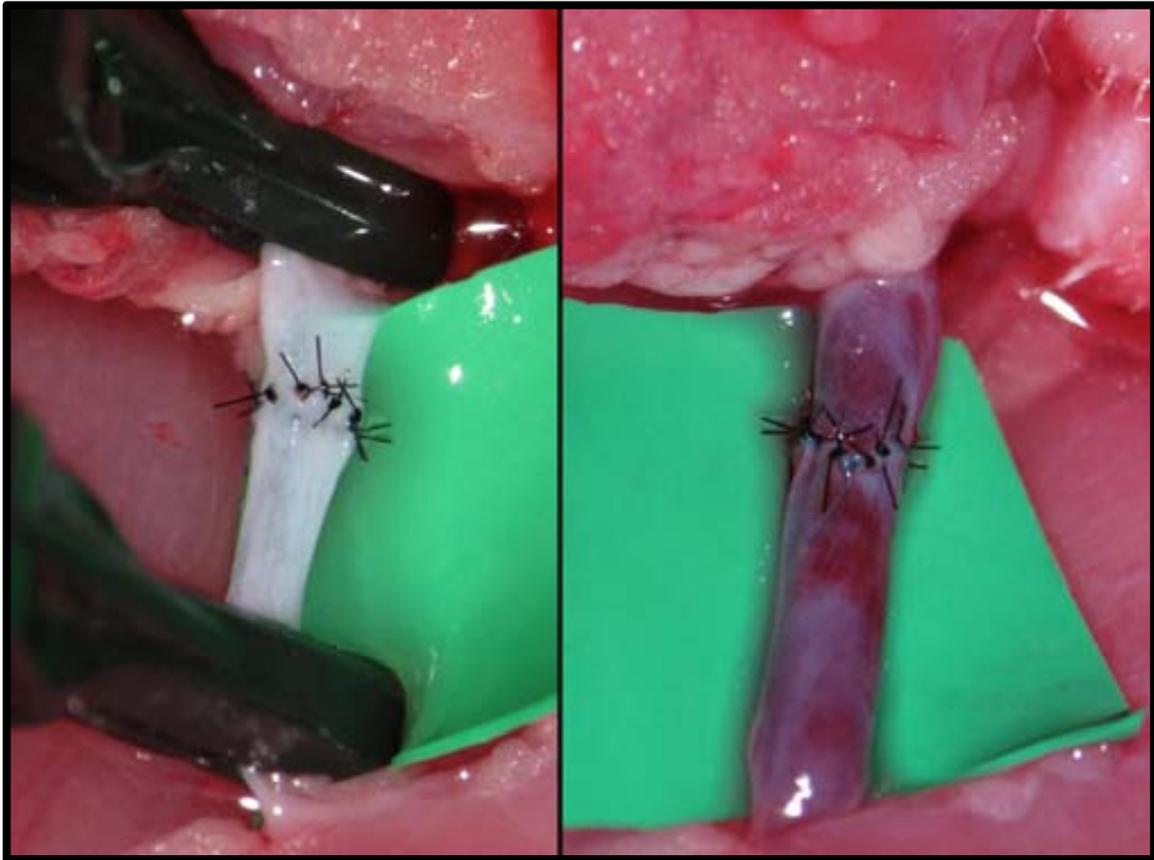


Figura 41. Microsutura venosa completa (10 puntos). Comparación clampada respecto a desclampada, correcto flujo venoso.

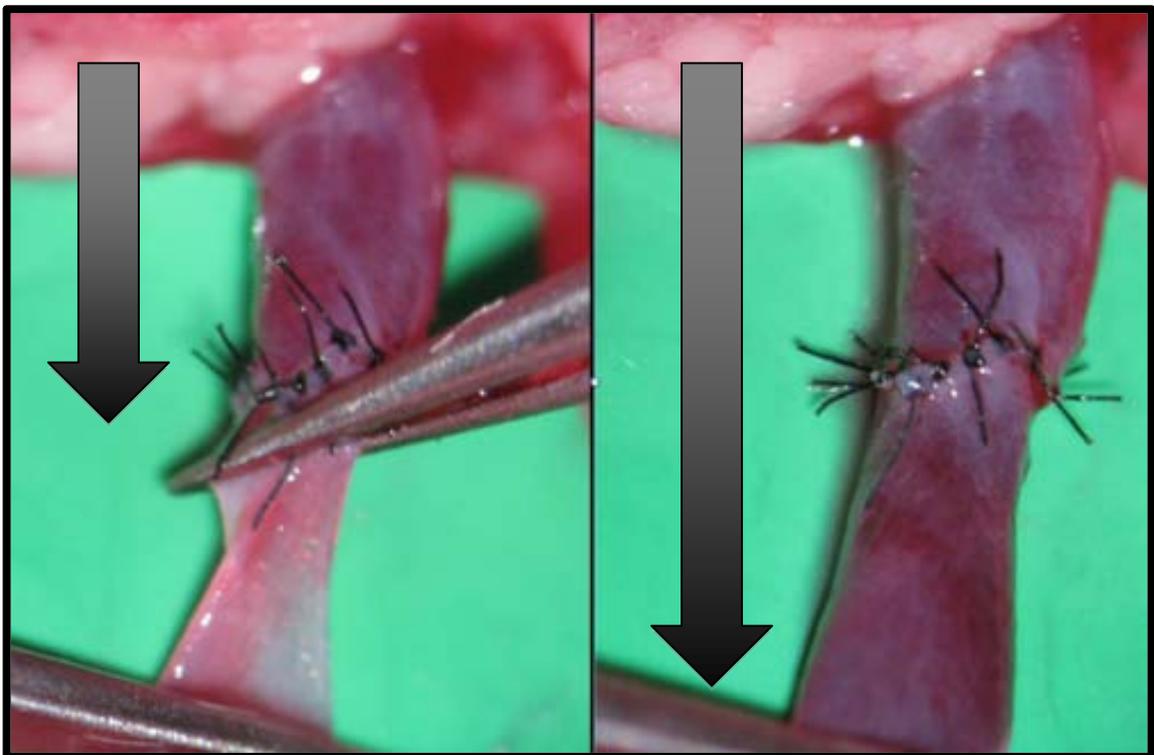


Figura 42. Test de permeabilidad anterógrado venoso positivo. En las venas no se realiza test de permeabilidad retrógrado debido a la interferencia que genera el sistema valvular venoso.

5.2.6 Estudio dificultad técnica de la microsutura

Intraoperatoriamente, se realizó una valoración de las complicaciones intraoperatorias o de la dificultad técnica de la microsutura vascular. Se registraron algunas variables como el tiempo de abordaje y disección de los vasos (minutos), el tiempo de clampaje de los vasos (minutos), el número de intentos de la microsutura hasta alcanzar la viabilidad de la microsutura (número), el número de puntos de sutura (número) y finalmente el tamaño de los vasos (milímetros).

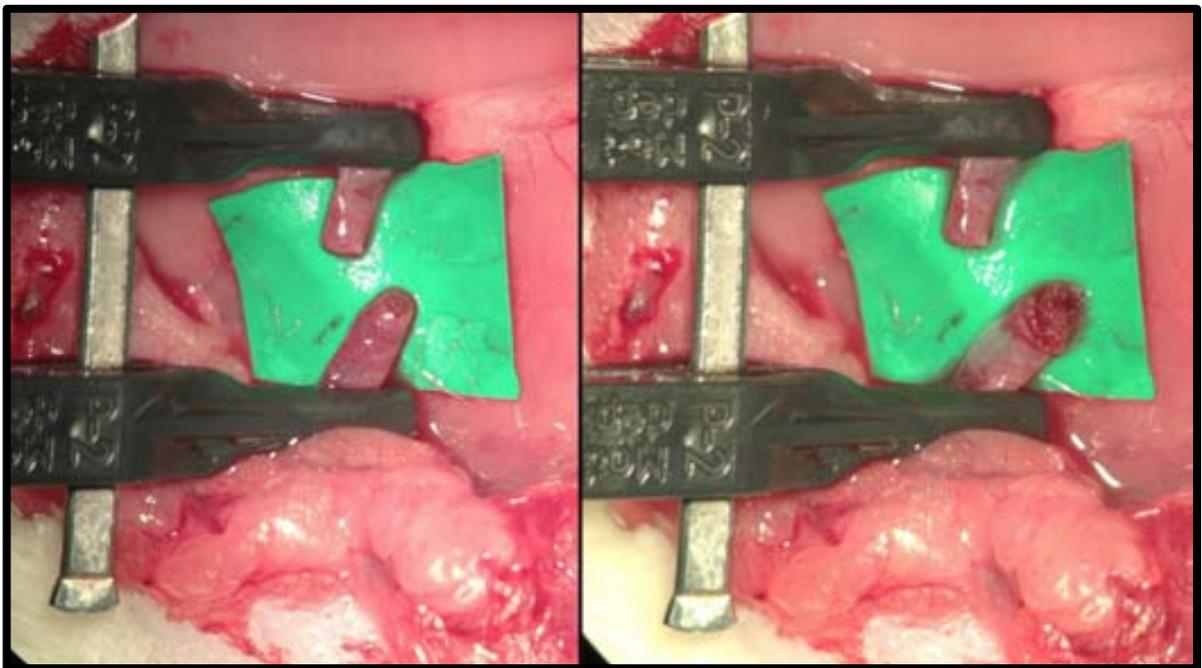


Figura 43. Trombosis aguda post microanastomosis en IRVE. Se retiró la sutura, se realizó trombectomía y resutura con correcta evolución.

5.2.7 Protocolo de eutanasia y obtención de muestras

Las cirugías, la evolución postoperatoria y la estabilización de las ratas se llevó a cabo en el Estabulario del Institut de Recerca Vall d'Hebron. IR-HUVH Número de Registro DMAH (Departamento de Medio Ambiente y Vivienda): B9900062.

Este procedimiento se realizaba cuatro semanas después de la intervención microquirúrgica vascular. Siguiendo el protocolo de anestesia general y una vez

anestesiada la rata se procedía a la inmovilización en la mesa operatoria y su posicionamiento en decúbito supino. Se realizaba la asepsia de la zona cervical y se montaba un campo estéril quirúrgico alrededor. Una vez preparado el material quirúrgico, se iniciaba el procedimiento con una incisión longitudinal cervical media y una incisión transversal siguiendo el eje de las clavículas. Se realizó una sección del platisma en línea con las incisiones cutáneas y elevación de dos colgajos triangulares de vértices supero-externos, y quedan debajo a la vista las glándulas submaxilares. En el centro del campo observamos los músculos esterno-tiroideos y lateralmente los músculos esterno-mastoideos, circundados externamente por la vena yugular externa. Entre ambos se disecaron la arteria carótida común junto al nervio vago.

Se realiza la valoración intraoperatoria de la permeabilidad de la microsutura vascular mediante el test de O'Brien o de la permeabilidad. Posteriormente se le administraba una dosis letal de 200 mg/kg de pentobarbital peritoneal. Se certificaba la muerte de la rata y se extraían ambas arterias carótida común, ambas venas yugulares internas, ambos nervios vagos, la laringe, la tráquea, el esófago y la glándula tiroidea para la evaluación histológica. Las muestras se lavaron con solución salina, se fijaron en formaldehído/formalina tamponada y se enviaron a anatomía patológica.

5.2.8 Protocolo de anatomía patológica

El estudio histopatológico se realizó en la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona.

En el laboratorio de anatomía patológica se procedía nuevamente al corte sagital y coronal de las muestras siguiendo el eje vascular de 0,5 mm. Las muestras posteriormente se deshidrataron, se incluyeron en parafina y se procedía a realizar

cortes de 4 micras de grosor mediante micrótomo electrónico. Estos cortes se montaban sobre portas y se procedía a su tinción de rutina con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson. Las muestras se analizaban mediante microscopio óptico (Olympus BX41).

La misma patóloga, la Dra. Cleofe Romagosa, del servicio de anatomía patológica del Hospital Vall d'Hebron, independiente al estudio, realizó todas las evaluaciones histológicas. El estudio fue ciego sin conocer el grupo de la muestra estudiada.

Para cada una de las estructuras estudiadas, ambas arterias carótidas comunes (lado irradiado y lado no irradiado), ambas venas yugulares internas (lado irradiado y lado no irradiado), ambos nervios vagos (lado irradiado y lado no irradiado), laringe, tráquea, esófago y glándula tiroides, se evaluaron los parámetros que están representados en la siguiente tabla, objetivando numéricamente los hallazgos histológicos, en cada una de las capas anatómicas estudiadas.

Tabla 4. Parámetros Histológicos Evaluados

Clasificación	Necrosis	PMNs	Células mononucleares	Edema	Tejido granulación	Celularidad
0	Ninguna	Normal	Normal	No	No	Normal (0%)
1	Pequeños parches	Incremento ligero	Incremento ligero	Ligero	Ligero	Discontinuidad
2	Grandes parches	Infiltración moderada	Infiltración moderada	Moderado	Moderado	Hiperplasia (1-25%)
3	Parches masivos	Masiva infiltración	Masiva infiltración	Severo	Severo	Hiperplasia severa (>25%)

Tabla 4. Parámetros histológicos evaluados (Necrosis, PMN, cel. Mononucleares, edema, granulación y celularidad) y estadiaje (0-3).

Tabla 5. Estructuras Histológicas Evaluadas

Arteria carótida	Vena yugular	Nervio vago	Tráquea	Esófago	Glándula tiroides
Endotelio	Endotelio	Endoneuro	Mucosa	Mucosa	Coloide
Íntima	Intima	Epineuro	Submucosa	Submucosa	Células foliculares
Media/Muscular	Media/ Muscular	Perineuro	Media	Media	Tejido conectivo
Adventicia	Adventicia	Vasa nervorum	Túnica adventicia	Túnica adventicia	Cápsula

Tabla 5. Estructuras histológicas y estratos correspondientes estudiados por cada animal del modelo preclínico de irradiación cervical seguro (arteria, vena y nervio bilateral).

5.2.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS 18.0. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) y se analizaron mediante análisis de varianza de Kruskal Wallis. Se utilizó una prueba de Mann-Whitney para evaluar la importancia de las diferencias de medias entre los grupos. Se aceptó una diferencia significativa en $p < 0,05$.

5.2.10 Distribución de los animales

1) Modelo preclínico seguro de irradiación cervical seguro

- Cálculo muestral inicial
 - Se acepta error tipo I o falsos positivos como 5%.
 - Se acepta error tipo II o falsos negativos como 20% (potencia del 80%).
 - Cálculos según porcentaje de mortalidad:

- No irradiado 5%, irradiado 30%, alfa 5% y beta 20%: 24 animales por grupo.
- Potencia del estudio (inverso del % de falsos negativos):
 - No irradiado 5%, irradiado 30%, 24 animales por grupo: potencia 80%, falsos negativos 20%.
- Grupo 1 (grupo no irradiado/control)
 - 6 semanas seguimiento clínico.
 - N = 24.
- Grupo 2 (grupo irradiado/evaluación efectos agudos postRT)
 - 2 semanas seguimiento postRT cervical 20 Gy.
 - N = 24.
- Grupo 3 (grupo irradiado/evaluación efectos subagudos postRT)
 - 6 semanas seguimiento clínico postRT cervical 20 Gy.
 - N = 24.

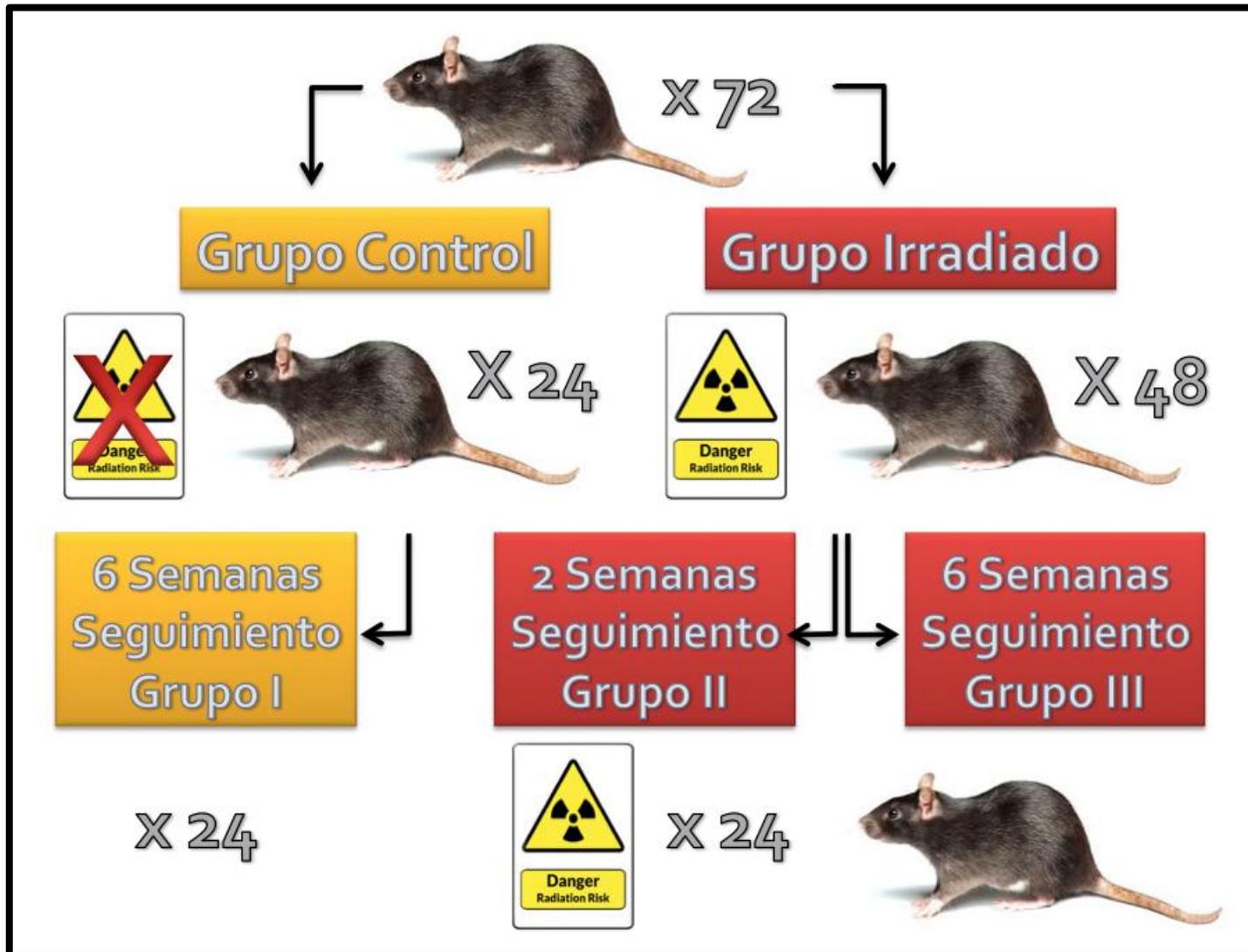


Figura 44. Distribución de animales por grupo en modelo preclínico seguro de irradiación cervical.

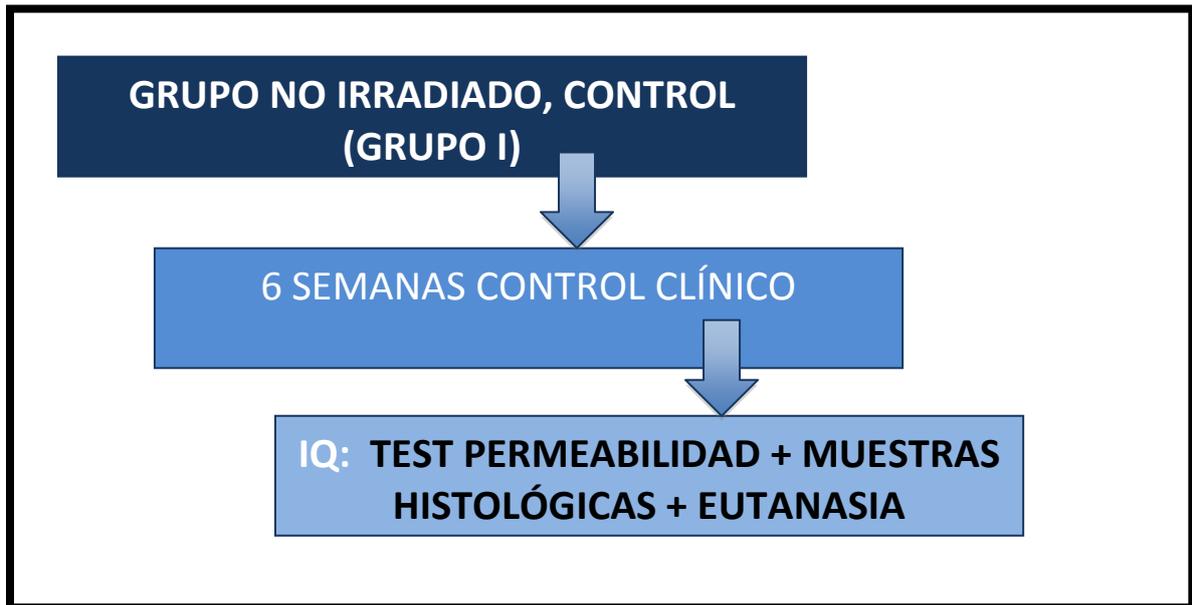


Figura 45. Distribución trabajo grupo I. Modelo preclínico seguro de irradiación cervical.

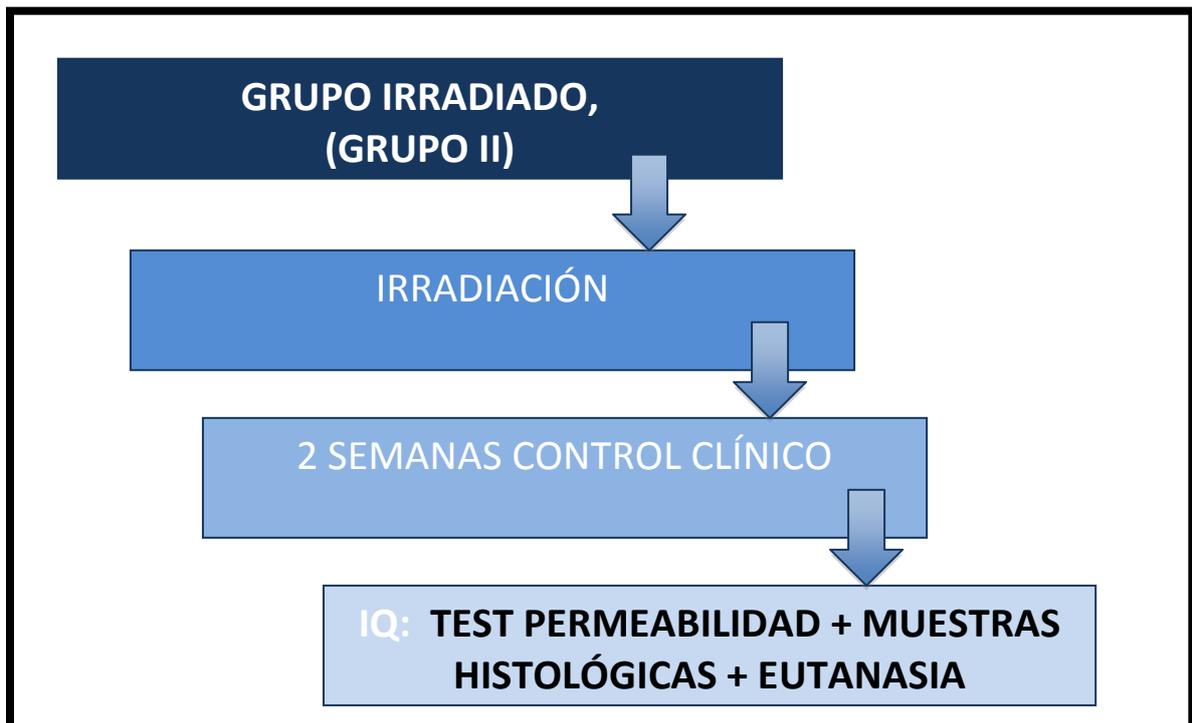


Figura 46. Distribución trabajo grupo II. Modelo preclínico seguro de irradiación cervical.

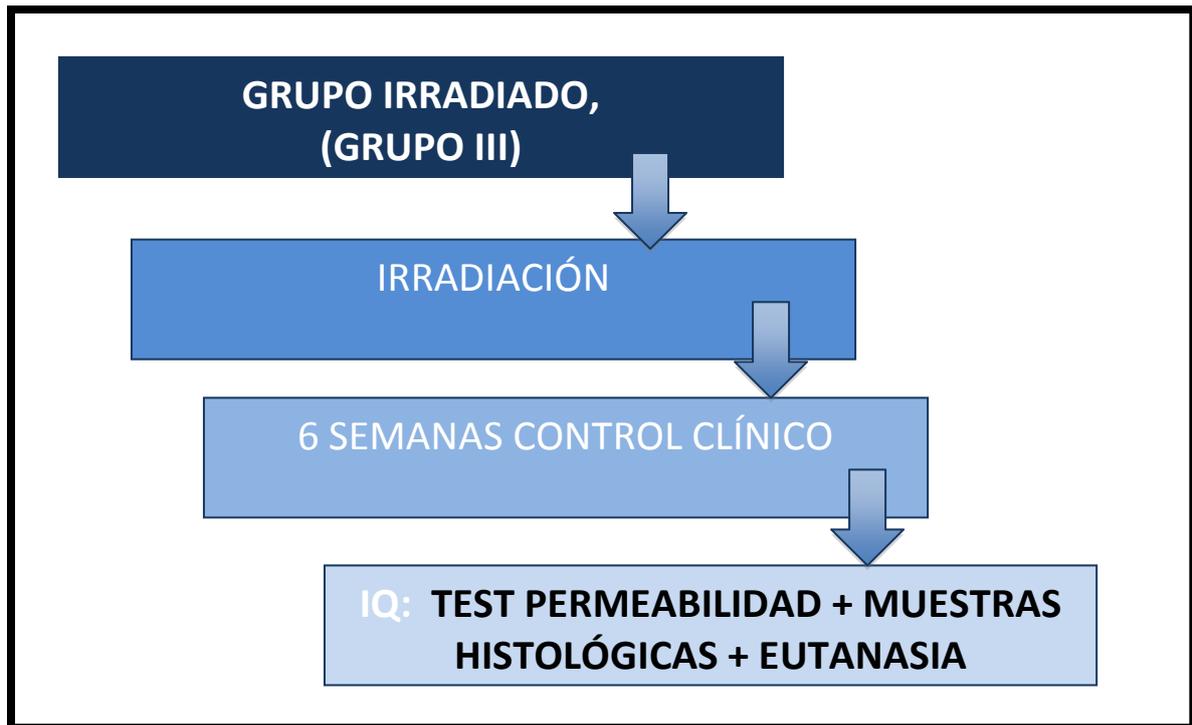


Figura 47. Distribución trabajo grupo III. Modelo preclínico seguro de irradiación cervical.

2) Estudio sobre la viabilidad de la anastomosis vascular microquirúrgica en población irradiada

- Cálculo muestral inicial
 - Se acepta error tipo I o falsos positivos como 5%.
 - Se acepta error tipo II o falsos negativos como 20% (potencia del 80%).
 - Cálculos según porcentaje de trombosis venosa:
 - No irradiado 10%, irradiado 30%, alfa 5% y beta 20%: 35 animales.
 - Potencia del estudio (inverso del % de falsos negativos):
 - No irradiado 10%, irradiado 30%, 35 animales por grupo: potencia 75%, falsos negativos 25%.
- Grupo IR (irradiado) = grupo IRAR + grupo IRVE
- Formado por 70 ratas.

- **Grupo IRAR (irradiado arterial)**
 - Irradiación cervical 20 Gy.
 - 2 semanas postRT, en 35 de esas ratas se realizará una arteriotomía y posteriormente una anastomosis microquirúrgica arterial término-terminal.
 - 4 semanas de seguimiento postoperatorio.
- **Grupo IRVE (irradiado venoso)**
 - Irradiación cervical 20 Gy.
 - 2 semanas postRT, en las otras 35 ratas, se realizará una venotomía y posteriormente una anastomosis microquirúrgica venosa término-terminal.
 - 4 semanas de seguimiento postoperatorio.
- Grupo NIR (no irradiado/control) = grupo NIRAR + grupo NIRVE
- Formado por 70 ratas.
 - **Grupo NIRAR (no irradiado arterial)**
 - En 35 de esas ratas se realizará una arteriotomía y posteriormente una anastomosis microquirúrgica arterial término-terminal.
 - 4 semanas de seguimiento postoperatorio.
 - **Grupo NIRVE (no Irradiado venoso)**
 - En las otras 35 ratas, se realizará una venotomía y posteriormente una anastomosis microquirúrgica venosa término-terminal.
 - 4 semanas de seguimiento postoperatorio.

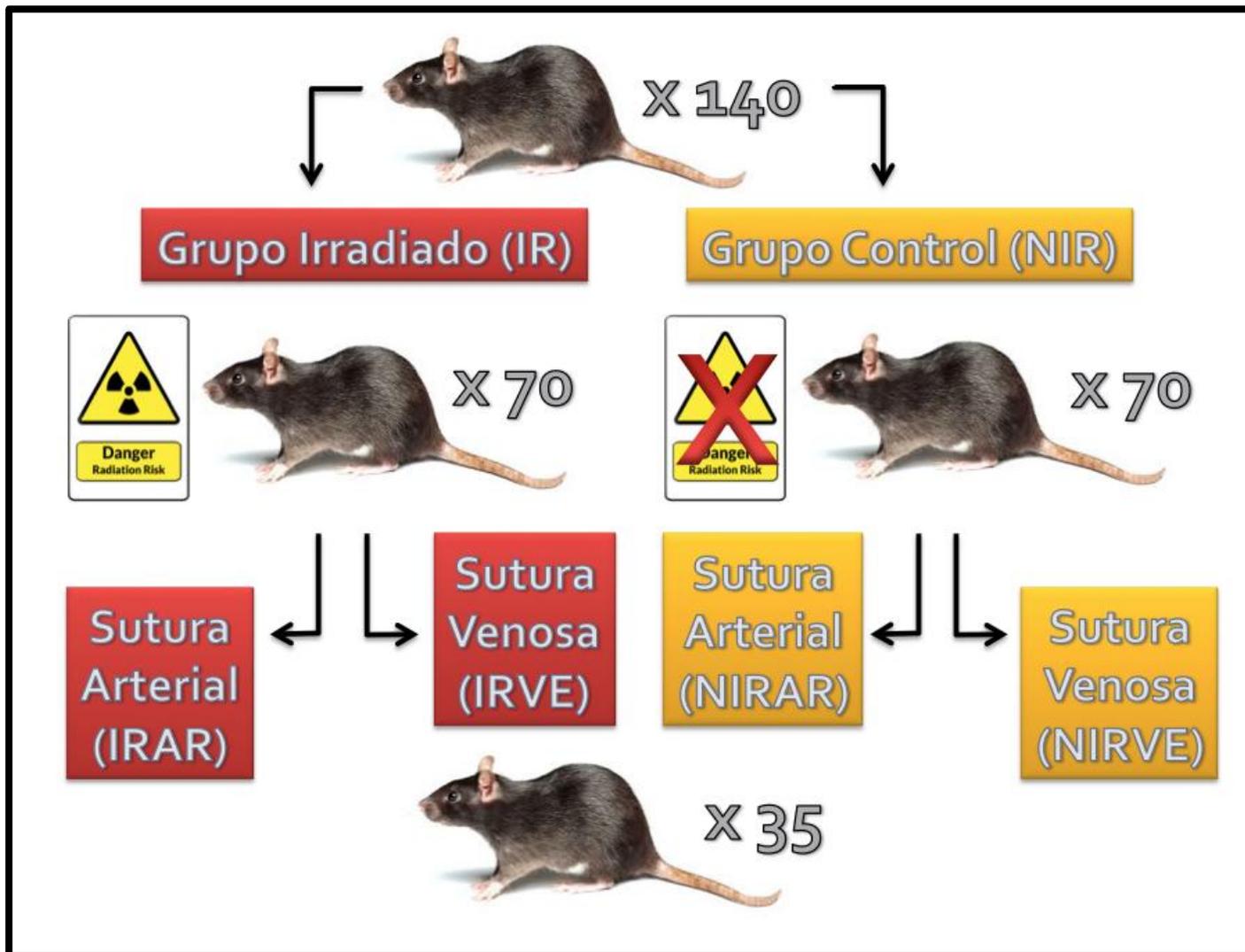


Figura 48. Distribución de animales por grupo. Estudio de viabilidad de la anastomosis vascular en población irradiada.

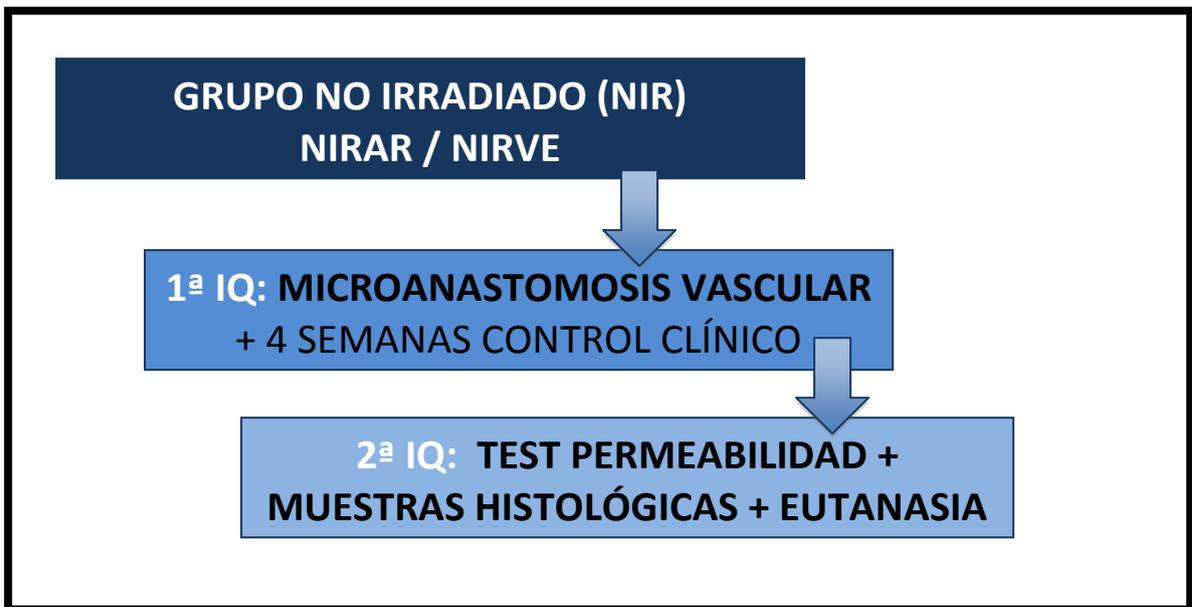


Figura 49. Distribución trabajo grupo no irradiado (NIR)) arterial (NIRAR) y venoso (NIRVE).

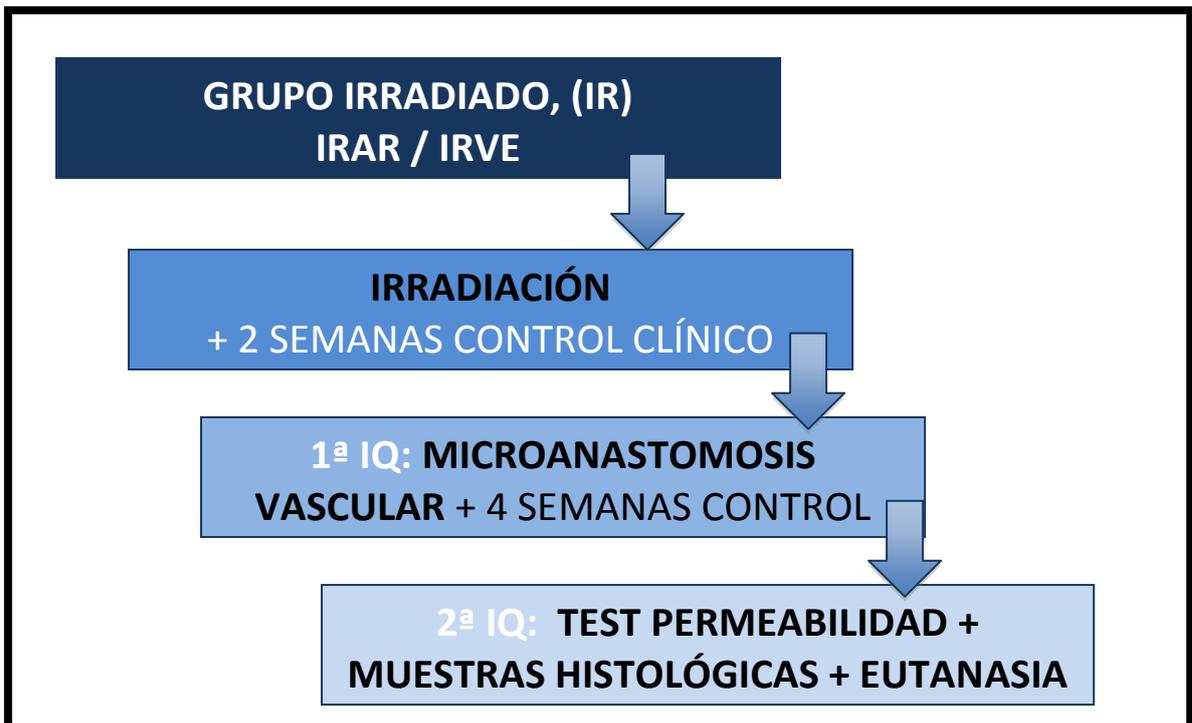


Figura 50. Distribución trabajo grupo irradiado (IR) arterial (IRAR) y venoso (IRVE).

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Modelo preclínico seguro de irradiación cervical

6.1.1 Evaluación Clínica

○ Grupo I:

- Ningún animal desarrolló complicaciones agudas (2 semanas de seguimiento clínico) o subagudas (6 semanas de seguimiento clínico).
- Los animales presentaban un pelaje suave, sin necrosis local, radiodermatitis o descamación epidérmica durante las 6 semanas de seguimiento.
- No signos de mucositis orofaríngea o úlceras bucales.
- Todos los animales presentaron una conducta normal sin objetivar alteraciones conductuales.

○ Grupo II:

- Dos animales desarrollaron complicaciones postRT agudas (2 semanas postRT).
- Los animales presentaban un pelaje suave, sin necrosis local, radiodermatitis o descamación epidérmica durante las 2 semanas de seguimiento.
- Signos de mucositis orofaríngea y úlceras bucales en 2 animales.
- Todos los animales presentaron una conducta normal sin objetivar alteraciones agudas tras la RT.

- **Grupo III:**
 - Dos animales desarrollaron complicaciones postRT agudas (2 semanas postRT).
 - Un animal desarrolló complicaciones postRT subagudas (2-6 semanas postRT).
 - Los animales presentaban un pelaje suave, sin necrosis local, radiodermatitis o descamación epidérmica durante las 2 primeras semanas de seguimiento.
 - Posteriormente, entre la 2ª y 6ª semanas todas las ratas (24/24) desarrollaron radiodermatitis de la zona RT, sin necrosis local del tejido.
 - Signos de mucositis orofaríngea y úlceras bucales en 2 animales.
 - Todos los animales presentaron una conducta normal sin objetivar alteraciones agudas tras la RT.

6.1.2 Peso

- Hasta el periodo final del estudio, se registró un aumento progresivo del peso corporal para el grupo control (I) y para los grupos postRT (II, III) (Tabla I).
- *Sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p>0,05$).*

Tabla 6. Peso Corporal medio (gr) Modelo RT cervical

	Inicial	2 semanas	4 semanas	6 semanas
Grupo I	256,2 +/- 12,1	298,5 +/- 16,2	396,2 +/- 22,1	485,4 +/- 28,5
Grupo II	252,4 +/- 11,2	294,2 +/- 17,9	-	-
Grupo III	261,1 +/- 10,8	303,1 +/- 14,8	398.6 +/- 19,4	499,2 +/- 29,5

Tabla 6. Distribución de peso por grupos y temporalidad. La evolución del peso fue homogénea entre los diferentes grupos, sin observar diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Gráfico 1. Peso por grupos. Modelo RT cervical animal

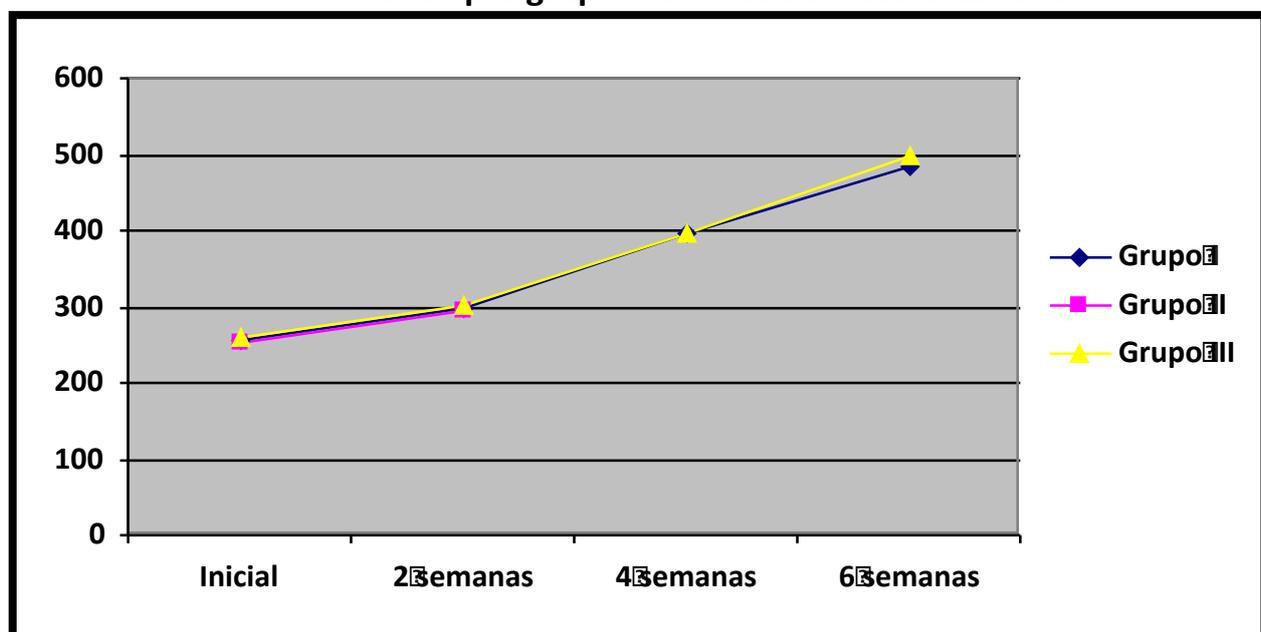


Gráfico 1. La evolución del peso fue homogénea entre los diferentes grupos, sin observar diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

6.1.3 Permeabilidad vascular

○ Arterial:

- Todas las arterias carótidas comunes revisadas presentaron un test de permeabilidad positivo anterógrado y retrógrado (grupos I, II y III bilateral, $(24 \times 2) \times 3 = 144/144 = 100\%$).
- En ningún caso se observó bajo microscopio quirúrgico trombosis arterial,

aneurismas o pseudoaneurismas arteriales (0/144 = 0%).

- Se pudo observar de forma macroscópica (no objetivada), un mayor sangrado intraoperatorio, durante la disección de las arterias irradiadas (grupos II, III izquierdas) respecto a las contralaterales (grupos II, III derechas) y respecto a las no irradiadas (grupo I, izquierdas y derechas).
- También se pudo observar de forma macroscópica mayor fibrosis de los tejidos en los grupos irradiados con mayor tiempo de seguimiento (grupo III) respecto a los grupos irradiados con menor tiempo de seguimiento (grupo II) o no RT (grupo I y paquete derecho grupos II-III).

○ **Venoso:**

- Todas las venas yugulares externas revisadas presentaron un test de permeabilidad positivo anterógrado (grupos I, II y III bilateral, $(24 \times 2) \times 3 = 144/144 = 100\%$).
- En ningún caso se observó bajo microscopio quirúrgico trombosis venosa, aneurismas o pseudoaneurismas venosos (0/144 = 0%).
- Se pudo observar de forma macroscópica, un mayor sangrado intraoperatorio (no objetivado), durante la disección de las venas irradiadas (grupos II, III izquierdas) respecto a las contralaterales (grupos II, III derechas) y respecto a las no irradiadas (grupo I, izquierdas y derechas).
- También se pudo observar de forma macroscópica mayor fibrosis de los tejidos en los grupos irradiados con mayor tiempo de seguimiento (grupo III) respecto a los grupos irradiados con menor tiempo de seguimiento (grupo II) o no RT (grupo I y paquete derecho grupos II-III).

- Sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Test χ^2 , $p > 0,05$).

Tabla 7. Permeabilidad vascular. Modelo RT cervical

	Arteria no RT	Arteria RT	Vena No RT	Vena RT
Grupo I	24/24 (100%)	24/24 (100%)	24/24 (100%)	24/24 (100%)
Grupo II	24/24 (100%)	24/24 (100%)	24/24 (100%)	24/24 (100%)
Grupo III	24/24 (100%)	24/24 (100%)	24/24 (100%)	24/24 (100%)

Tabla 7. Permeabilidad vascular (arterial y venosa) irradiada (izquierda) y no irradiada (contralateral). Permeabilidad del 100% en todas las muestras.

Gráfico 2. Permeabilidad vascular por grupos. Modelo RT animal

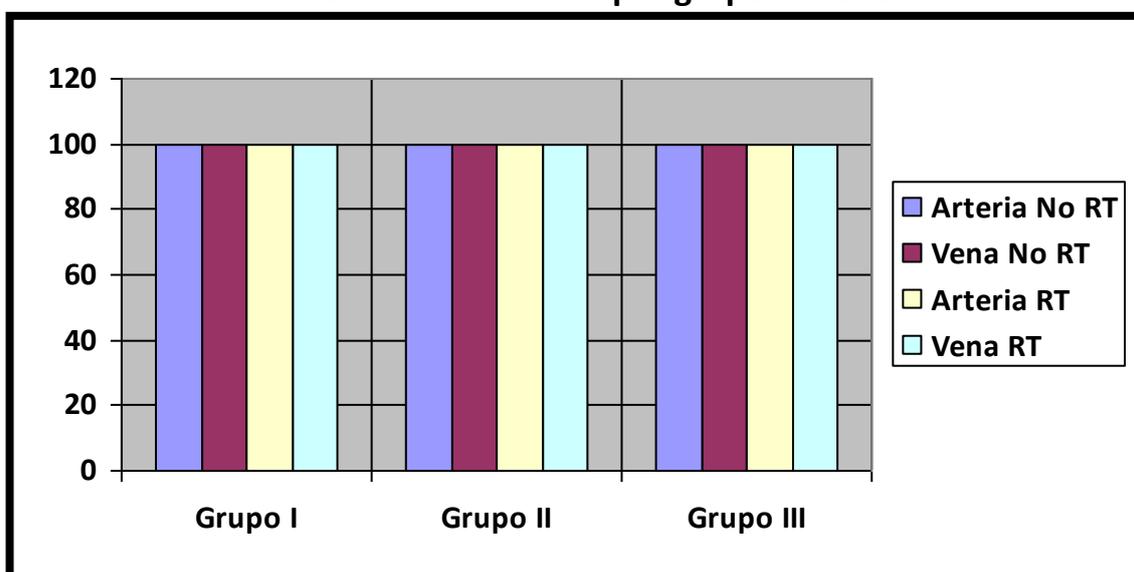


Gráfico 2. La permeabilidad vascular (arterial y venosa) fue homogénea entre los diferentes grupos, sin observar diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

6.1.4 Supervivencia/Mortalidad

- **Grupo I:** supervivencia 100% animales, durante 6 semanas.
- **Grupo II:** supervivencia 91,7% animales, durante 2 semanas. Dos animales

muertos durante la fase aguda postRT (2 semanas).

- **Grupo III:** supervivencia 87,5% animales, durante 6 semanas. Dos animales muertos durante la fase aguda postRT (2 semanas). Un animal muerto en la fase subaguda postRT (2-4 semanas).
- *Diferencias estadísticamente significativas entre grupos I y III ($p>0,05$).*

Tabla 8. Supervivencia/Mortalidad		
	Supervivencia	Mortalidad
Grupo I	24/24 (100%)	0/24 (0%)
Grupo II	22/24 (91,7%)	2/24 (8,3%)
Grupo III	21/24 (87,5%)	3/24 (12,5%)

Tabla 8. Supervivencia y mortalidad en modelo RT cervical. Observamos un aumento de la mortalidad en el grupo III (RT control 6 semanas) respecto al grupo control.

Gráfico 3. Supervivencia/Mortalidad por grupos. Modelo RT animal

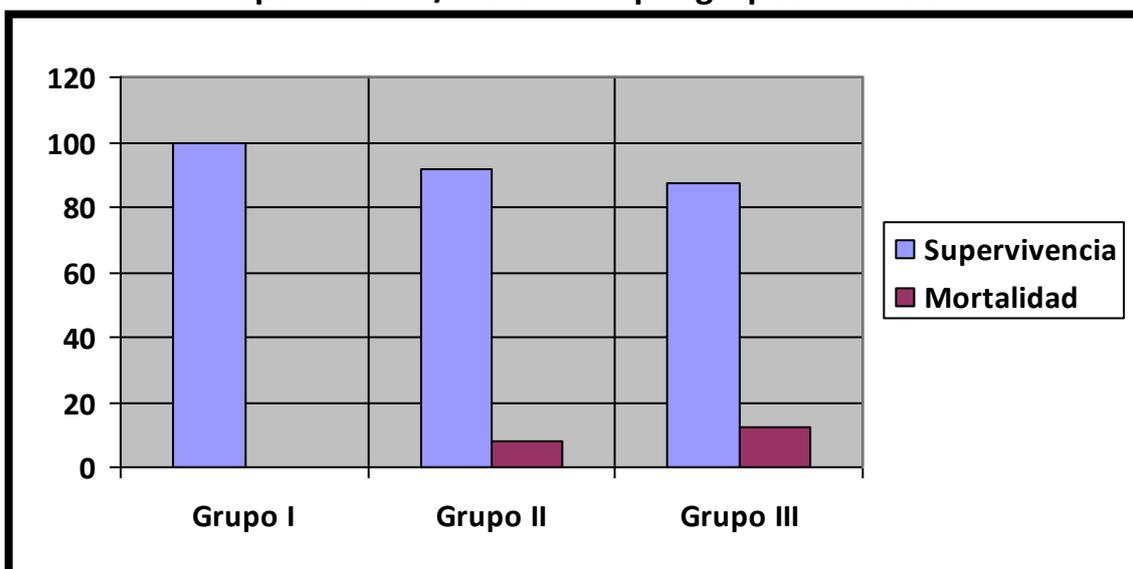


Gráfico 3. La mortalidad fue superior en el grupo irradiado y controlado durante 6 semanas, respecto al grupo no irradiado (grupo I). Diferencias estadísticamente significativas.

6.1.5 Estudios histológicos

1) Arteria carótida común

- El estudio de anatomía patológica de las arterias control (no irradiadas) obtenidos del grupos I bilateral, del grupo II lado no RT y del grupo III lado no RT, mostró unos especímenes con la histología típica arterial normal. No se evidenció ningún tipo de lesión a consecuencia de cualquiera de las manipulaciones o técnicas utilizadas durante el estudio.
- Cambios significativos entre el grupo no irradiado (grupo I bilateral, grupo II lado no RT y grupo III lado no RT) y los grupos irradiados (grupo II lado RT y grupo III lado RT).
- Capa endotelial:
 - Discontinuidad y disminución de la celularidad, incluso en algunas muestras (8/48 = 16.7%) no se hallaron células endoteliales. Grupo II (lado RT) y Grupo III (lado RT).
 - Sin cambios histológicos destacables en Grupo I (bilateral) y Grupo II y III (lado no RT).
 - Sin diferencias histológicas entre Grupo II y III.
- Capa íntima:
 - Diferencias histológicas entre Grupo II y III. La capa íntima presentó una proliferación hiperplásica progresiva que aumentó del 0% en la 2ª semana (Grupo II) al 1-25% en la 6ª semana (Grupo III).

- Sin cambios histológicos destacables en el grupo I (bilateral) y los grupos II y III (lado no RT).

- Capa media:
 - Diferencias histológicas entre los grupos II y III. La capa media presentó una disminución progresiva del número de células musculares y una vacuolización de las mismas, que disminuyeron de la 2ª semana (grupo II) a la 6ª semana (grupo III).
 - Sin cambios histológicos destacables en grupo I (bilateral) y grupo II y III (lado no RT).

- Capa adventicia:
 - Diferencias histológicas entre los grupos II y III. La capa adventicia presentó edema, fibrosis e infiltración por leucocitos polimorfonucleares, que aumentó del 0% en la 2ª semana (grupo II) al 1-25% en la 6ª semana (grupo III).
 - Sin cambios histológicos destacables en el grupo I (bilateral) y los grupos II y III (lado no RT).

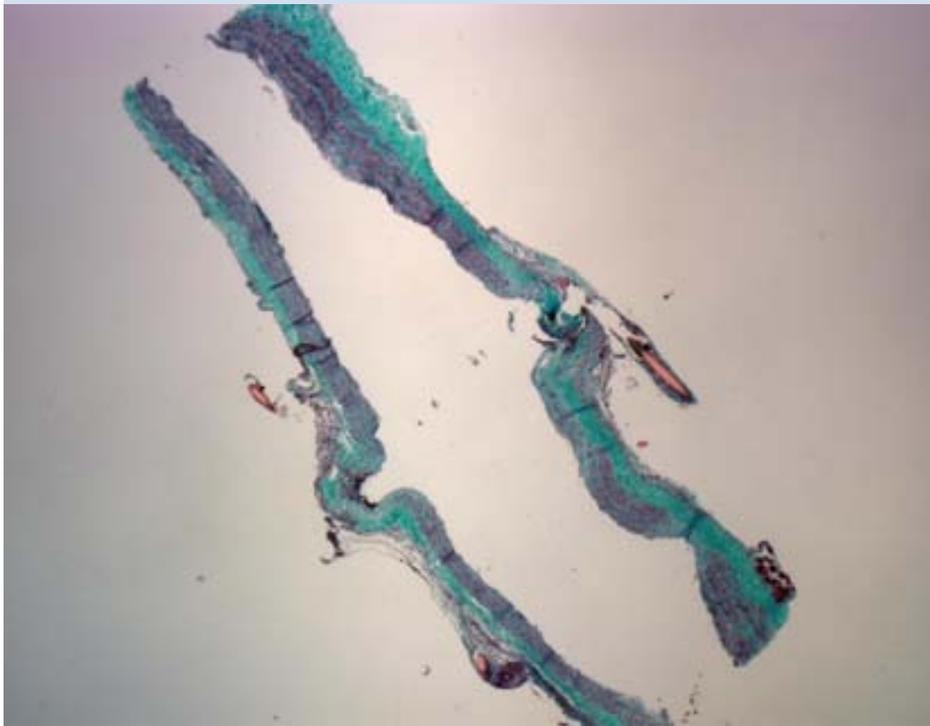
Tabla 9. Resultados medios histológicos arteriales carótida común. Modelo animal RT.

Capa	Lateralidad	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Endotelial	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Discontinuidad	Discontinuidad
Íntima	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Normal	Hiperplasia 1-25%
Media	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Vacuolización Aplasia muscular ligera	Vacuolización Aplasia muscular moderada
Adventicia	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Edema ligero PMN ligero Granulación ligera	Edema moderado PMN moderado Granulación moderado

Tabla 9. Resultados histológicos arteriales divididos por estratos y grupos. Observamos cambios en los tejidos irradiados respecto a los no irradiados, y cambios más marcados con el tiempo de evolución (grupo III respecto grupo I). En negrita se han destacado los cambios más significativos.

Tabla 10. Modelo RT animal. Histología arterial. Grupo I

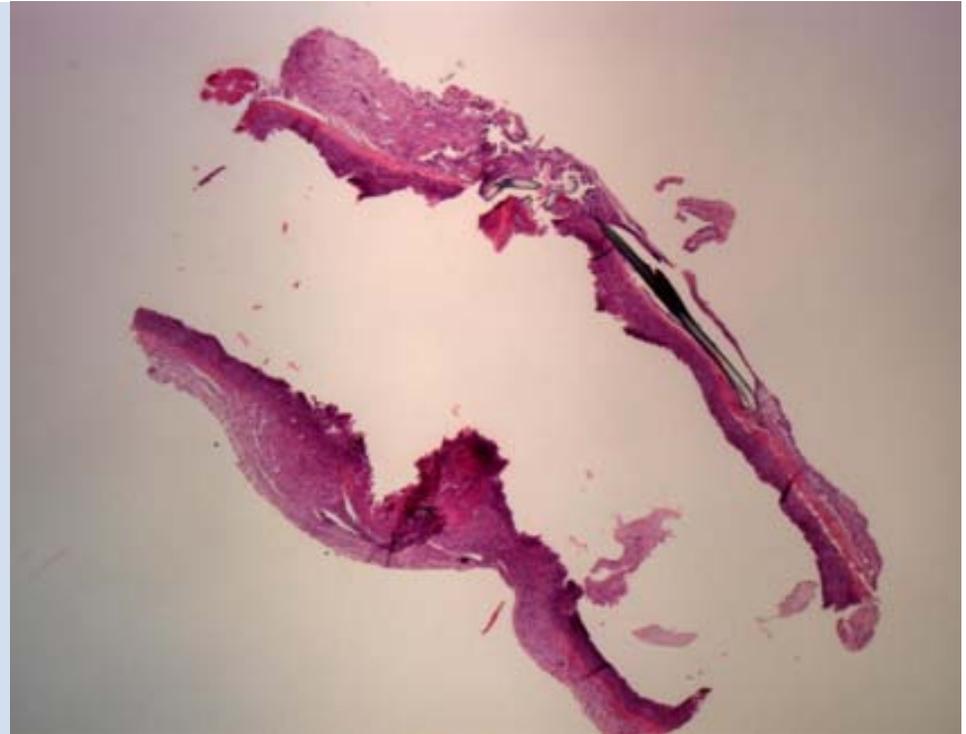
Grupo no irradiado



Muestra histológica arterial. Tinción tricrómico Masson, corte longitudinal 4x.

No se observan alteraciones histológicas en la estructura vascular.

Grupo no irradiado



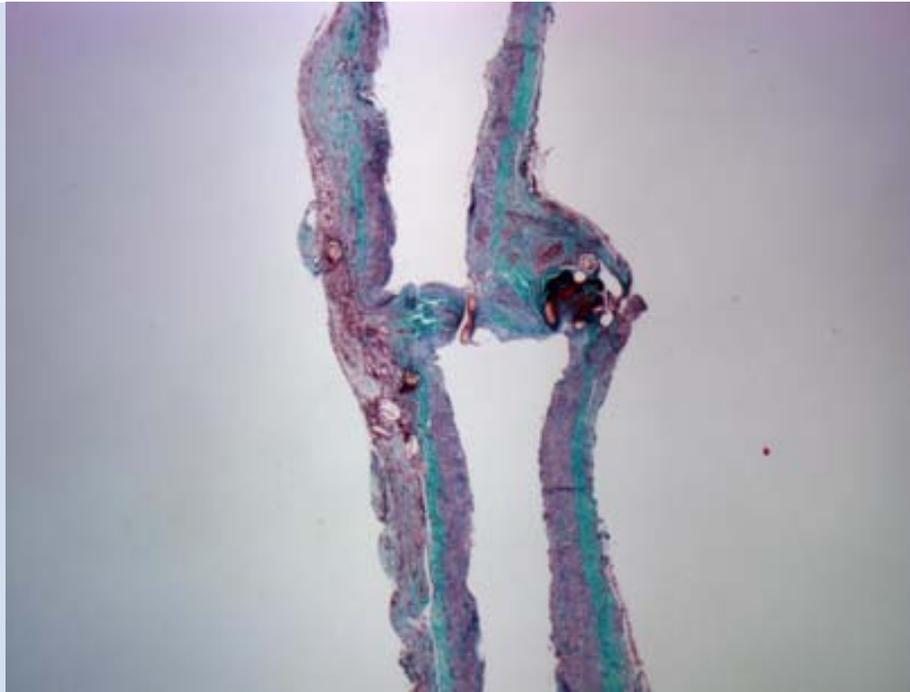
Muestra histológica arterial. Tinción H-E, corte longitudinal 4x.

No se observan alteraciones histológicas en la estructura vascular.

Tabla 10. Comparación histológica arterial grupo I. Muestras no irradiadas. Sin cambios histológicos destacables entre ambas muestras.

Tabla 11. Modelo RT animal. Histología arterial. Grupo II (RT + 2 semanas)

Grupo no irradiado



Muestra histológica arterial. Tinción tricrómico Masson, corte longitudinal, 4x.
No se observan alteraciones histológicas en la estructura vascular.

Grupo irradiado

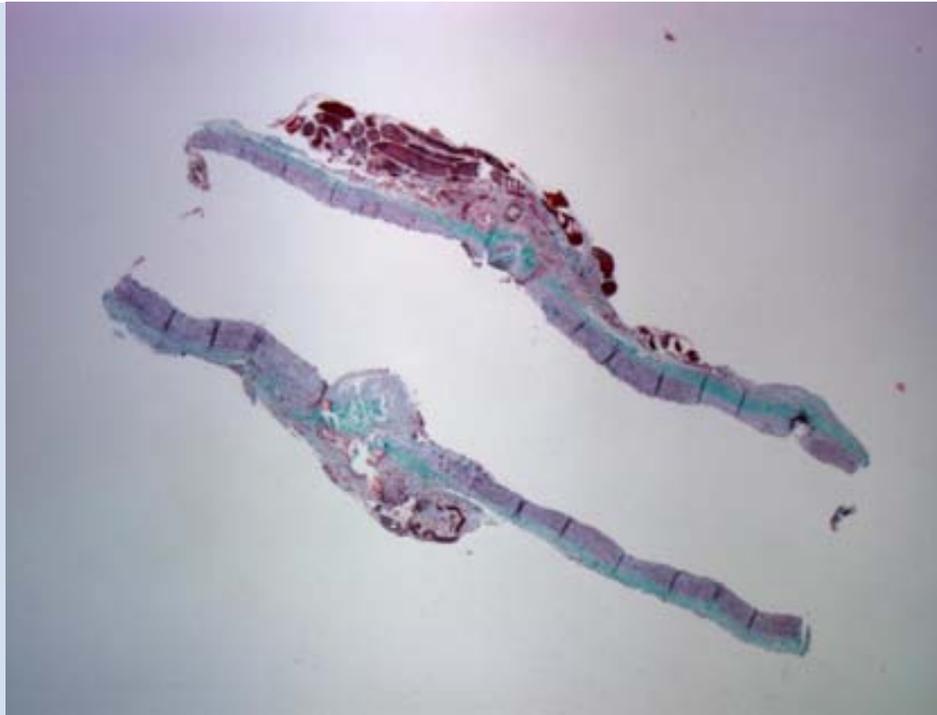


Muestra histológica arterial. Tinción H-E, longitudinal, 4x.
Se observa discontinuidad de la capa endotelial.
Hiperplasia de la capa íntima.
Aplasia de la capa muscular.
Fibrosis de la capa adventicia.

Tabla 11. Comparación histológica arterial grupo II. Muestra no irradiada vs. irradiada. Observamos cambios moderados en la muestra arterial irradiada.

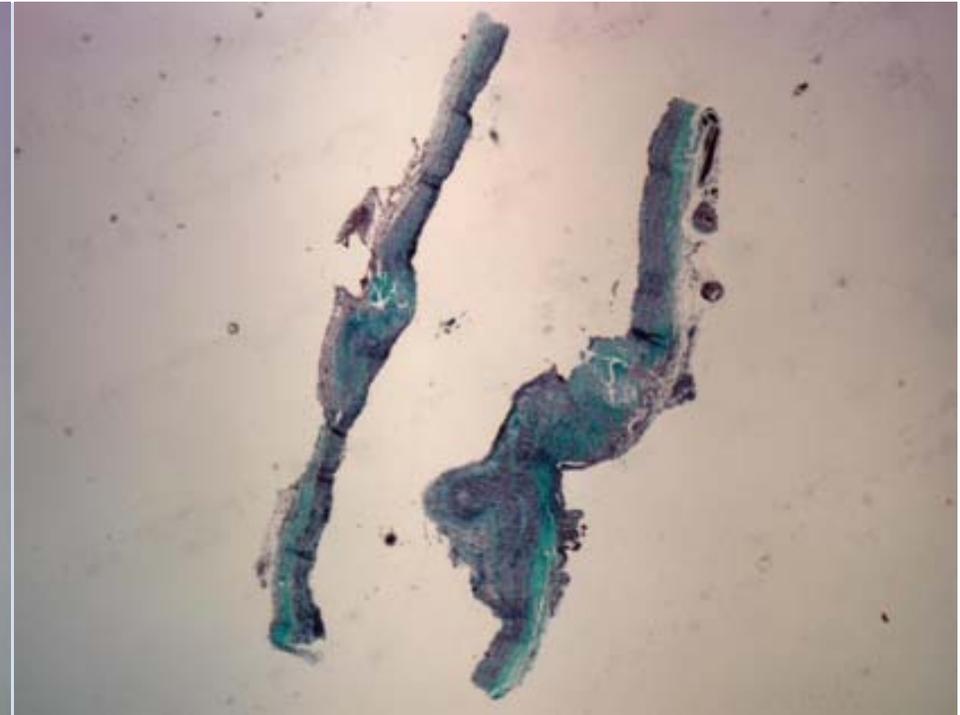
Tabla 12. Modelo RT animal. Histología arterial. Grupo III (RT + 6 semanas)

Grupo no irradiado



Muestra histológica arterial. Tinción tricrómico Masson, corte longitudinal, 4x.
No se observan alteraciones histológicas en la estructura vascular.

Grupo irradiado



Muestra histológica arterial. Tinción TCM, longitudinal, 4x.
Se observa discontinuidad de la capa endotelial.
Hiperplasia moderada de la capa íntima.
Aplasia moderada de la capa muscular.
Fibrosis severa de la capa adventicia.

Tabla 12. Comparación histológica arterial grupo III. Muestra no irradiada vs. irradiada. Observamos cambios moderados en la muestra arterial irradiada.

2) Vena yugular externa:

- El estudio de anatomía patológica de las venas control (no irradiadas) obtenidos del grupo I bilateral, del grupo II lado no RT y del grupo III lado no RT, mostró unos especímenes con la histología típica venosa normal. No se evidenció ningún tipo de lesión a consecuencia de alguna de las manipulaciones o técnicas utilizadas durante el estudio.
- Cambios significativos entre los grupos no irradiados (grupo I bilateral, grupo II lado no RT y grupo III lado no RT) y los grupos irradiados (grupo II lado RT y grupo III lado RT).

- Capa endotelial:

- Discontinuidad y disminución de la celularidad. No se hallaron células endoteliales en el 54% de las muestras ($26/48 = 54\%$): grupo II (lado RT) y grupo III (lado RT).
- Sin cambios histológicos destacables en el grupo I (bilateral) ni los grupos II y III (lado no RT).
- Sin diferencias histológicas entre los grupos II y III.

- Capa íntima:

- Diferencias histológicas entre los grupos II y III. La capa íntima presentó una proliferación hiperplásica progresiva que aumentó del 1-25% en la 2ª semana (grupo II) al >25% en la 6ª semana (grupo III).
- Sin cambios histológicos destacables en el grupo I (bilateral) y los grupos II y III (lado no RT).

- Capa media:
 - Diferencias histológicas entre los grupos II y III. La capa media presentó una disminución progresiva del número de células musculares y vacuolización de las mismas, que disminuyeron de la 2ª semana (grupo II) a la 6ª semana (grupo III).
 - Sin cambios histológicos destacables en el grupo I (bilateral) y los grupos II y III (lado no RT).

- Capa adventicia:
 - Diferencias histológicas entre los grupos II y III. La capa adventicia presentó edema, fibrosis e infiltración por leucocitos polimorfonucleares que aumentó del 0% en la 2ª semana (grupo II) al 1-25% en la 6ª semana (grupo III).
 - Sin cambios histológicos destacables en el grupo I (bilateral) y los grupos II y III (lado no RT).

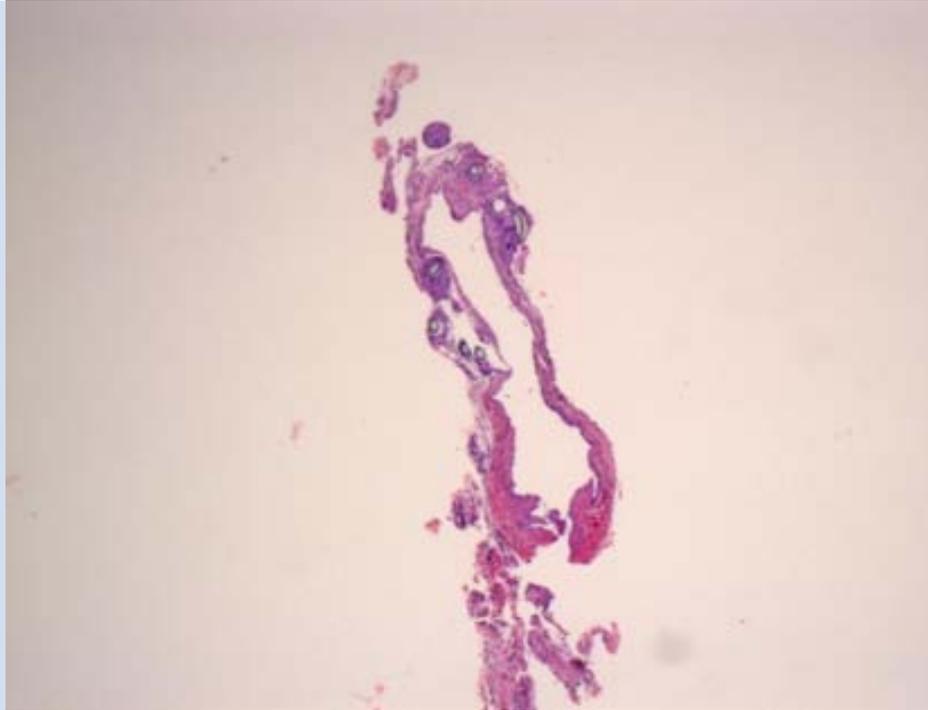
Tabla 13. Resultados Medios Histológicos Venosos Yugular Externa. Modelos RT cervical

Capa	Lateralidad	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Endotelial	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Discontinuidad	Discontinuidad
Íntima	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Hiperplasia 1-25%	Hiperplasia >25%
Media	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Vacuolización Aplasia muscular ligera	Vacuolización Aplasia muscular moderada
Adventicia	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Edema ligero PMN ligero Granulación ligera	Edema moderado PMN moderado Granulación moderada

Tabla 13. Resultados histológicos venosos divididos por estratos y grupos. Observamos cambios en los tejidos irradiados respecto a los no irradiados, y cambios más marcados con el tiempo de evolución (grupo III respecto grupo I). En negrita se han destacado los cambios más significativos.

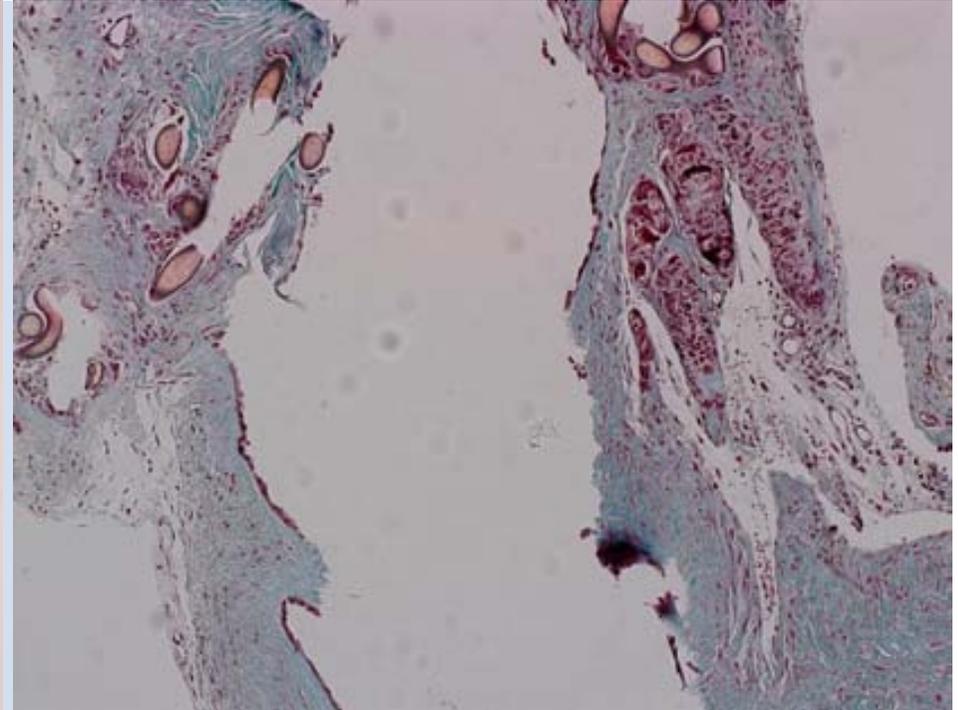
Tabla 14. Modelo RT animal. Histología venosa. Grupo I (control, no RT)

Grupo no irradiado



Muestra histológica venosa. Tinción H-E, transversal, 4x.
No se observan alteraciones histológicas en la estructura vascular.

Grupo no irradiado

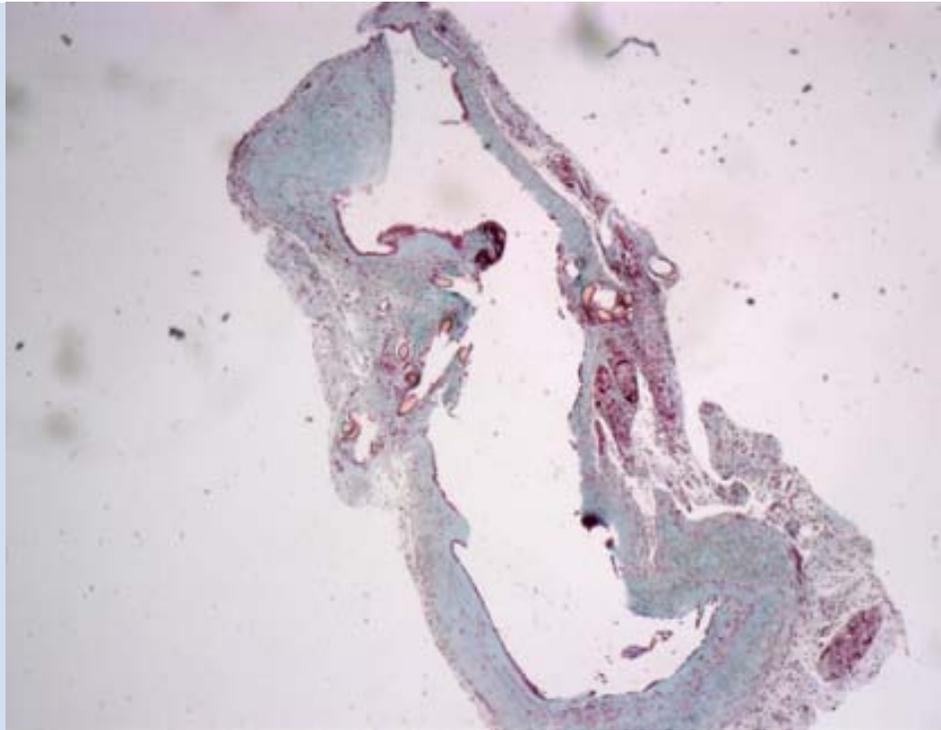


Muestra histológica venosa. Tinción TCM, transversal, 10x.
No se observan alteraciones histológicas en la estructura vascular.

Tabla 14. Comparación histológica venoso grupo I. Muestras no irradiadas. Sin cambios histológicos destacables entre ambas muestras.

Tabla 15. Modelo RT animal. Histología venosa. Grupo II (RT + 2 semanas)

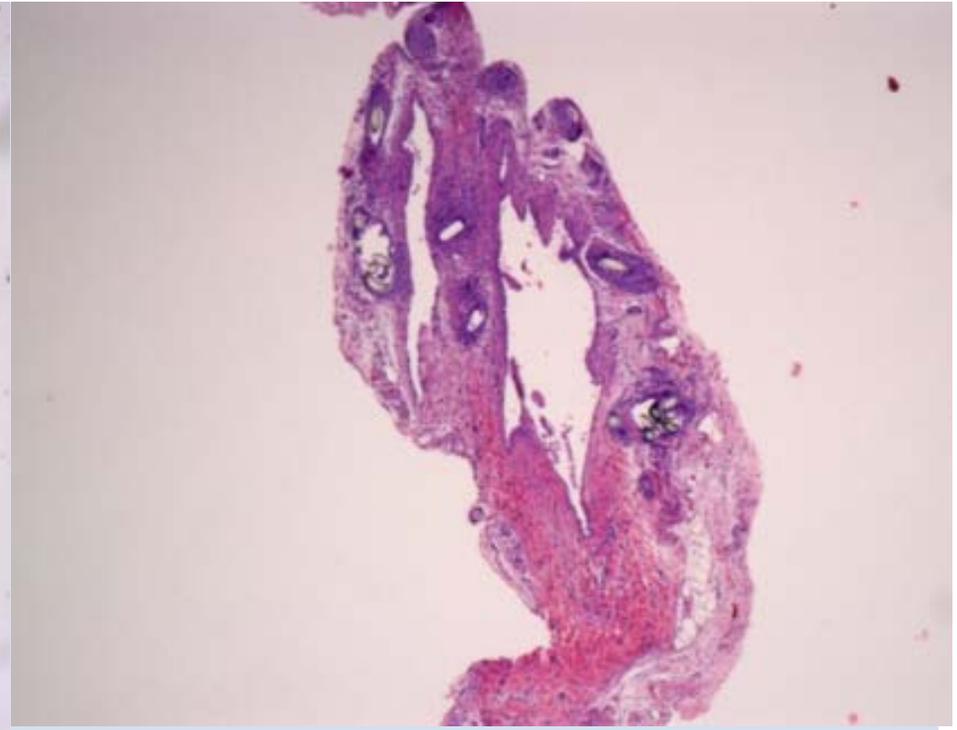
Grupo no irradiado



Muestra histológica venosa. Corte Transversal.
Tinción Tricrómico Masson 4x.

No se observan alteraciones histológicas en la estructura vascular.

Grupo irradiado



Muestra histológica venosa. Transversal. Tinción H-E, 4x.
Se observa discontinuidad de la capa endotelial.

Hiperplasia de la capa íntima.

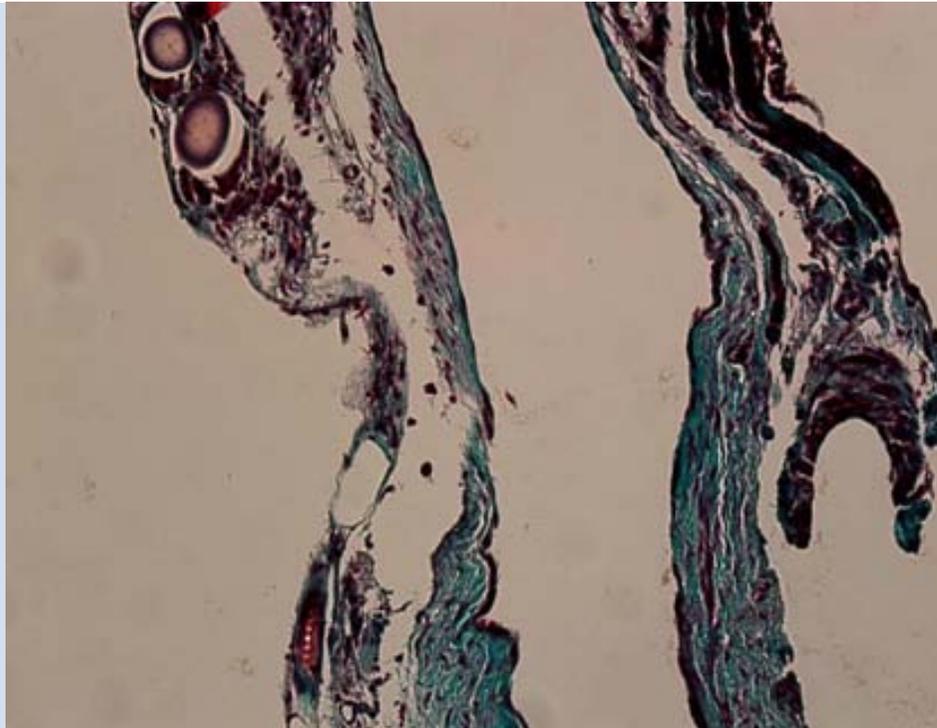
Aplasia de la capa muscular.

Fibrosis de la capa adventicia.

Tabla 15. Comparación histológica venosa grupo II. Muestra no irradiada vs. irradiada. Observamos cambios moderados en la muestra venosa irradiada.

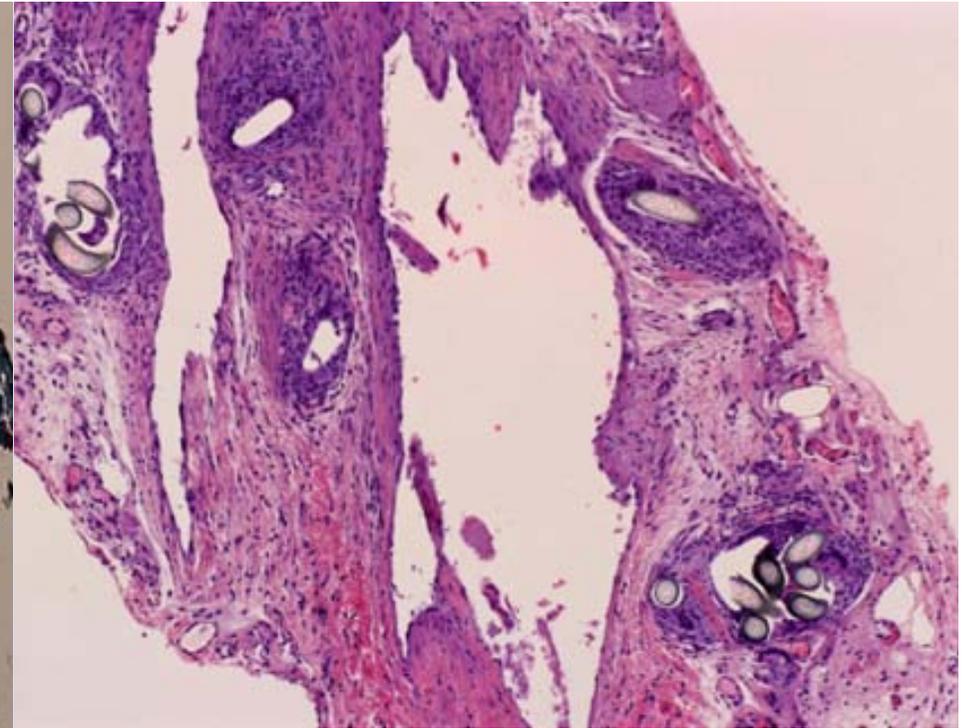
Tabla 16. Modelo RT animal. Histología venosa. Grupo III (RT + 6 semanas)

Grupo no irradiado



Muestra histológica venosa. Corte longitudinal.
Tinción Tricrómico Masson 10x.
No se observan alteraciones histológicas en la estructura vascular.

Grupo irradiado



Muestra histológica venosa, transversal. Tinción H-E, 10x.
Se observa discontinuidad moderada de la capa endotelial.
Hiperplasia moderada de la capa íntima.
Aplasia moderada de la capa muscular.
Fibrosis de la capa adventicia.

Tabla 16. Comparación histológica venosa grupo III. Muestra no irradiada vs. irradiada. Observamos cambios moderados en la muestra venosa irradiada.

3) Nervio vago

- El estudio de anatomía patológica de los nervios control (no irradiados) obtenidos del grupo I bilateral, del grupo II lado no RT y del grupo III lado no RT, mostró unos especímenes con la histología típica neural normal. No se evidenció ningún tipo de lesión a consecuencia de alguna de las manipulaciones o técnicas utilizadas durante el estudio.
- Cambios poco significativos entre el grupo no irradiado (grupo I bilateral, grupo II lado no RT y grupo III lado no RT) y los grupos irradiados (grupo II lado RT y grupo III lado RT).

- Capa endoneural:

- Sin cambios histológicos destacables en el grupo II (lado RT) ni el grupo III (lado RT).
- Sin cambios histológicos destacables en el grupo I (bilateral) ni los grupos II y III (lado no RT).
- Sin diferencias histológicas entre los grupos II y III.

- Capa epineural:

- Sin cambios histológicos destacables en el grupo II (lado RT) ni el grupo III (lado RT).
- Sin cambios histológicos destacables en el grupo I (bilateral) ni el grupo II y III (lado no RT).
- Sin diferencias histológicas entre los grupo II y III.

- Capa perineural:
 - Diferencias histológicas entre los grupos II y III. La capa perineural presentó edema, fibrosis e infiltración por leucocitos polimorfonucleares, que aumentó del 1-25% en la 2ª semana (grupo II) al >25% en la 6ª semana (grupo III).
 - Sin cambios histológicos destacables en el grupo I (bilateral) ni los grupos II y III (lado no RT).

- Capa vasa nervorum:
 - Sin cambios histológicos destacables en el grupo II (lado RT) ni el grupo III (lado RT).
 - Sin cambios histológicos destacables en el grupo I (bilateral) ni los grupos II y III (lado no RT).

Tabla 17. Resultados Medios Histológicos Nervio Vago. Modelo RT cervical

Capa	Lateralidad	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Endoneuro	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Normal	Normal
Epineuro	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Normal	Normal
Perineuro	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Edema ligero PMN ligero Granulación ligera	Edema moderado PMN moderado Granulación moderada
Vasa Nervorum	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Normal	Normal

Tabla 17. Resultados histológicos nerviosos divididos por estratos y grupos. Observamos ligeros cambios en los tejidos irradiados respecto a los no irradiados.

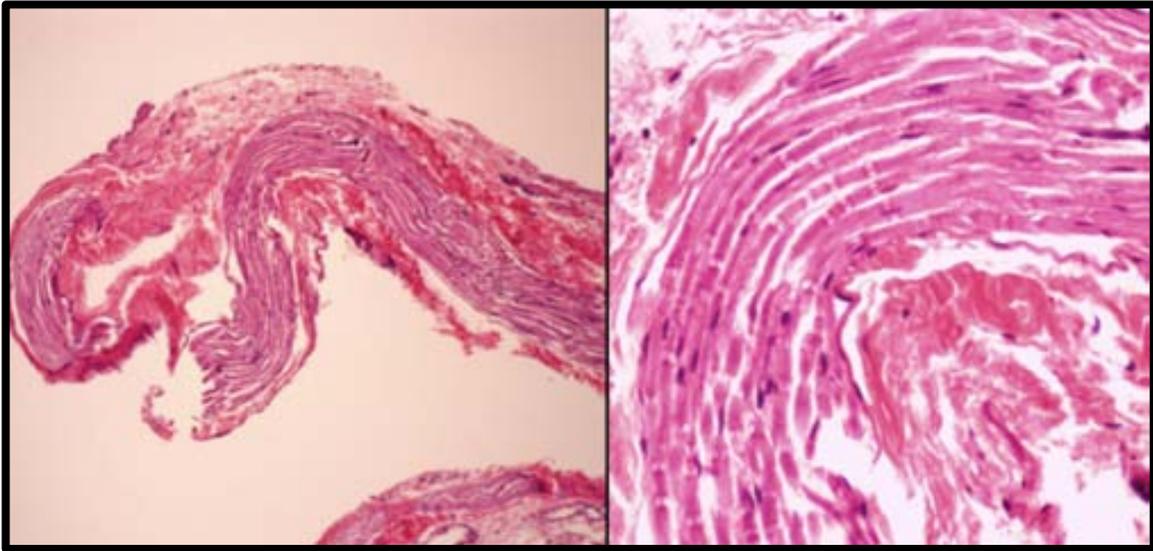


Figura 51. Muestra histológica nerviosa irradiada (Grupo II). Corte longitudinal, H-E x4 (izquierda), x40 (detalle derecha). Sin cambios histológicos destacables.

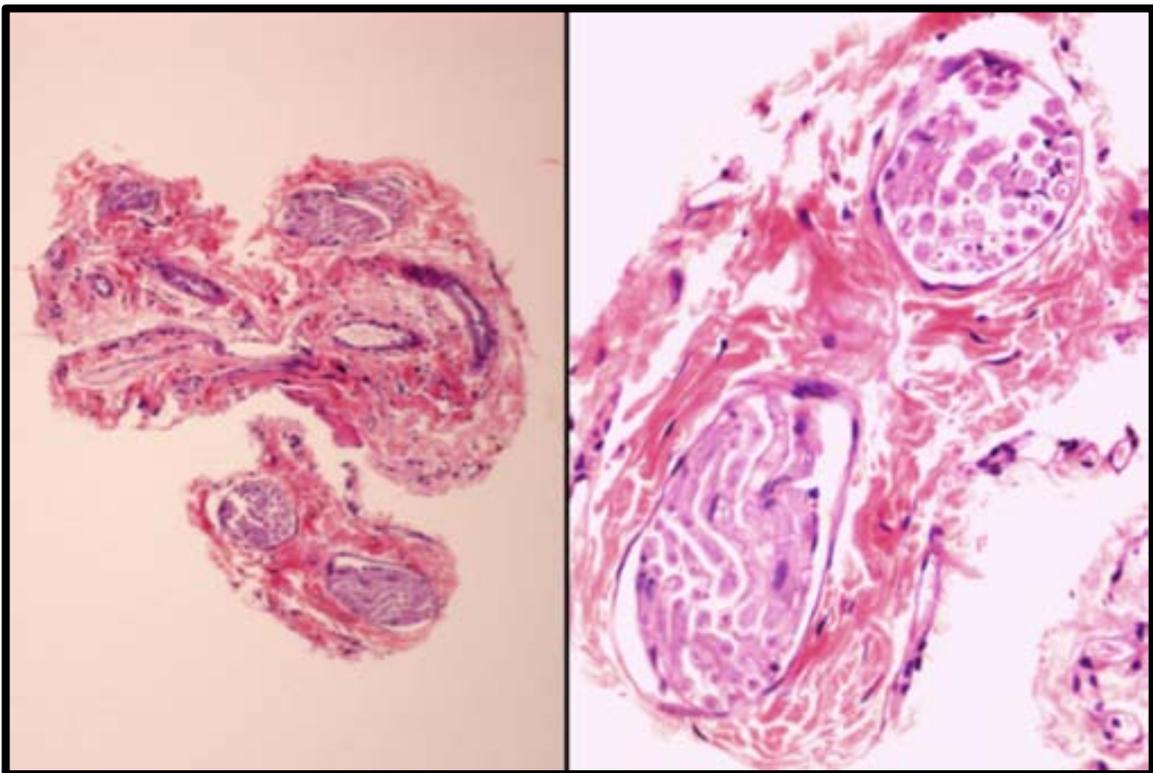


Figura 52. Muestra histológica nerviosa irradiada (Grupo III). Corte transversal, H-E x4 (izquierda), x40 (detalle derecha). Edema y granulación perineural.

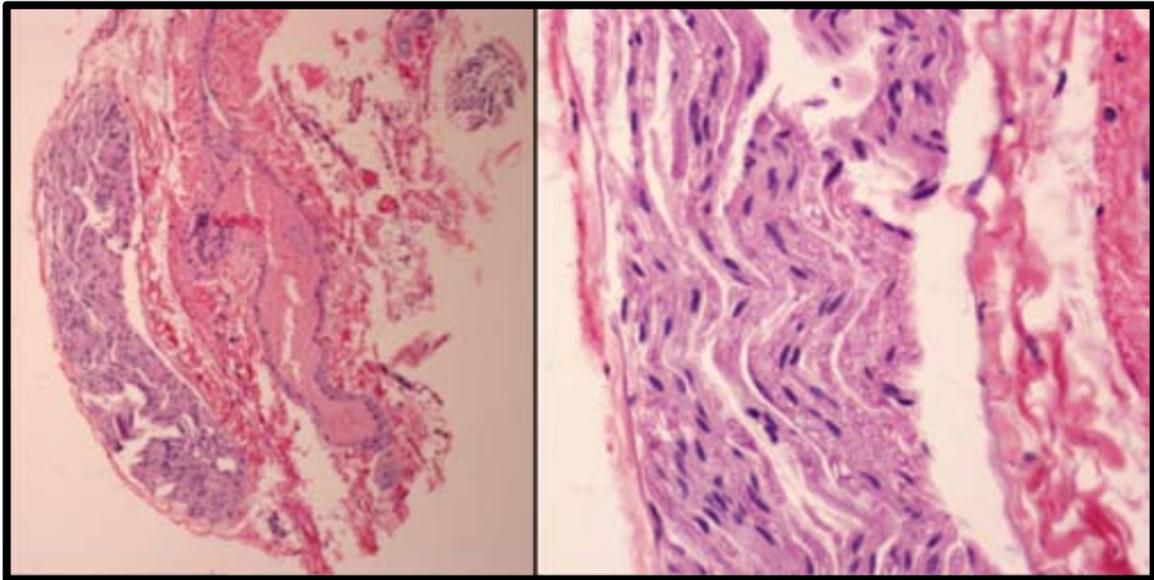


Figura 53. Muestra histológica nerviosa no irradiada (Grupo I). Corte longitudinal, H-E x4 (izquierda), x40 (detalle derecha). Sin cambios respecto grupo I-II.

4) Tráquea

- El estudio de anatomía patológica de las tráqueas control (no irradiadas) obtenidas del grupo I, mostró unos especímenes con la histología típica traqueal normal. No se evidenció ningún tipo de lesión a consecuencia de cualquiera de las manipulaciones o técnicas utilizadas durante el estudio.
- Sin cambios significativos entre el grupo no irradiado (grupo I) y los grupos irradiados (grupo II y grupo III).

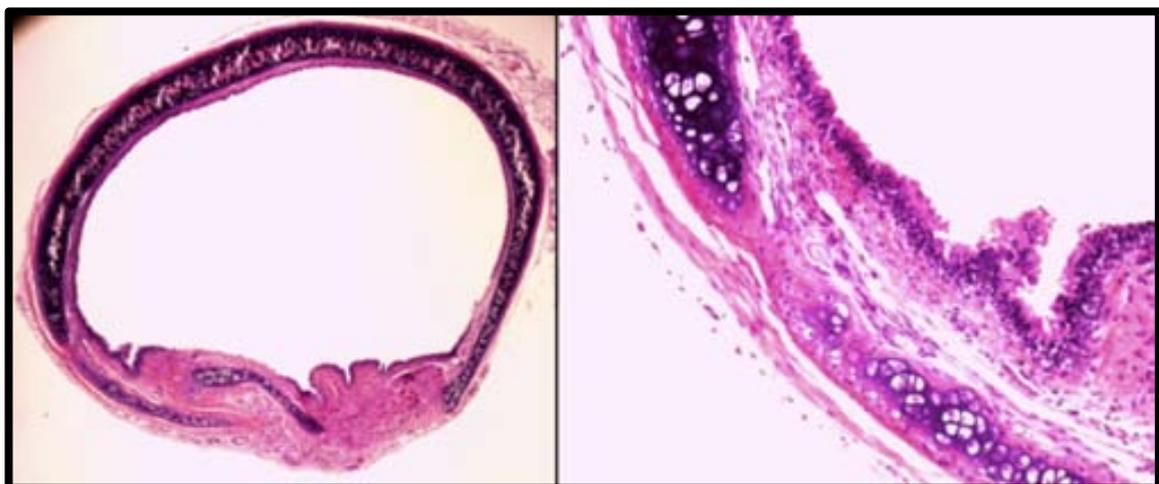


Figura 54. Muestra histológica traqueal no irradiada (Grupo I). Corte coronal, H-E x4 (izquierda), x20 (detalle derecha). Sin cambios histológicos destacables respecto muestras irradiadas.

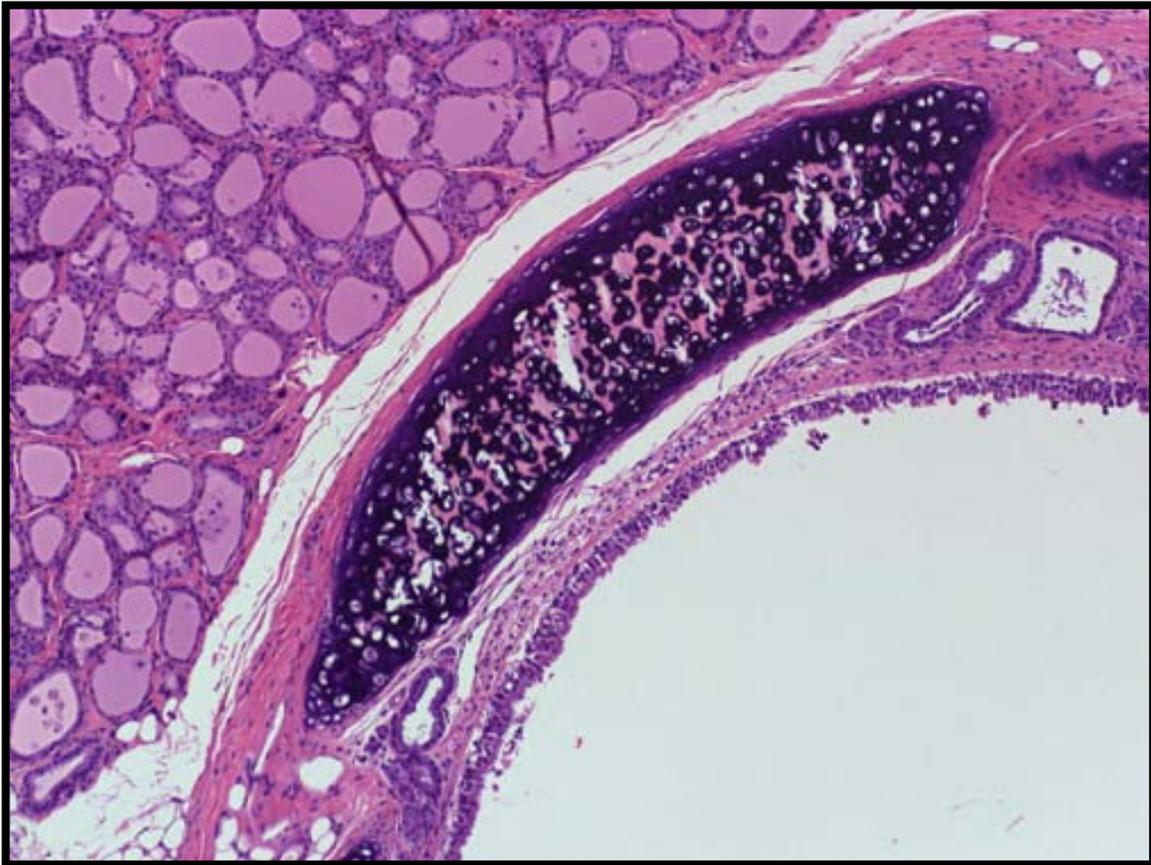


Figura 55. Imagen histológica tráquea grupo II: observamos la túnica Interna o mucosa con epitelio traqueal simple pseudoestratificado y los acinos glandulares (mucosos y serosos). En la siguiente capa media destacan los anillos cartilagosos o pericondrio traqueal y el músculo traqueal. Finalmente, vemos en la túnica adventicia los acinos glandulares, células adiposas, arteriolas y las venillas.

- Capa mucosa:
 - Sin cambios histológicos destacables entre los grupos irradiados (grupo II y grupo III).
 - Sin cambios histológicos destacables entre el grupo no irradiado (grupo I) y los grupos irradiados (grupos II y III).

- Capa submucosa:
 - Sin cambios histológicos destacables entre los grupos irradiados (grupo II y grupo III).
 - Sin cambios histológicos destacables entre el grupo no irradiado (grupo I) y los

grupos irradiados (grupos II y III).

- Capa muscular:
 - Sin cambios histológicos destacables entre los grupos irradiados (grupo II y grupo III).
 - Sin cambios histológicos destacables entre el grupo no irradiado (grupo I) y los grupos irradiados (grupos II y III).

- Capa adventicia:
 - Sin cambios histológicos destacables entre los grupos irradiados (grupo II y grupo III).
 - Sin cambios histológicos destacables entre el grupo no irradiado (grupo I) y los grupos irradiados (grupos II y III).

Tabla 18. Resultados medios histológicos tráquea. Modelo seguro RT cervical

Capa	Lateralidad	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Mucosa	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Normal	Normal
Submucosa	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Normal	Normal
Media	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Normal	Normal
Adventicia	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Normal	Normal

Tabla 18. Resultados histológicos traqueales divididos por estratos y grupos. No observamos cambios en los tejidos irradiados respecto a los no irradiados.

5) Esófago

- El estudio de anatomía patológica de los esófagos control (no irradiados) obtenidos del grupo I, mostró unos especímenes con la histología típica esofágica normal. No se evidenció ningún tipo de lesión a consecuencia de alguna de las manipulaciones o técnicas utilizadas durante el estudio.
- Sin cambios significativos entre el grupo no irradiado (grupo I) y los grupos irradiados (grupo II y grupo III).

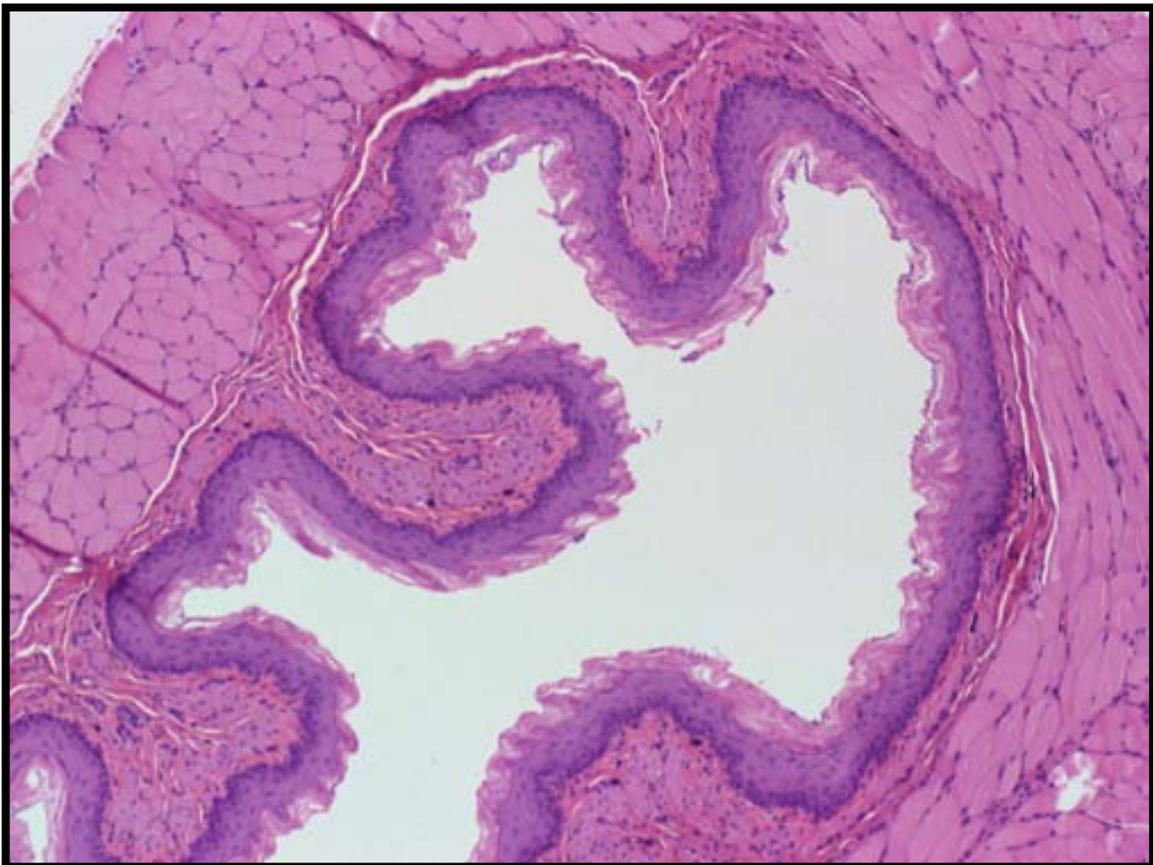


Figura 56. Imagen histológica esófago grupo III: observamos la túnica Interna o mucosa con epitelio pavimentoso estratificado, y la túnica submucosa glandular. En la siguiente capa, media o muscular, destaca el músculo esofágico. Finalmente vemos la túnica adventicia.

- Capa mucosa:
 - Sin cambios histológicos destacables entre los grupos irradiados (grupo II y

grupo III).

- Sin cambios histológicos destacables entre el grupo no irradiado (grupo I) y los grupos irradiados (grupos II y III).

- Capa submucosa:
 - Sin cambios histológicos destacables entre los grupos irradiados (grupo II y grupo III).
 - Sin cambios histológicos destacables entre el grupo no irradiado (grupo I) y los grupos irradiados (grupos II y III).

- Capa muscular:
 - Sin cambios histológicos destacables entre los grupos irradiados (grupo II y grupo III).
 - Sin cambios histológicos destacables entre el grupo no irradiado (grupo I) y grupos irradiados (grupos II y III).

- Capa adventicia:
 - Sin cambios histológicos destacables entre los grupos irradiados (grupo II y grupo III).
 - Sin cambios histológicos destacables en el grupo I (bilateral) ni los grupos II y III (lado no RT).

Tabla 19. Resultados medios histológicos esófago. Modelo seguro RT cervical

Capa	Lateralidad	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Mucosa	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Normal	Normal
Submucosa	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Normal	Normal
Media	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Normal	Normal
Adventicia	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Normal	Normal

Tabla 19. Resultados histológicos esófago divididos por estratos y grupos. No observamos cambios en los tejidos irradiados respecto a los no irradiados.

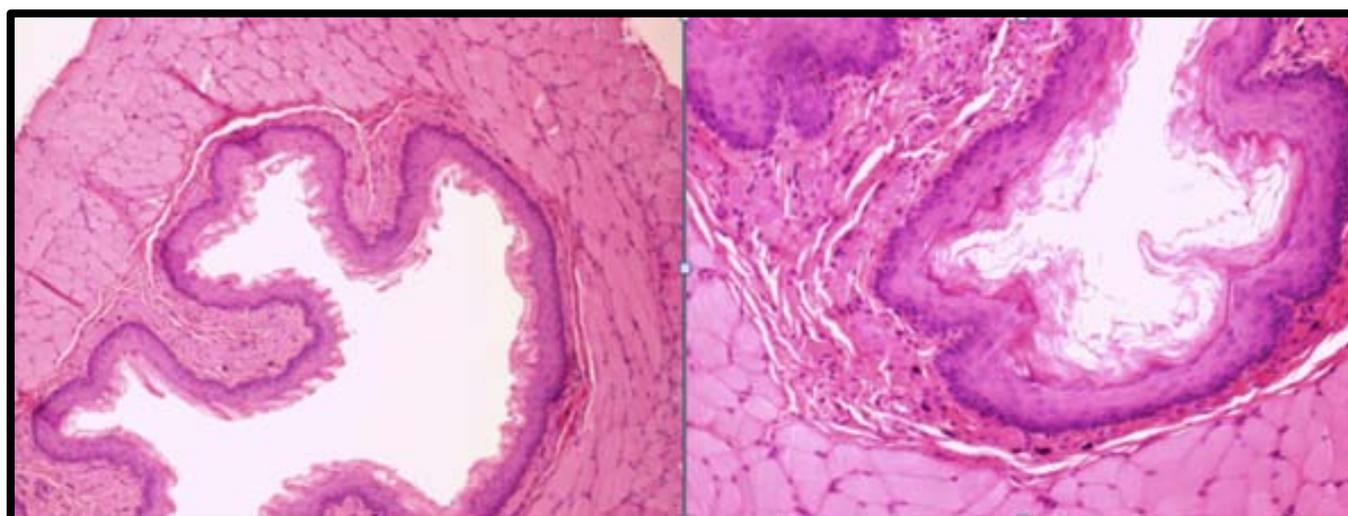


Figura 57. Muestra histológica esófago no irradiada (Grupo I). Corte transversal, H-E x10 (izquierda), x20 (detalle derecha). Sin cambios histológicos destacables respecto muestras irradiadas.

6) Tiroides

- El estudio de anatomía patológica de las tiroides control (no irradiadas) obtenidas del grupo I, mostró unos especímenes con la histología típica tiroidea normal. No se evidenció ningún tipo de lesión a consecuencia de alguna de las manipulaciones o técnicas utilizadas durante el estudio.
- Sin cambios significativos entre el grupo no irradiado (grupo I) y los grupos

irradiados (grupo II y grupo III).

- Coloide:

- Sin cambios histológicos destacables entre los grupos irradiados (grupo II y grupo III).
- Sin cambios histológicos destacables entre el grupo no irradiado (grupo I) y grupos irradiados (grupos II y III).

- Células foliculares:

- Sin cambios histológicos destacables entre los grupos irradiados (grupo II y grupo III).
- Sin cambios histológicos destacables entre el grupo no irradiado (grupo I) y los grupos irradiados (grupos II y III).

- Tejido conectivo:

- Sin cambios histológicos destacables entre los grupos irradiados (grupo II y grupo III).
- Sin cambios histológicos destacables entre el grupo no irradiado (grupo I) y grupos irradiados (grupos II y III).

- Cápsula:

- Sin cambios histológicos destacables entre los grupos irradiados (grupo II y grupo III).
- Sin cambios histológicos destacables entre el grupo no irradiado (grupo I) y

grupos irradiados (grupo II y III).

Tabla 20. Resultados medios histológicos tiroides. Modelo seguro de RT cervical

Capa	Lateralidad	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Coloide	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Normal	Normal
Células Foliculares	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Normal	Normal
Tejido Conectivo	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Normal	Normal
Cápsula	No RT	Normal	Normal	Normal
	RT	Normal	Normal	Normal

Tabla 20. Resultados tiroides traqueales divididos por estratos y grupos. No observamos cambios en los tejidos irradiados respecto a los no irradiados.

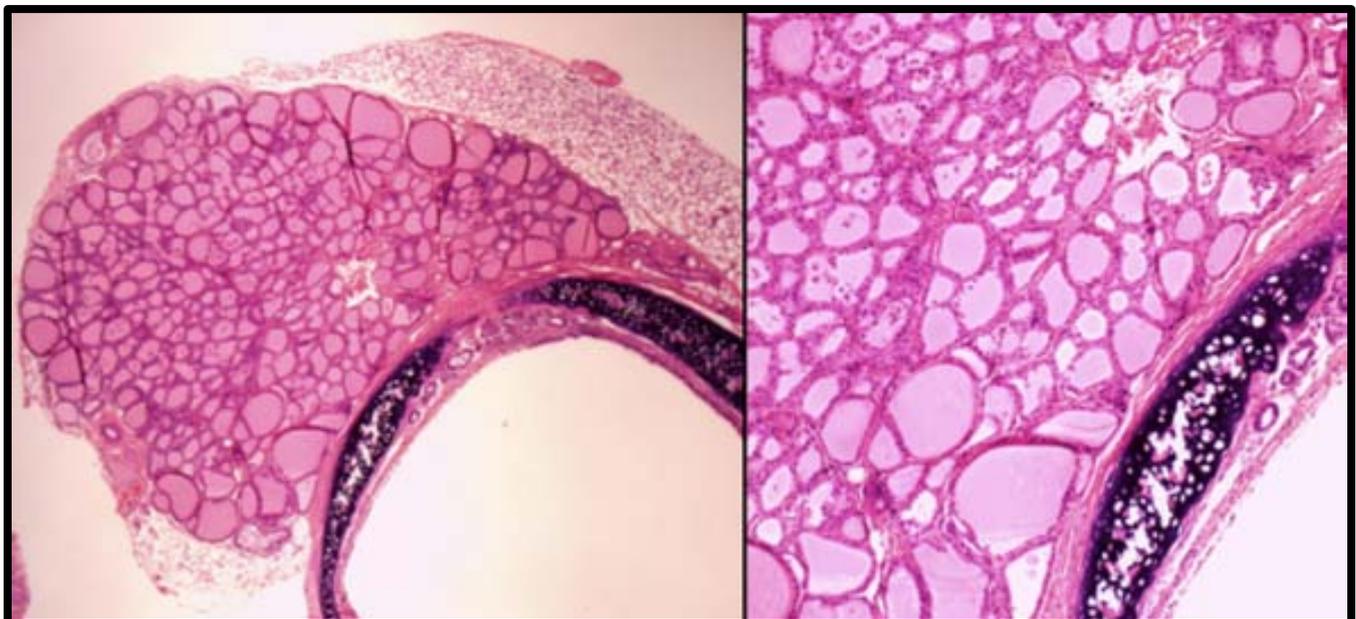


Figura 58. Muestra histológica tiroidea irradiado (grupo III). Corte transversal, H-E x4 (izquierda), x10 (detalle derecha). Sin cambios histológicos destacables respecto muestras irradiadas.

6.2 Estudio sobre la viabilidad de la microanastomosis vascular en población irradiada

6.2.1 Evaluación clínica

○ Grupo NIRAR:

- Ningún animal desarrolló complicaciones agudas (2 semanas de seguimiento clínico) o subagudas (4 semanas de seguimiento clínico).
- Los animales presentaban un pelaje suave, sin necrosis local, radiodermatitis o descamación epidérmica durante las 4 semanas de seguimiento.
- No signos de mucositis orofaríngea o úlceras bucales.
- Todos los animales presentaron una conducta normal sin objetivar alteraciones conductuales.

○ Grupo NIRVE:

- Ningún animal desarrolló complicaciones agudas (2 semanas de seguimiento clínico) o subagudas (4 semanas de seguimiento clínico).
- Los animales presentaban un pelaje suave, sin necrosis local, radiodermatitis o descamación epidérmica durante las 4 semanas de seguimiento.
- No signos de mucositis orofaríngea o úlceras bucales.
- Todos los animales presentaron una conducta normal sin objetivar alteraciones conductuales.

○ **Grupo IRAR:**

- Tres animales desarrollaron complicaciones postRT agudas (2 semanas postRT).
- Dos animales desarrollaron complicaciones postRT subagudas (2-4 semanas postRT).
- Los animales presentaban un pelaje suave, sin necrosis local, radiodermatitis o descamación epidérmica durante las 2 primeras semanas de seguimiento.
- Posteriormente, entre la 2ª y 4ª semanas todas las ratas (35/35) desarrollaron radiodermatitis de la zona RT, sin necrosis local del tejido.
- Signos de mucositis orofaríngea y úlceras bucales en 3 animales.
- Todos los animales presentaron una conducta normal sin objetivar alteraciones agudas tras la RT.

○ **Grupo IRVE:**

- Tres animales desarrollaron complicaciones postRT agudas (2 semanas postRT).
- Dos animales desarrollaron complicaciones postRT subagudas (2-4 semanas postRT).
- Los animales presentaban un pelaje suave, sin necrosis local, radiodermatitis o descamación epidérmica durante las 2 primeras semanas de seguimiento.
- Posteriormente, entre la 2ª y 4ª semanas todas las ratas (35/35) desarrollaron radiodermatitis de la zona RT, sin necrosis local del tejido.
- Signos de mucositis orofaríngea y úlceras bucales en 3 animales.

- Todos los animales presentaron una conducta normal sin objetivar alteraciones agudas tras la RT.

6.2.2 Peso

- Hasta el periodo final del estudio, se registró un aumento progresivo del peso corporal para el grupo control (grupos NIRAR y NIRVE) y para los grupos postRT (grupos IRAR y IRVE) (tabla 21).
- Sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p>0,05$).

Tabla 21. Peso corporal medio (gr). Viabilidad microanastomosis

	Inicial	RT	2 semanas	4 semanas
Grupo NIRAR	261,1+/- 11,2	-	313,1 +/- 14,8	408,6 +/- 15,1
Grupo NIRVE	252,4 +/- 11,2	-	299,2 +/- 16,8	401,9 +/- 12,1
Grupo IRAR	260,9 +/- 10,3	280,1 +/- 13,2	315,7 +/- 15,8	393,3 +/- 22,8
Grupo IRVE	266,3 +/- 12,1	282,7 +/- 15,4	318,5 +/- 16,2	396,2 +/- 22,1

Tabla 21. Distribución de peso por grupos y temporalidad. La evolución del peso fue homogénea entre los diferentes grupos, sin observar diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

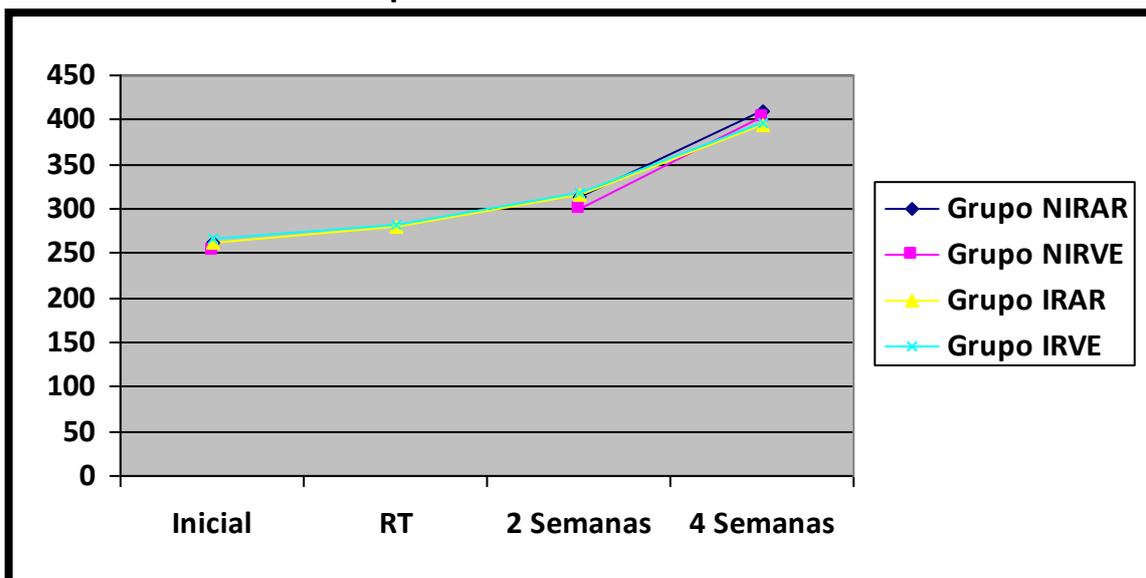
Gráfico 3. Peso corporal medio. Viabilidad microanastomosis

Gráfico 3. La evolución del peso fue homogénea entre los diferentes grupos, sin observar diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

6.2.3 Permeabilidad vascular

○ Grupo NIRAR

- Todas las arterias carótidas comunes suturadas presentaron un test de permeabilidad positivo anterógrado y retrógrado **inicial** (1ª cirugía, 35/35 = 100%).
- Todas las arterias carótidas comunes revisadas presentaron un test de permeabilidad positivo anterógrado y retrógrado **final** (2ª cirugía, 35/35 = 100%).
- En ningún caso se observaron bajo microscopio quirúrgico trombosis arterial, aneurismas ni pseudoaneurismas arteriales (0/144 = 0%).
- *Sin diferencias estadísticamente significativas inicial respecto final (test χ^2 , $p > 0,05$).*

○ Grupo NIRVE

- Todas las venas yugulares externas suturadas presentaron un test de permeabilidad positivo anterógrado **inicial** (1ª cirugía, 35/35 = 100%).
- Todas las venas yugulares externas revisadas presentaron un test de permeabilidad **positivo** anterógrado **final** (2ª cirugía, 35/35 = 100%).
- En ningún caso se observaron bajo microscopio quirúrgico trombosis venosa, aneurismas ni pseudoaneurismas venosos (0/35 = 0%).
- *Sin diferencias estadísticamente significativas inicial respecto final (test χ^2 , $p > 0,05$).*
- *Sin diferencias estadísticamente significativas NIRAR respecto NIRVE (test χ^2 , $p > 0,05$).*

○ Grupo IRAR

- Todas las arterias carótidas comunes suturadas presentaron un test de permeabilidad positivo anterógrado y retrógrado **inicial** (1ª cirugía, 35/35 = 100%).
- 34 de las arterias carótidas comunes revisadas presentaron un test de permeabilidad **positivo** anterógrado y retrógrado **final** (2ª cirugía, 34/35 = 97,1%).
- Una de las arterias carótidas comunes revisadas presentó un test de permeabilidad **negativo** anterógrado **final** (2ª cirugía, 1/35 = 2,9%).
- En uno de los casos se observó bajo microscopio quirúrgico trombosis arterial (1/35 = 2,9%).
- En 6 casos se observaron bajo microscopio quirúrgico aneurismas o

pseudoaneurismas arteriales (6/35 = 17.14%).

- Sin diferencias estadísticamente significativas inicial respecto final (test χ^2 , $p > 0,05$).
- Sin diferencias estadísticamente significativas NIRAR respecto IRAR (test χ^2 , $p > 0,05$).
- Se pudo observar de forma macroscópica un mayor sangrado intraoperatorio (no objetivado), durante la disección de las arterias irradiadas (IRAR) respecto a las no irradiadas (NIRAR).
- También se pudo observar de forma macroscópica mayor fibrosis de los tejidos en los grupos irradiados (IRAR) respecto a los no irradiados (NIRAR).

○ Grupo IRVE

- Todas las venas yugulares externas suturadas presentaron un test de permeabilidad positivo anterógrado **inicial** (1ª cirugía, 35/35 = 100%).
- 28 de las venas yugulares externas revisadas presentaron un test de permeabilidad **positivo** anterógrado **final** (2ª cirugía, 28/35 = 80%).
- Siete de las venas yugulares externas revisadas presentaron un test de permeabilidad **negativo** anterógrado **final** (2ª cirugía, 7/35 = 20%).
- En 7 casos se observó bajo microscopio quirúrgico trombosis venosa (7/35 = 20%).
- En trece casos se observaron bajo microscopio quirúrgico aneurismas o pseudoaneurismas venosos (13/35 = 37,14%).
- Diferencias estadísticamente significativas inicial respecto final (test χ^2 , $p < 0,05$).

- *Diferencias estadísticamente significativas IRVE respecto NIRVE (test χ^2 , $p < 0,05$).*
- *Diferencias estadísticamente significativas IRVE respecto IRAR (test χ^2 , $p < 0,05$).*
- Se pudo observar de forma macroscópica un mayor sangrado intraoperatorio (no objetivado), durante la disección de las venas irradiadas (IRVE) respecto a las no irradiadas (NIRVE).
- También se pudo observar de forma macroscópica mayor fibrosis de los tejidos en los grupos irradiados (IRVE) respecto a los no irradiados (NIRVE).

Tabla 22. Permeabilidad/Trombosis vascular. Microanastomosis vascular

	Permeabilidad vascular		Trombosis vascular	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Grupo NIRAR	35/35 (100%)	35/35 (100%)	0/35 (0%)	0/35 (0%)
Grupo NIRVE	35/35 (100%)	35/35 (100%)	0/35 (0%)	0/35 (0%)
Grupo IRAR	35/35 (100%)	34/35 (97,1%)	0/35 (0%)	1/35 (2,9%)
Grupo IRVE	35/35 (100%)	28/35 (80%)	0/35 (0%)	7/35 (20%)

Tabla 22. Permeabilidad vascular (arterial y venosa) irradiada y no irradiada. Permeabilidad del 100% en las muestras no irradiadas. Trombosis del grupo arterial irradiado del 2.9%, sin cambios significativos. Trombosis del 20% en el grupo irradiado venoso, diferencias estadísticamente significativas.

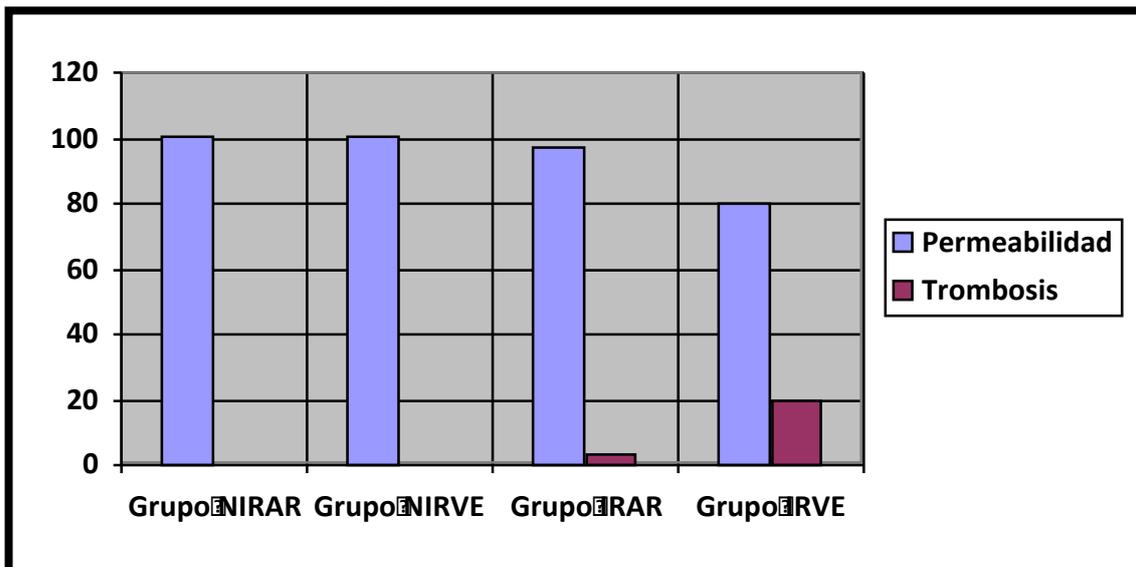
Gráfico 4. Permeabilidad/Trombosis vascular. Microanastomosis vascular

Gráfico 4. La permeabilidad vascular (arterial y venosa) fue homogénea entre los grupos no irradiados. En los grupos irradiados aumentó significativamente la tasa de trombosis, siendo estadísticamente significativa la tasa de trombosis venosa.

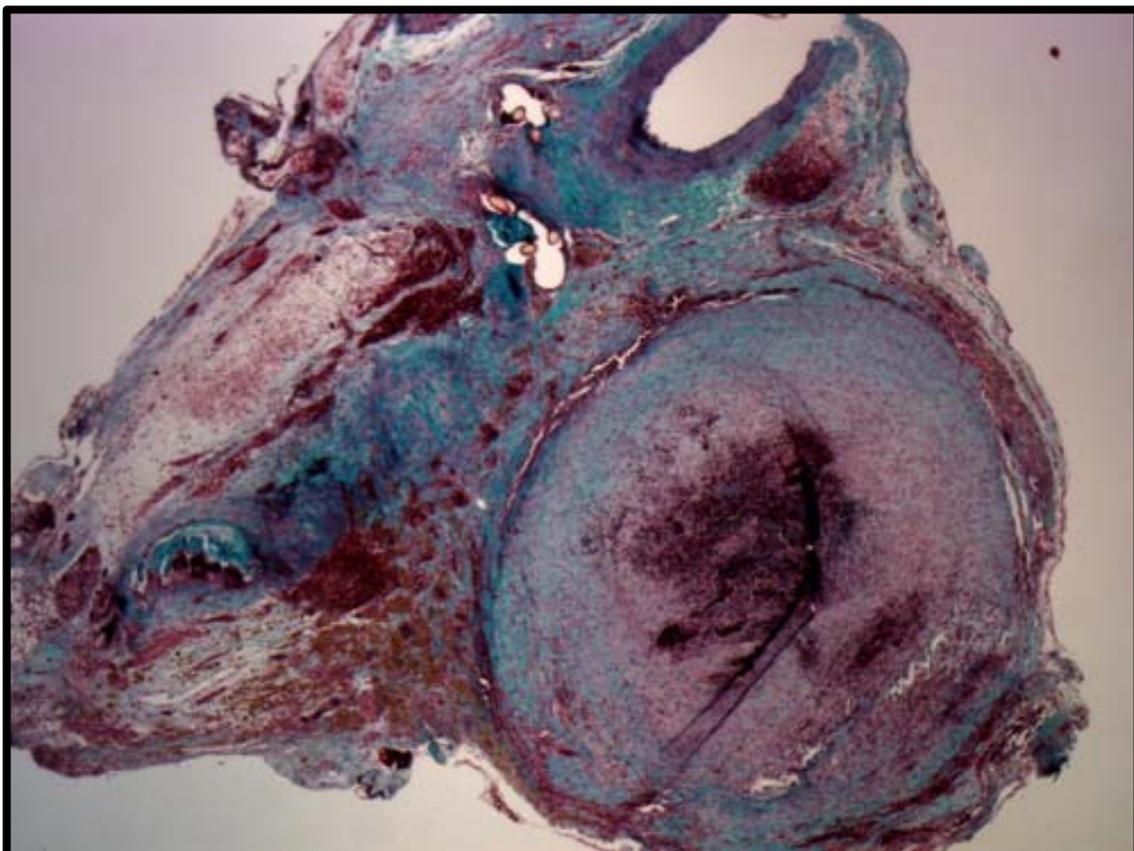


Figura 59. Imagen histológica arterial, tinción tricrómico Masson, x4. Podemos observar una trombosis arterial crónica, que obstruye el 100% del lumen vascular. Fenómenos de reorganización, fibrosis y edema excéntrico.

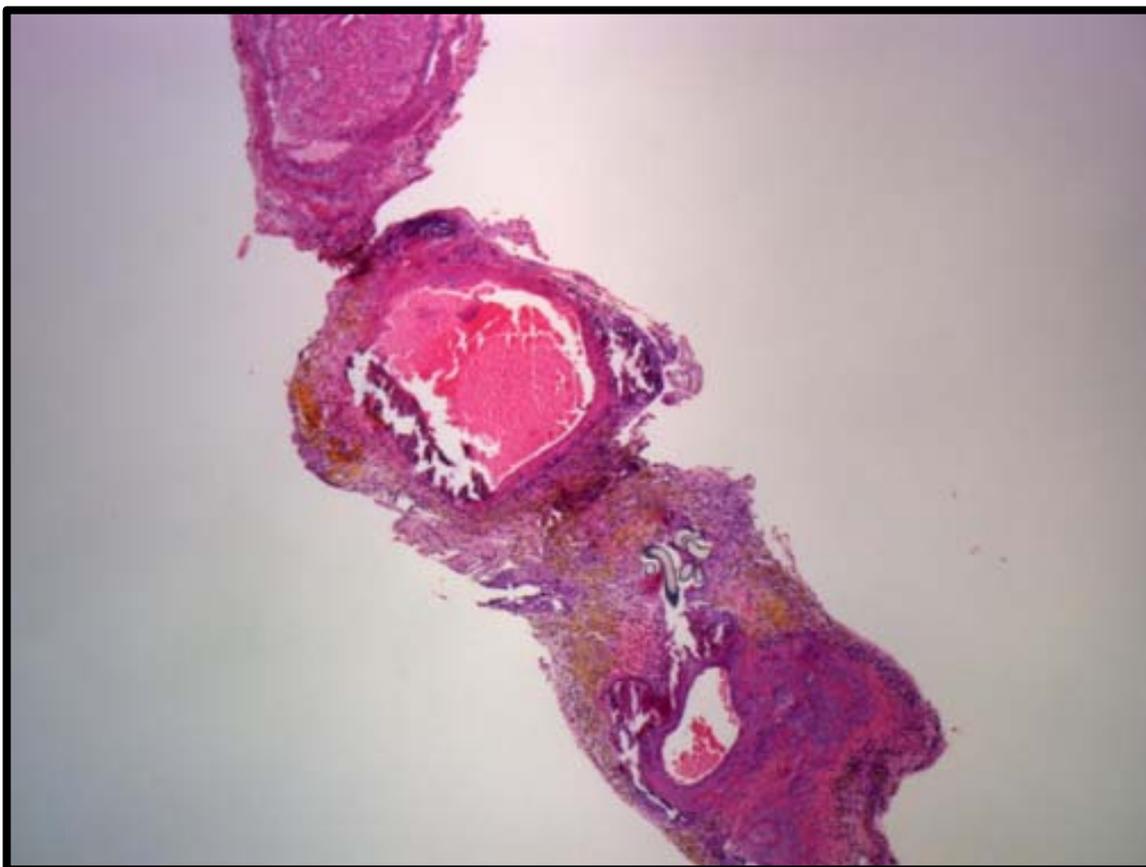


Figura 60. Imagen histológica venosa, tinción H-E, x4. Podemos observar una trombosis venosa subaguda, que obstruye el 85% del lumen vascular. Fenómenos de reorganización, fibrosis y edema excéntrico.

6.2.4 Estudio de la dificultad técnica de la microsutura

○ Grupo NIRAR

- 34 de las arterias carótidas comunes suturadas no precisaron una resutura inicial ($34/35 = 97,1\%$).
- Una de las arterias carótidas comunes suturadas precisaron una resutura inicial debido a sangrado intraoperatorio ($1/35 = 2,9\%$).
- El tiempo (minutos) medio del procedimiento quirúrgico de la microanastomosis arterial fue de 25 minutos (rango 22-27).
- El número (n) medio de puntos de sutura con nylon 9.0 (Ethilon, J&J) fue de

8 (rango 7-9).

○ Grupo NIRVE

- 32 de las venas yugulares externas suturadas no precisaron una resutura inicial ($32/35 = 91,4\%$).
- Tres de las venas yugulares externas suturadas precisaron una resutura inicial debido a sangrado intraoperatorio ($3/35 = 8,6\%$).
- El tiempo (minutos) medio del procedimiento quirúrgico de la microanastomosis venosa fue de 30 minutos (rango 27-33).
- El número (n) medio de puntos de sutura con nylon 9.0 (Ethilon, J&J) fue de 10 (rango 8-11).
- *Existen diferencias estadísticamente significativas NIRVE respecto NIRAR en el número de reintentos (test χ^2 , $p < 0,05$).*
- *Existen diferencias estadísticamente significativas NIRVE respecto NIRAR en el tiempo (test χ^2 , $p < 0,05$).*

○ Grupo IRAR

- Ninguna de las arterias carótidas comunes suturadas precisaron una resutura inicial ($35/35 = 100\%$).
- El tiempo (minutos) medio del procedimiento quirúrgico de la microanastomosis arterial fue de 26 minutos (rango 22-28).
- El número (n) medio de puntos de sutura con nylon 9.0 (Ethilon, J&J) fue de 8 (rango 7-10).
- *No existen diferencias estadísticamente significativas NIRAR respecto IRAR*

en el número de reintentos (test X^2 , $p > 0,05$).

- No existen diferencias estadísticamente significativas NIRAR respecto IRAR en el tiempo (test X^2 , $p > 0,05$).

○ Grupo IRVE

- 27 de las venas yugulares externas suturadas no precisaron una resutura inicial (27/35 = 77,2%).
- Ocho de las venas yugulares externas suturadas precisaron una resutura inicial debido a sangrado intraoperatorio (8/35 = 22,8%).
- El tiempo (minutos) medio del procedimiento quirúrgico de la microanastomosis venosa fue de 35 minutos (rango 27-42).
- El número (n) medio de puntos de sutura con nylon 9.0 (Ethilon, J&J) fue de 11 (rango 8-12).
- Existen diferencias estadísticamente significativas IRVE respecto NIRVE, NIRAR, IRAR en el número de reintentos (test X^2 , $p < 0,05$).
- Existen diferencias estadísticamente significativas IRVE respecto NIRVE NIRAR, IRAR en el tiempo (test X^2 , $p < 0,05$).

Tabla 23. Dificultad técnica procedimiento quirúrgico. Microanastomosis vascular

	Número de reintentos	Tiempo quirúrgico	Número de puntos de sutura
Grupo NIRAR	1/35 (2,8%)	25' (22'-27')	8 (7-9)
Grupo NIRVE	3/35 (8,6%)	30' (27'-33')	10 (8-11)
Grupo IRAR	0/35 (0%)	26' (22'-28')	8 (7-10)
Grupo IRVE	8/35 (22,8%)	35' (27'-42')	11 (8-12)

Tabla 23. Dificultad técnica de la microsutura vascular dividida por grupos en número de reintentos, tiempo quirúrgico y número de puntos de sutura. Observamos mayor dificultad técnica de la microsutura venosa respecto a la arterial, tanto irradiada como no irradiada.

Gráfico 5. Dificultad técnica microsutura. N° de reintentos sutura

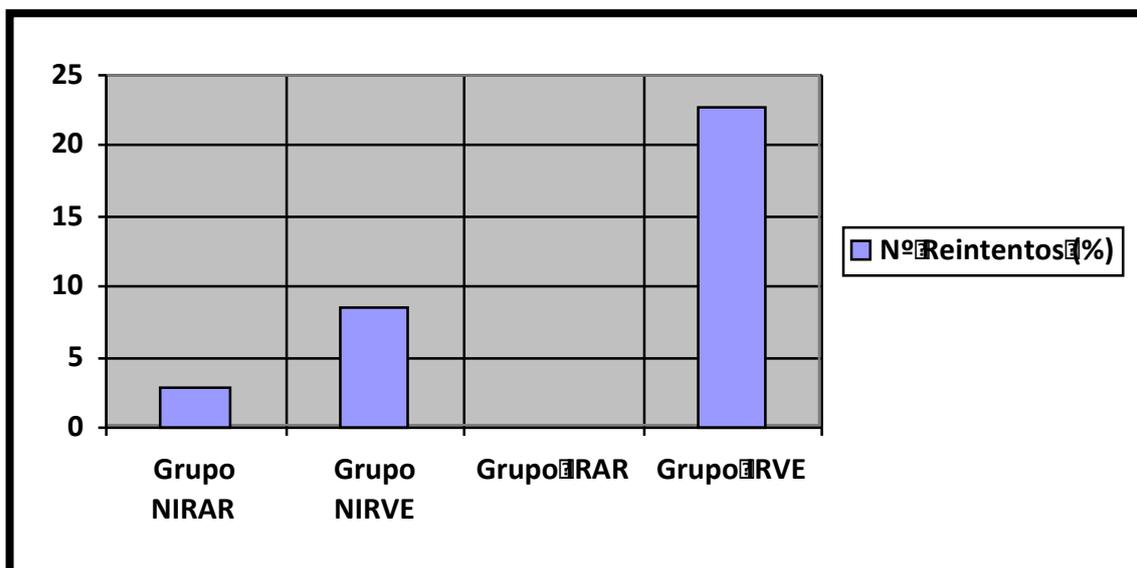


Gráfico 5. El número de reintentos de la microsutura (arterial y venosa) fue homogénea entre los grupos NIRAR, NIRVE e IRAR, presentando diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo IRVE.

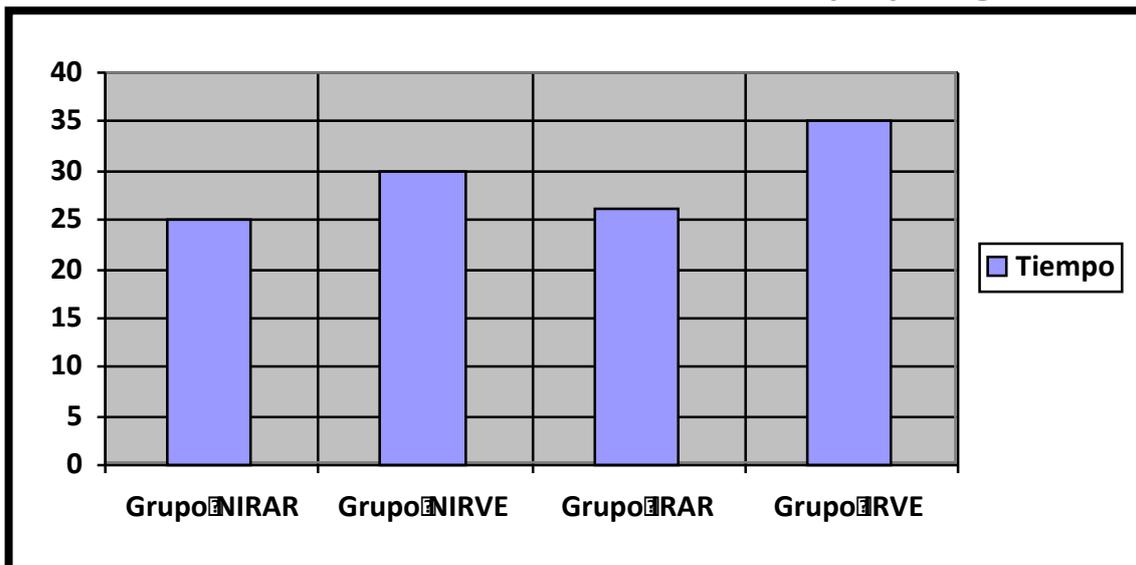
Gráfico 6. Dificultad técnica microsutura. Tiempo quirúrgico

Gráfico 6. El tiempo quirúrgico de la microsutura (arterial y venosa) fue homogéneo entre los grupos NIRAR, NIRVE e IRAR, presentando diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo IRVE.

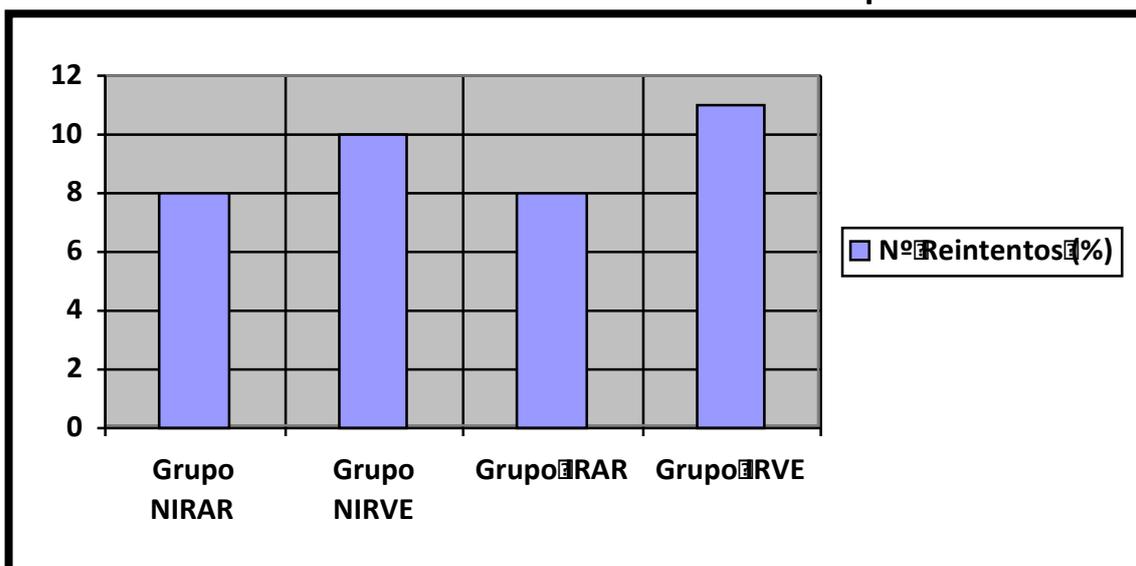
Gráfico 7. Dificultad técnica microsutura. Nº puntos

Gráfico 7. El número de puntos de la microsutura (arterial y venosa) fue homogéneo entre los grupos, sin presentar diferencias estadísticamente significativas.

6.2.5 Supervivencia/Mortalidad

- **Grupo NIRAR:** supervivencia 97,1% animales, durante 4 semanas. Un animal muerto a las 4 semanas de seguimiento.

- **Grupo NIRVE:** supervivencia 100% animales, durante 4 semanas.
- **Grupo IRAR:** supervivencia 91,4% animales, durante 6 semanas. Dos animales muertos durante la fase aguda postRT (2 semanas). Un animal muerto en la fase subaguda postRT (2-4 semana).
- **Grupo IRVE:** supervivencia 85,7% animales, durante 6 semanas. Dos animales muertos durante la fase aguda postRT (2 semanas). Tres animales muertos en la fase subaguda postRT (2-4 semana).
- *Diferencias estadísticamente significativas entre grupos irradiados (IRAR y IRVE) y no irradiados (NIRAR y NIRVE) ($p>0,05$).*
- *Diferencias estadísticamente significativas entre grupos irradiados (IRAR y IRVE) ($p>0,05$).*

Tabla 24. Supervivencia/Mortalidad. Microanastomosis vascular

		Supervivencia	Mortalidad	Supervivencia	Mortalidad
Grupo no RT	Grupo NIRAR	34/35 (97,1%)	1/35 (2,9%)	69/70 (98,6%)	1/70 (1,4%)
	Grupo NIRVE	35/35 (100%)	0/35 (0%)		
Grupo RT	Grupo IRAR	32/35 (91,4%)	3/35 (8,6%)	62/70 (88,6%)	8/70 (11,4%)
	Grupo IRVE	30/35 (85,7%)	5/35 (14,6%)		

Tabla 24. Supervivencia y mortalidad en modelo de viabilidad de microanastomosis vascular. Observamos un aumento de la mortalidad en el grupo irradiado respecto al grupo control.

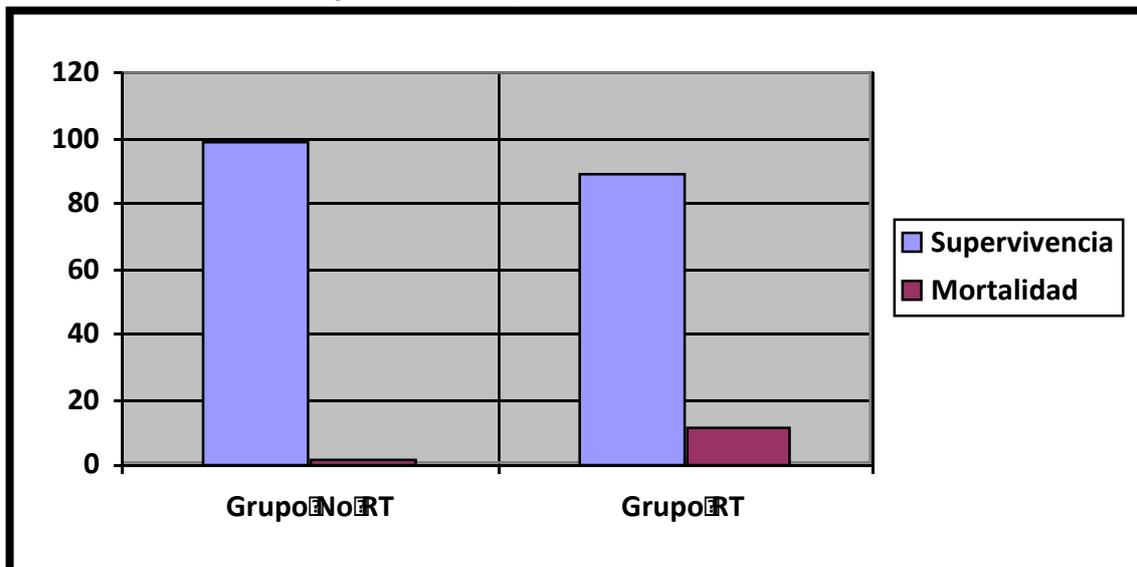
Gráfico 9. Supervivencia/Mortalidad. Microanastomosis

Gráfico 9. Se objetivan diferencias estadísticamente significativas entre grupos irradiados (IRAR y IRVE) y no irradiados (NIRAR y NIRVE) en términos de mortalidad/supervivencia.

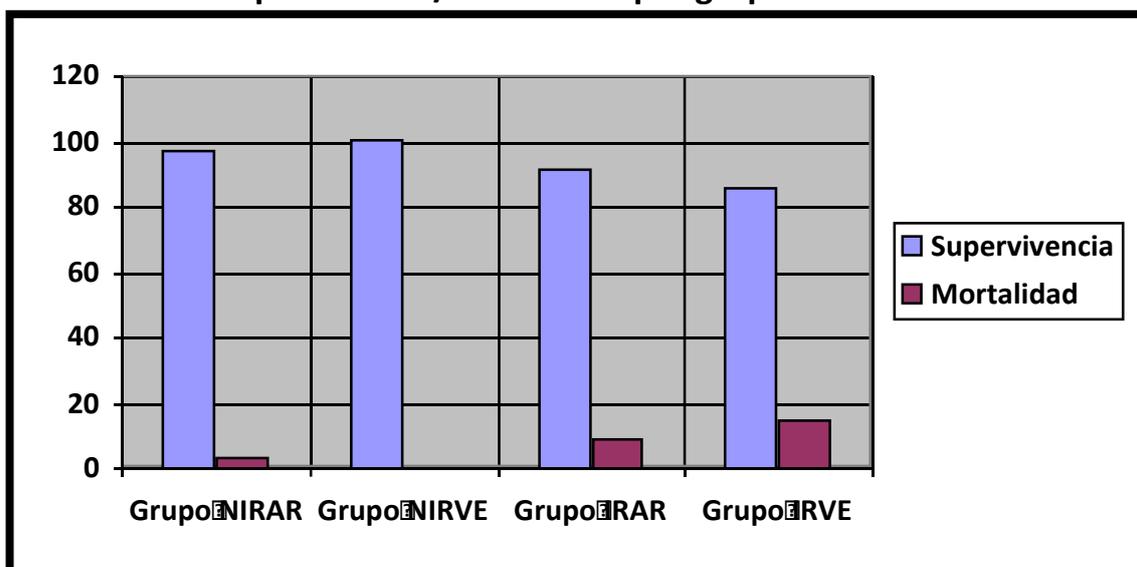
Gráfico 10. Supervivencia/Mortalidad por grupos. Microanastomosis

Gráfico 10. No se objetivan diferencias estadísticamente significativas en grupos irradiados (IRAR respecto IRVE). Tampoco se objetivan diferencias estadísticamente significativas en grupos no Irradiados (NIRAR y NIRVE) en términos de mortalidad/supervivencia.

6.2.6 Estudios histológicos

- **Grupo NIRAR:**
 - Capa endotelial:

- El 88,6% de las muestras (31/35) presenta un endotelio continuo.
- Hiperplasia endotelial con tejido fibroblástico reparativo en el 5,7% de las muestras (2/35).
- El 11,4% de las muestras (4/35) presenta pequeñas zonas de discontinuidad endotelial, sin trombosis asociada.

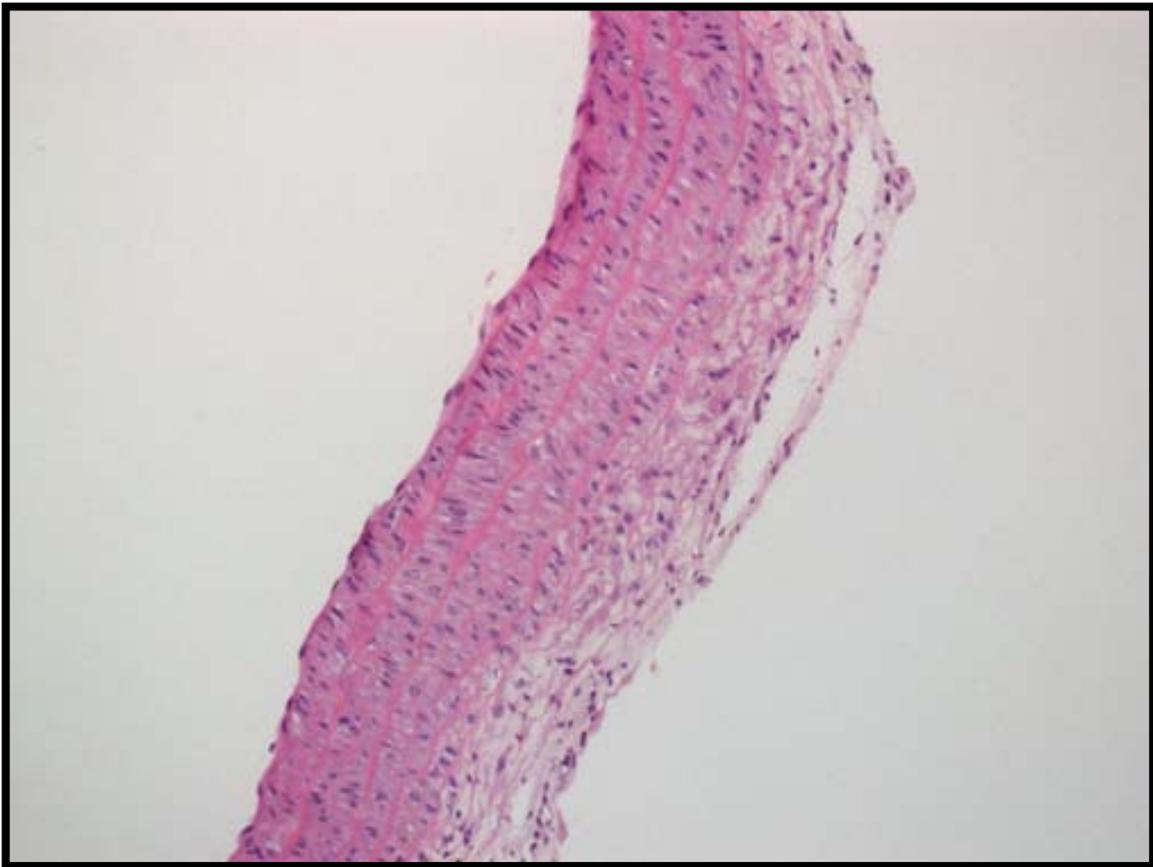


Figura 61. Imagen histológica arteria grupo NIRAR (Corte longitudinal, H&E 20x). Discontinuidad del estrato endotelial sin hiperplasia íntima.

- Capa íntima:
 - La capa íntima presentó una proliferación hiperplásica en el 94,3% de las muestras (33/35).
 - En las muestras que presentan una hiperplasia de la íntima, se observa una

disminución media de la luz arterial del 10 al 20%, sin trombosis asociada.

- El 5,7% de las muestras no presentó una proliferación hiperplásica de la capa íntima.

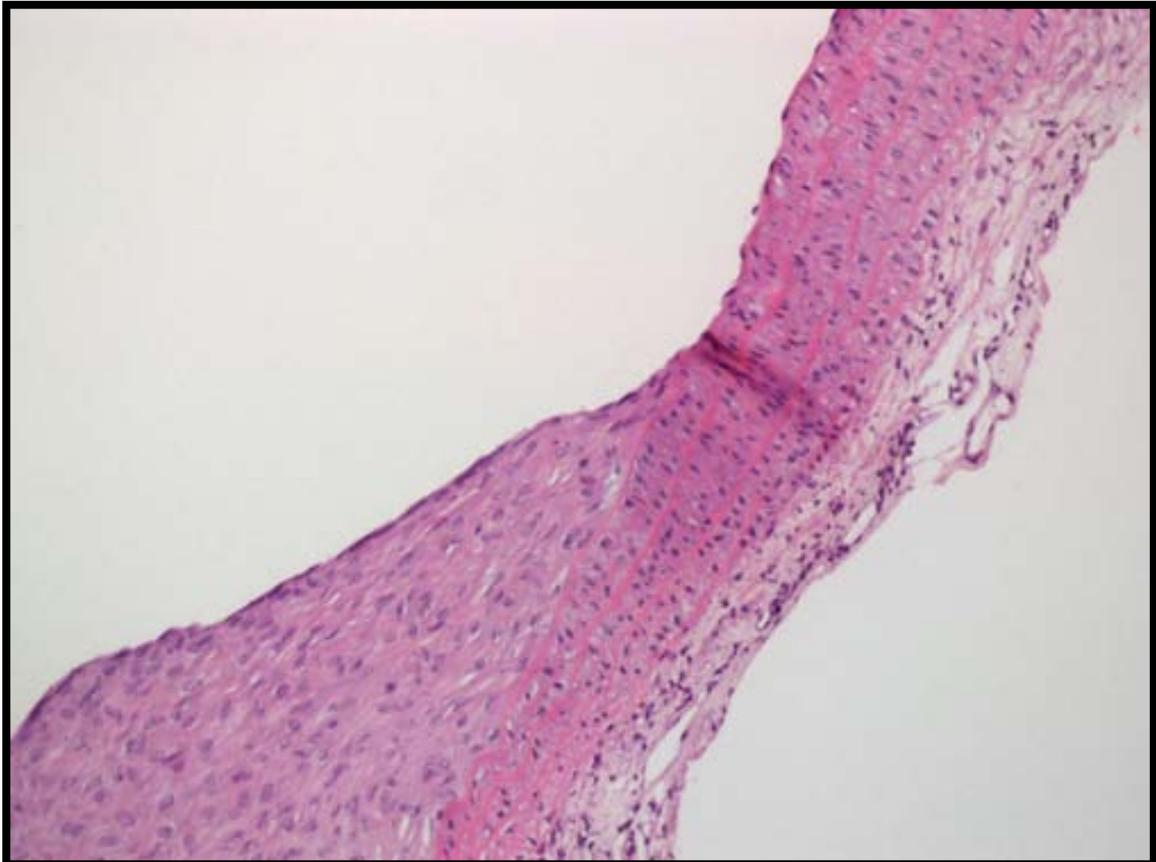


Figura 62. Imagen histológica arteria grupo NIRAR (corte longitudinal, H&E 20x). Continuidad del estrato endotelial e hiperplasia marcada intima. Disminución de la luz arterial 10-20%.

- Capa media:
 - La capa media presentó una disminución progresiva del número de células musculares y vacuolización de las mismas en el 40% de las muestras (14/35).
 - En la zona de la microanastomosis se observan zonas de calcificación y

sustitución de tejido muscular por tejido fibroblástico reparativo en el 100% de las muestras analizadas (35/35).

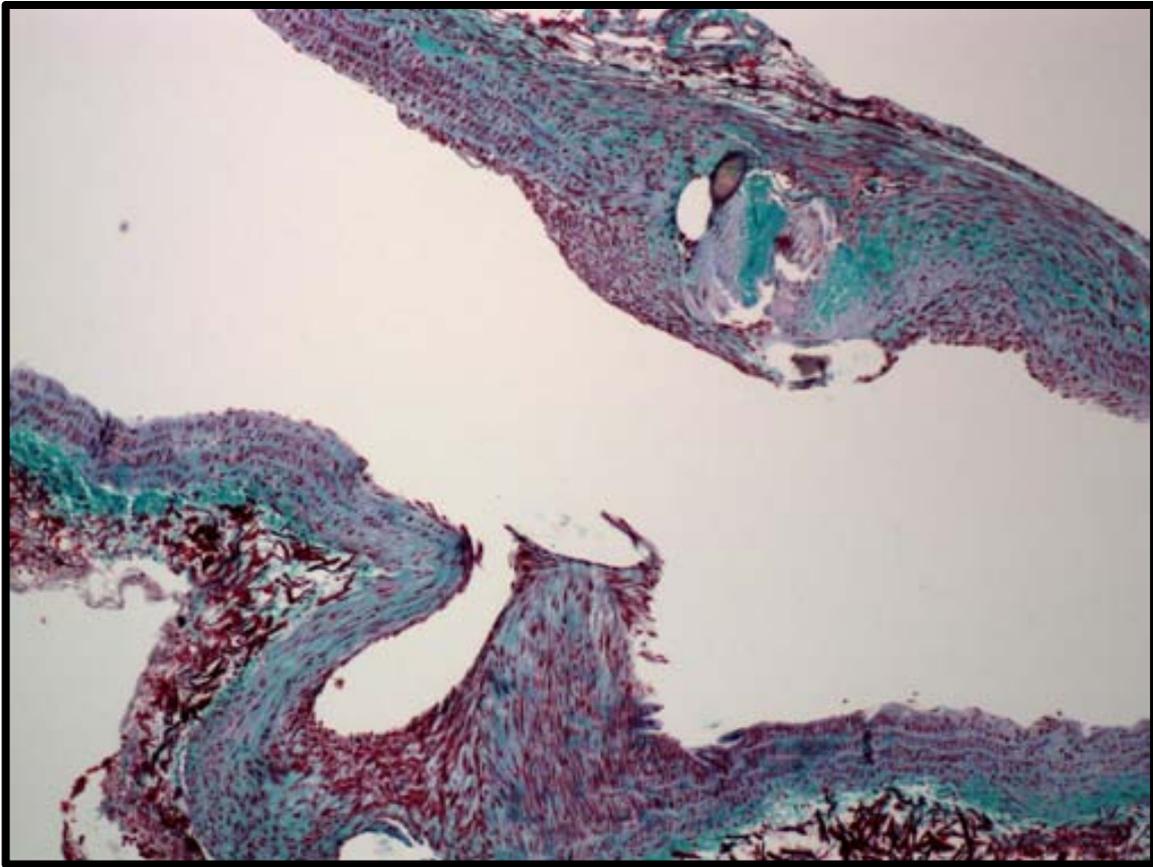


Figura 63. Imagen histológica arteria grupo NIRAR (corte longitudinal, H&E 10x). Vacuolización y desorganización de la capa media. Reacción a cuerpo extraño.

- Capa adventicia:
 - En la zona de la microanastomosis se observan zonas de calcificación, edema, fibrosis e infiltración por leucocitos polimorfonucleares en el 100% de las muestras analizadas (35/35). Reacción granulomatosa a cuerpo extraño.
 - En el 0% de las muestras (0/35) se observa trombosis de vasos accesorios en la adventicia.

○ **Grupo IRAR:**

● **Capa endotelial:**

- El 62,9% de las muestras (22/35) presenta un endotelio continuo.
- El 37,1% de las muestras (13/35) presenta pequeñas zonas de discontinuidad endotelial, sin trombosis asociada.
 - *Existen diferencias estadísticamente significativas IRAR respecto NIRAR (test χ^2 , $p < 0,05$).*
- Hiperplasia endotelial con tejido fibroblástico reparativo en el 40% de las muestras (14/35).
 - *Existen diferencias estadísticamente significativas IRAR respecto NIRAR (test χ^2 , $p < 0,05$).*
- Una muestra (1/35 = 2,8%) presentó un coagulo del 90% de la luz del vaso, coincidiendo con la zona de la anastomosis arterial. Esta muestra presentaba discontinuidad endotelial.
 - *No existen diferencias estadísticamente significativas IRAR respecto NIRAR (test χ^2 , $p > 0,05$).*

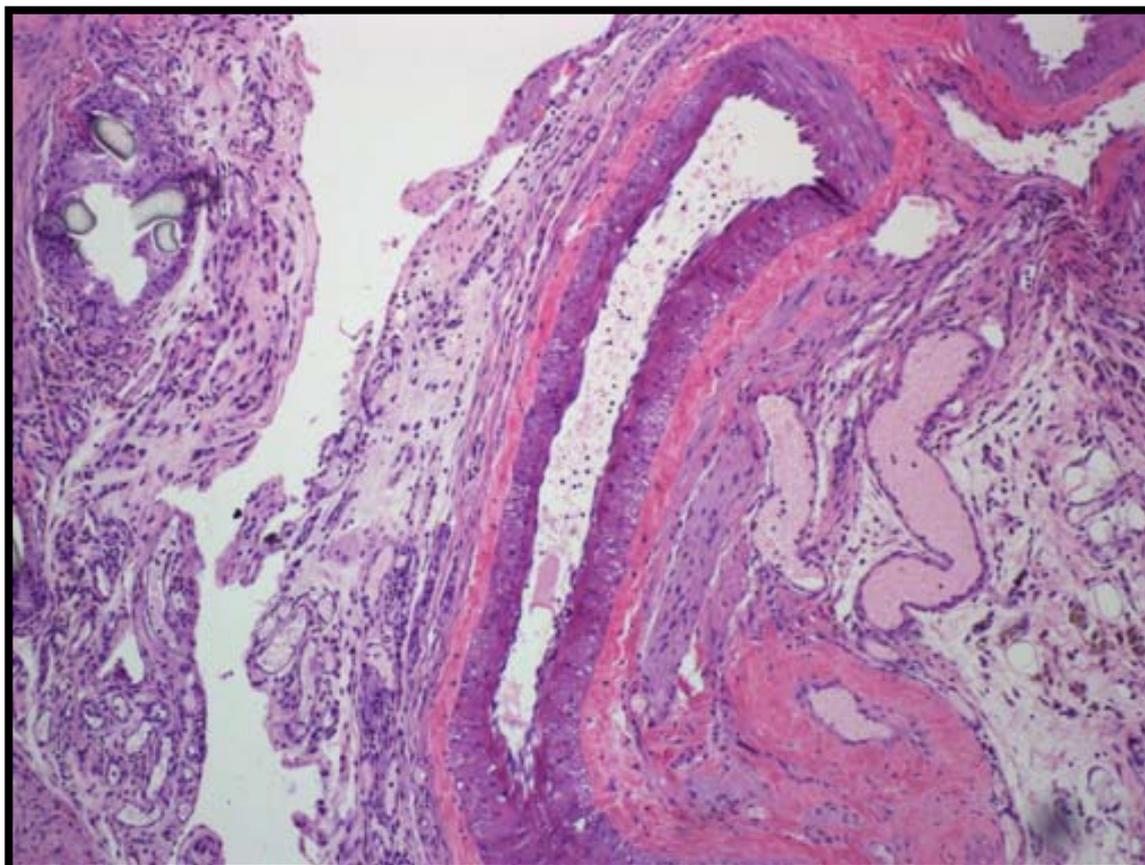


Figura 64. Imagen histológica arteria grupo IRAR (corte transversal, H&E 4x). Hiperplasia marcada íntima. Desorganización capa muscular. Reacción granulomatosa a cuerpo extraño en túnica adventicia rodeando el material de sutura.

- Capa íntima:
 - La capa íntima presentó una proliferación hiperplásica en el 100% de las muestras (35/35).
 - *No existen diferencias estadísticamente significativas IRAR respecto NIRAR (test X^2 , $p > 0,05$).*
 - En las muestras que presentan una hiperplasia de la íntima, se observa una disminución media de la luz arterial del 20 al 40%, sin trombosis asociada.
 - *Existen diferencias estadísticamente significativas IRAR respecto NIRAR (Test X^2 , $p < 0,05$).*

- Una muestra (1/35 = 2,8%) presentó un coágulo del 90% de la luz del vaso, coincidiendo con la zona de la anastomosis arterial. Esta muestra presentaba hiperplasia de la íntima.

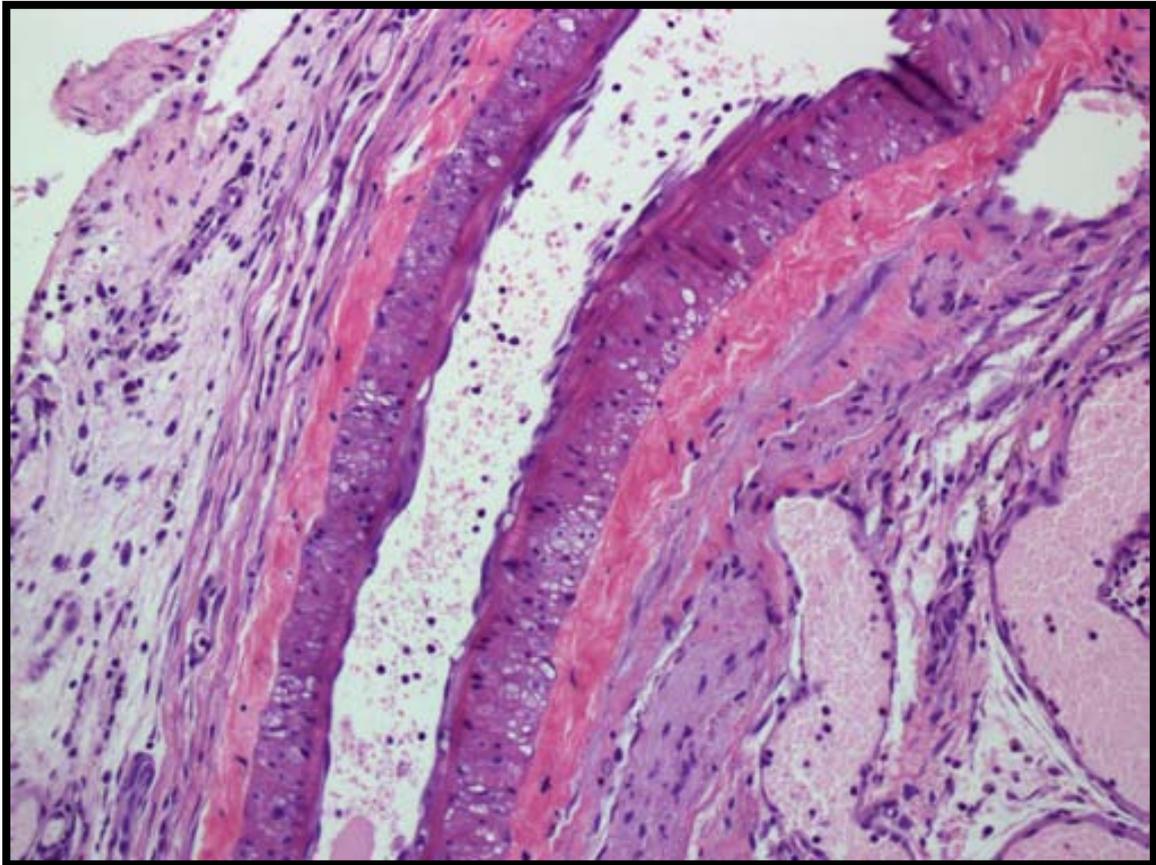


Figura 65. Imagen histológica arteria grupo IRAR (corte transversal, H&E 20x). Discontinuidad endotelial, hiperplasia marcada íntima. Desorganización, aplasia y vacuolización capa media.

- Capa media:
 - La capa media presentó una disminución progresiva del número de células musculares y vacuolización de las mismas en el 80% de las muestras (28/35).
 - *Existen diferencias estadísticamente significativas IRAR respecto NIRAR (test X^2 , $p < 0,05$).*

- En la zona de la microanastomosis se observan zonas de calcificación y sustitución de tejido muscular por tejido fibroblástico reparativo en el 100% de las muestras analizadas (35/35).
- *No existen diferencias estadísticamente significativas IRAR respecto NIRAR (test X^2 , $p > 0,05$).*

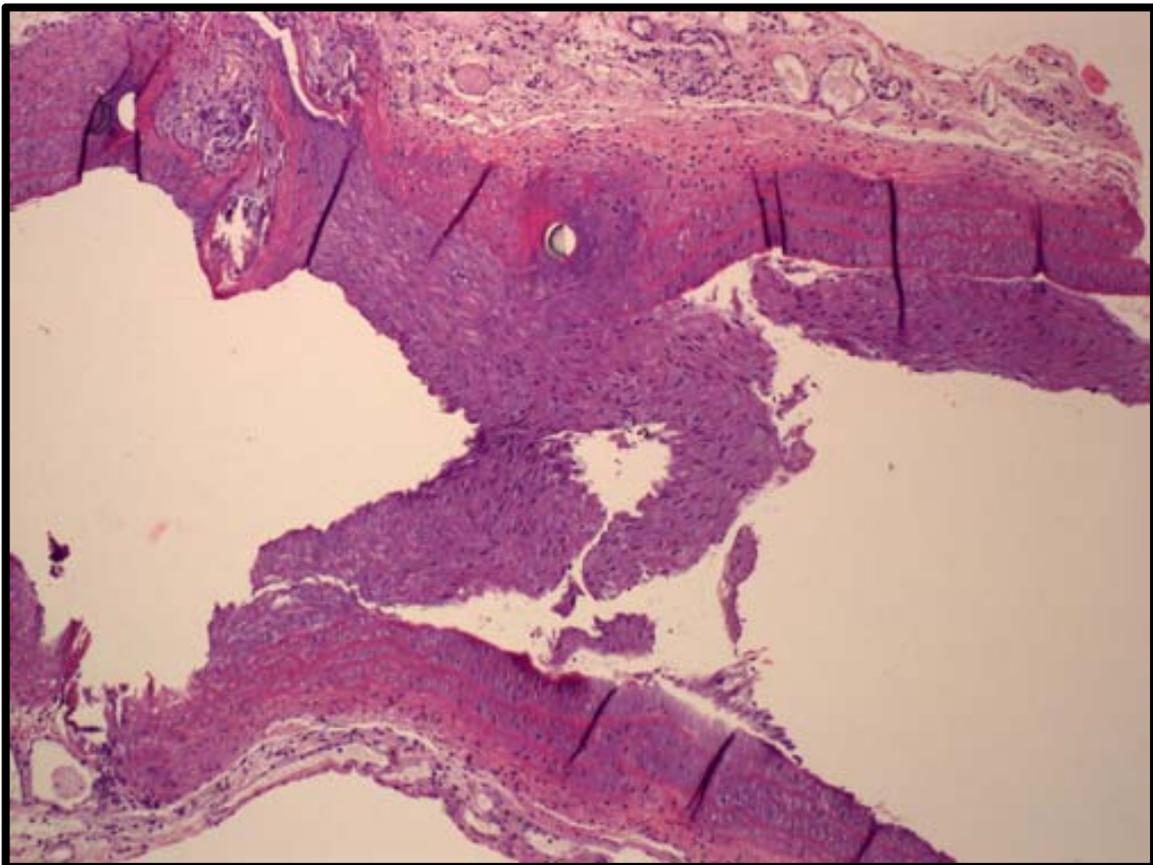


Figura 66. Imagen histológica arteria grupo IRAR (corte longitudinal, H&E 10x). Vacuolización y desorganización de la capa media. Reacción a cuerpo extraño.

- Capa adventicia:
 - En la zona de la microanastomosis se observan zonas de calcificación, edema, fibrosis e infiltración por leucocitos polimorfonucleares en el 100% de las muestras analizadas (35/35). Reacción granulomatosa a cuerpo extraño.

- *No existen diferencias estadísticamente significativas IRAR respecto NIRAR (test X^2 , $p > 0,05$).*
- En el 34,3% de las muestras (12/35) se observa trombosis de vasos accesorios en la adventicia.
- *Existen diferencias estadísticamente significativas IRAR respecto NIRAR (test X^2 , $p < 0,05$).*

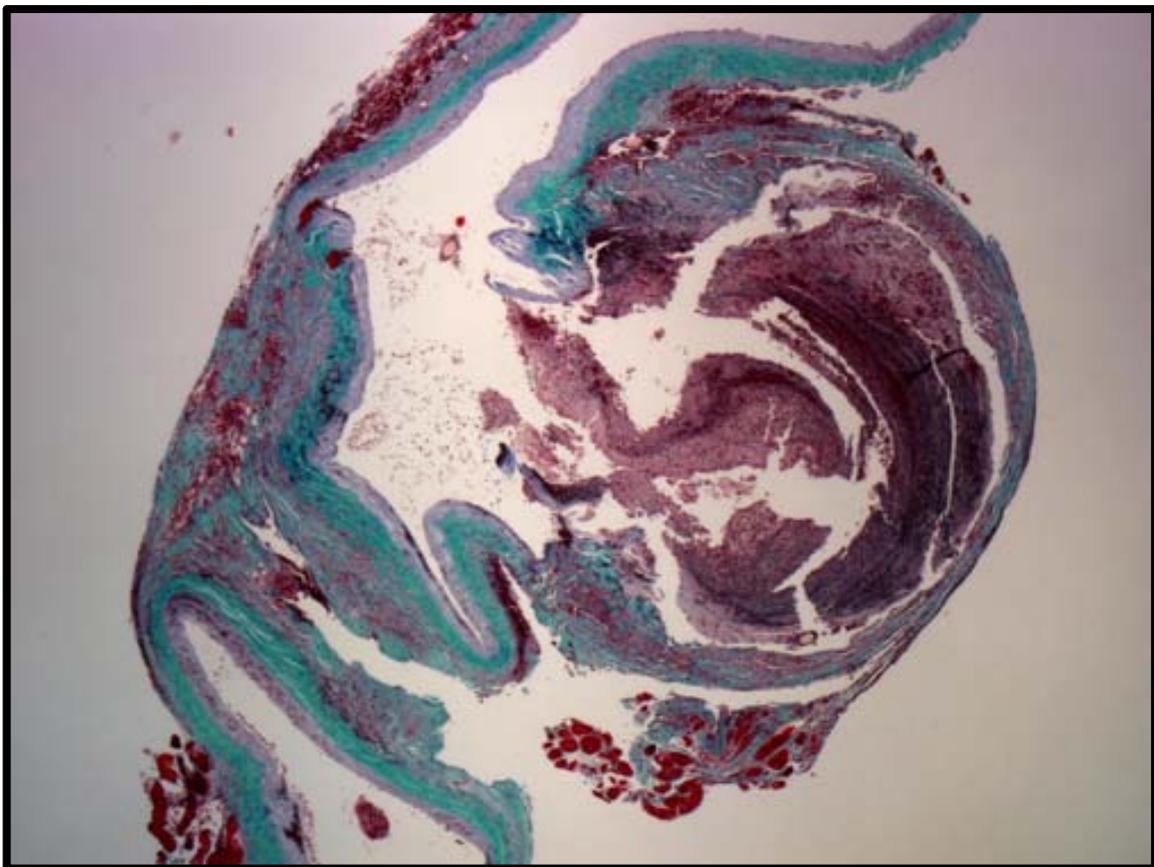


Figura 67. Imagen histológica arteria grupo IRAR (corte coronal, Tricrómico 20x). Pseudoaneurisma y trombosis de vaso accesorio.

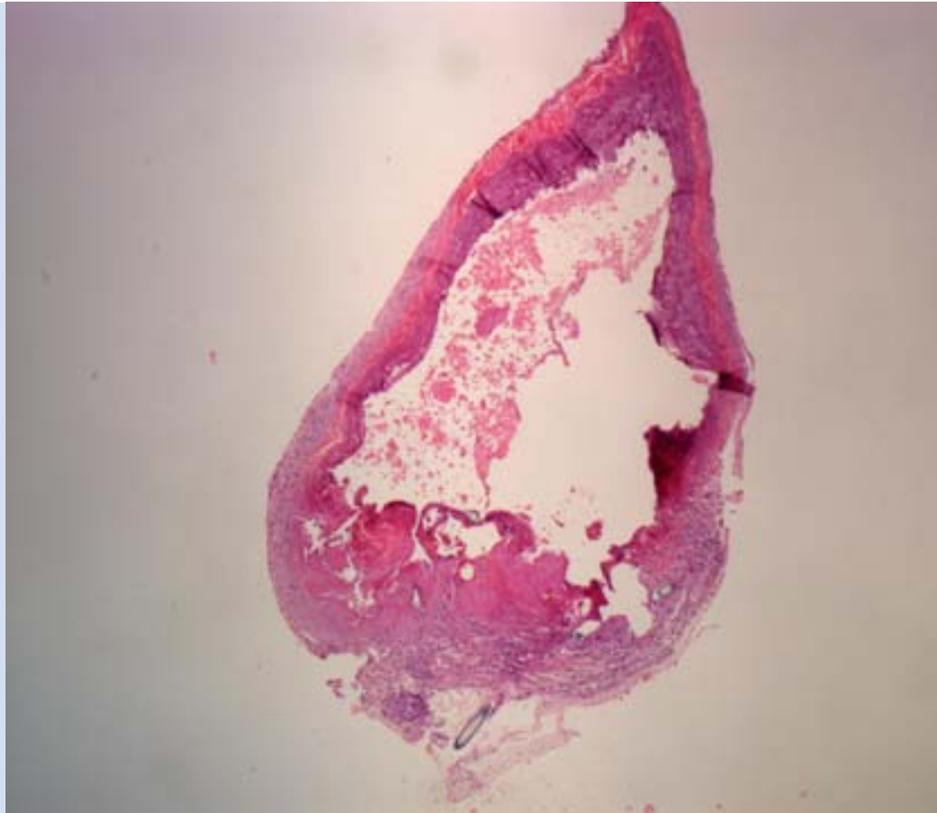
Tabla 25. Resultados medios histológicos arteriales carótida común. Viabilidad microanastomosis

Capa	Grupo NIRAR	Grupo IRAR
Endotelial	Discontinuidad 11,4% Hiperplasia endotelial 5,7% Trombosis 0%	Discontinuidad 37,1% Hiperplasia endotelial 40% Trombosis 2,8%
Íntima	Hiperplasia 94,3% Disminución luz 10-20%	Hiperplasia 100% Disminución luz 20-40%
Media	Aplasia celular 40% Vacuolización 40% Calcificaciones 100%	Aplasia celular 80% Vacuolización 80% Calcificaciones 100%
Adventicia	Edema 100% PMN 100% Granulación 100% Trombosis vasos accesorios 0%	Edema 100% PMN 100% Granulación 100% Trombosis vasos accesorios 34,3%

Tabla 25. Resultados histológicos arteriales divididos por estratos y grupos (irradiado IRAR vs. No irradiado NIRAR). Observamos cambios en los tejidos irradiados respecto a los no irradiados. En negrita se han destacado los cambios más significativos de predominio en el estrato endotelial y muscular.

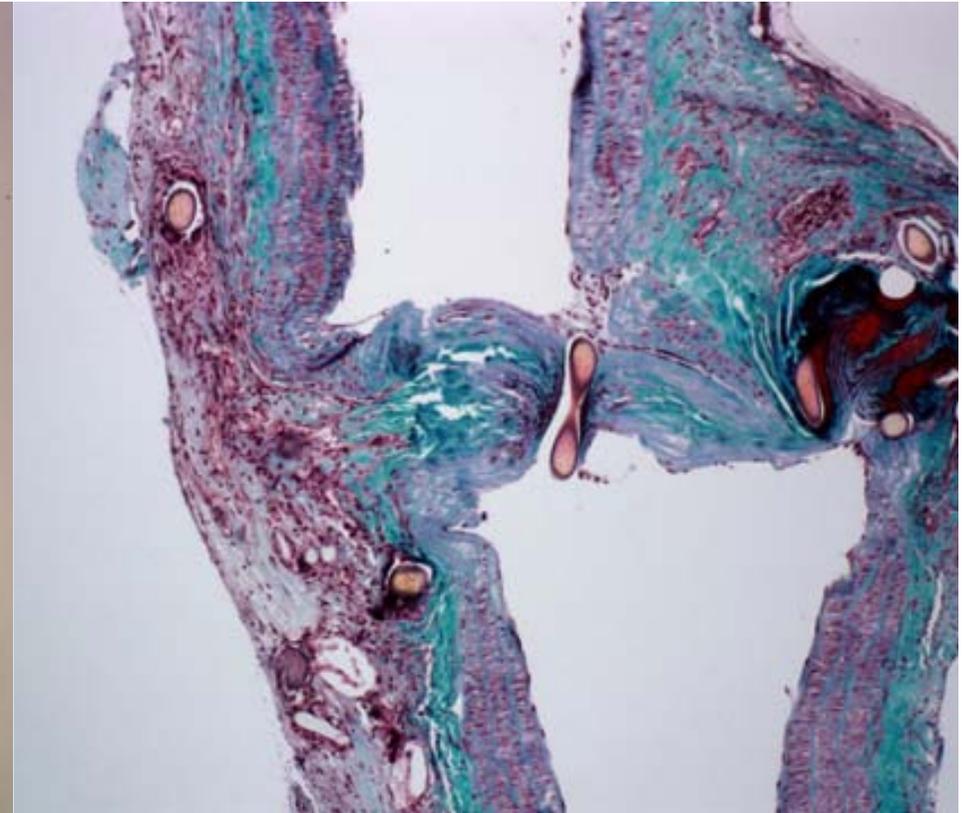
Tabla 26. Viabilidad anastomosis vascular microquirúrgica. Histología arterial

Grupo NIRAR



Muestra histológica arterial, transversal. Tinción H-E, 4x.
Se observa discontinuidad moderada de la capa endotelial.
Hiperplasia moderada de la capa íntima.
Aplasia moderada de la capa muscular.
Fibrosis de la capa adventicia.

Grupo IRAR



Muestra histológica arterial, longitudinal. Tinción TM 10x.
Se observa discontinuidad moderada de la capa endotelial.
Hiperplasia moderada de la capa íntima.
Aplasia moderada de la capa muscular.
Fibrosis de la capa adventicia.

○ **Grupo NIRVE:**

• **Capa endotelial:**

- El 48,6% de las muestras (17/35) presentan un endotelio continuo.
- El 51,4% de las muestras (18/35) presenta zonas de discontinuidad endotelial.

- *Existen diferencias estadísticamente significativas NIRVE respecto NIRAR (test X^2 , $p < 0,05$).*

- Hiperplasia endotelial con tejido fibroblástico reparativo en el 80% de las muestras (28/35).

- *Existen diferencias estadísticamente significativas NIRVE respecto NIRAR (test X^2 , $p < 0,05$).*

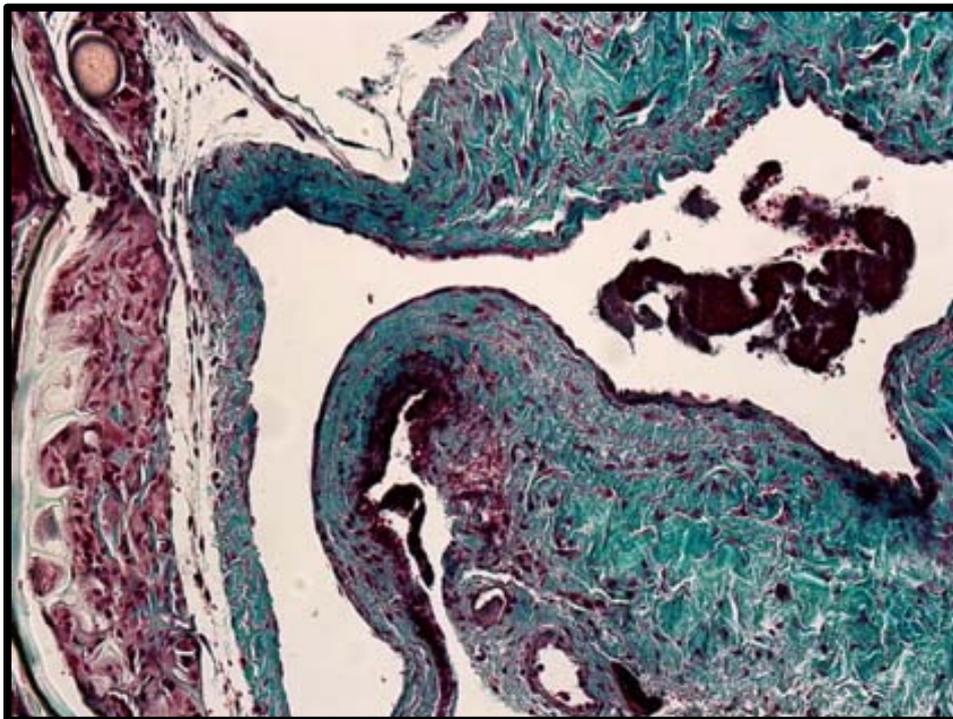


Figura 68. Imagen histológica vena grupo NIRVE (corte transversal, Tricrómico 20x). Continuidad endotelial, hiperplasia ligera íntima. Reacción granulomatosa a cuerpo extraño en túnica adventicia circunferenciando el material de sutura.

- Capa íntima:
 - La capa íntima presentó una proliferación hiperplásica en el 100% de las muestras (35/35).
 - *No existen diferencias estadísticamente significativas NIRVE respecto NIRAR (test X^2 , $p > 0,05$).*
 - Se observa una disminución media de la luz arterial del 20 al 40%, sin trombosis asociada.
 - *Existen diferencias estadísticamente significativas NIRVE respecto NIRAR (test X^2 , $p < 0,05$).*

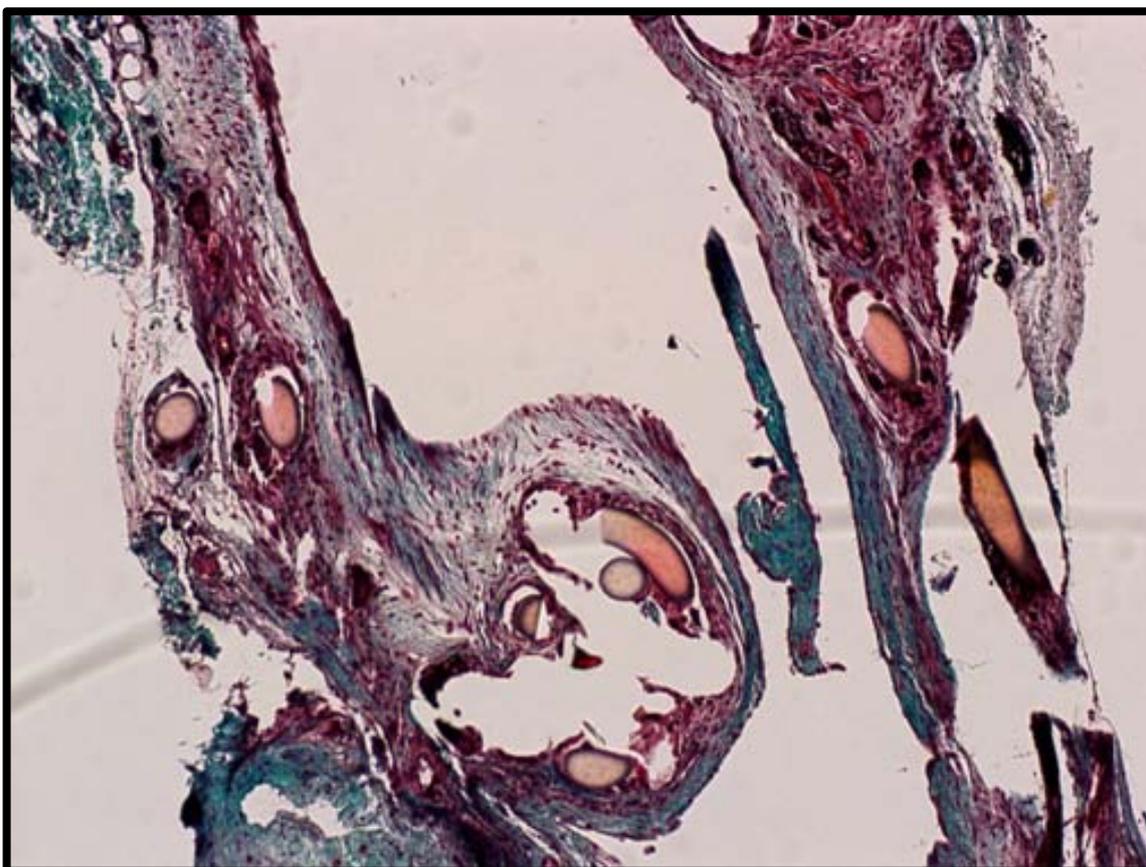


Figura 69. Imagen histológica vena grupo NIRVE (corte longitudinal, Tricrómico 10x). Continuidad endotelial, hiperplasia severa íntima en zona de anastomosis.

- Capa media:
 - La capa media presentó una disminución progresiva del número de células musculares y vacuolización de las mismas en el 100% de las muestras (35/35).
 - *Existen diferencias estadísticamente significativas NIRVE respecto IRAR (test χ^2 , $p < 0,05$).*
 - En la zona de la microanastomosis se observan zonas de calcificación y sustitución de tejido muscular por tejido fibroblástico reparativo en el 100% de las muestras analizadas (35/35).
 - *No existen diferencias estadísticamente significativas NIRVE respecto NIRAR (Test χ^2 , $p > 0,05$).*
- Capa adventicia:
 - En la zona de la microanastomosis se observan zonas de calcificación, edema, fibrosis e infiltración por leucocitos polimorfonucleares en el 100% de las muestras analizadas (35/35). Reacción granulomatosa a cuerpo extraño.
 - *No existen diferencias estadísticamente significativas NIRVE respecto NIRAR (test χ^2 , $p > 0,05$).*
 - En el 45,7% de las muestras (14/35) se observa trombosis de vasos accesorios en la adventicia.

- *Existen diferencias estadísticamente significativas NIRVE respecto NIRAR (test X^2 , $p < 0,05$).*

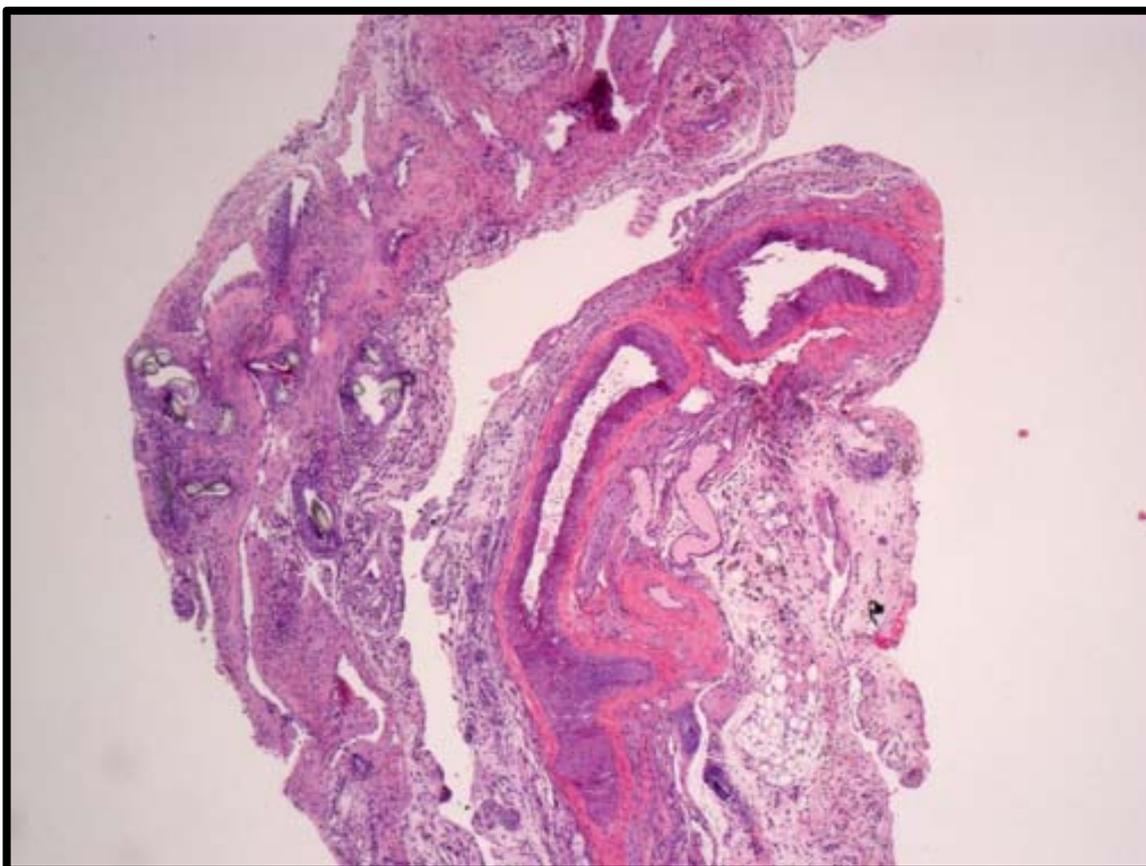


Figura 70. Imagen histológica vena grupo NIRVE (corte transversal, H-E 10x). Discontinuidad endotelial, hiperplasia marcada intima. Aplasia marcada y vacuolización de la capa media. Reacción granulomatosa a cuerpo extraño en túnica adventicia circunferenciando el material de sutura. Detalle valvular.

○ **Grupo IRVE:**

- **Capa endotelial:**
 - El 28,6% de las muestras (10/35) presenta un endotelio continuo.
 - El 71,4% de las muestras (25/35) presenta zonas de discontinuidad endotelial, sin trombosis asociada.
- *Existen diferencias estadísticamente significativas IRVE respecto IRAR*

y NIRVE (test χ^2 , $p < 0,05$).

- Hiperplasia endotelial con tejido fibroblástico reparativo en el 85,7% de las muestras (30/35).
 - Existen diferencias estadísticamente significativas IRVE respecto IRAR (test χ^2 , $p < 0,05$).
 - No existen diferencias estadísticamente significativas IRVE respecto NIRVE (test χ^2 , $p > 0,05$).
- Siete muestras (7/35 = 20%) presentaron una trombosis >90% de la luz del vaso, coincidiendo con la zona de la anastomosis venosa. Estas muestras presentaban discontinuidad endotelial.
 - Existen diferencias estadísticamente significativas IRVE respecto IRAR y NIRVE (test χ^2 , $p < 0,05$).

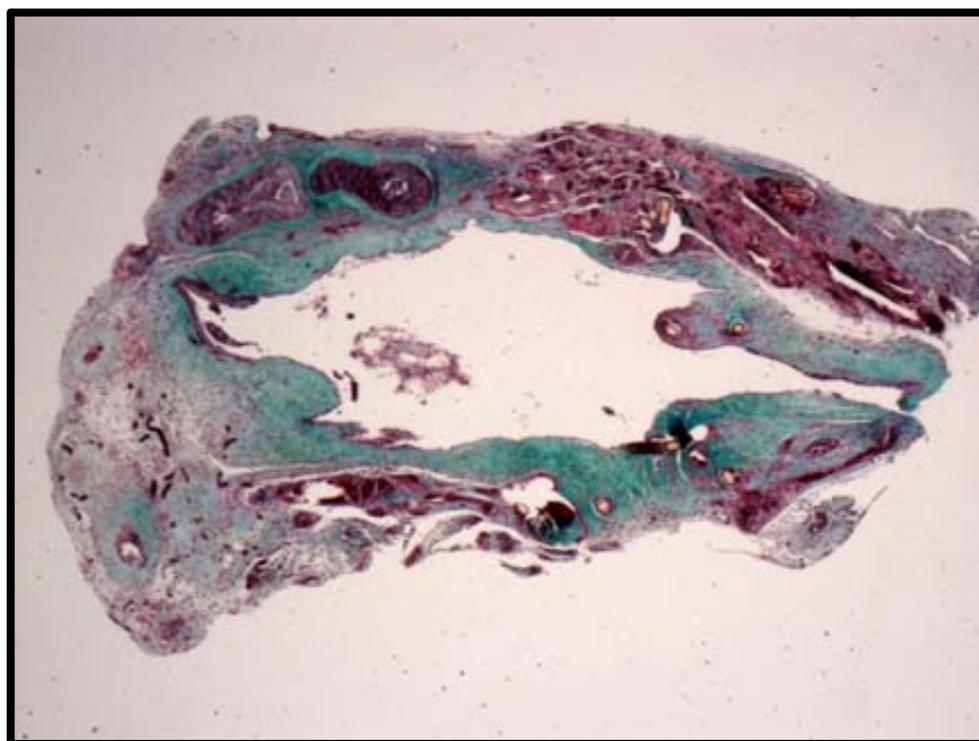


Figura 71. Imagen histológica vena grupo IRVE (corte transversal, Tricrómico 10x). Discontinuidad endotelial.

- Capa íntima:
 - La capa íntima presentó una proliferación hiperplásica en el 100% de las muestras (35/35).
 - *No existen diferencias estadísticamente significativas IRVE respecto IRAR y NIRVE (test χ^2 , $p > 0,05$).*
 - Se observa una disminución media de la luz arterial del 40-60%.
 - *Existen diferencias estadísticamente significativas IRVE respecto IRAR y NIRVE (test χ^2 , $p < 0,05$).*
 - Siete muestras (7/35 = 20%) presentaron una trombosis >90% de la luz del vaso, coincidiendo con la zona de la anastomosis venosa. Estas muestras presentaban hiperplasia de la íntima.

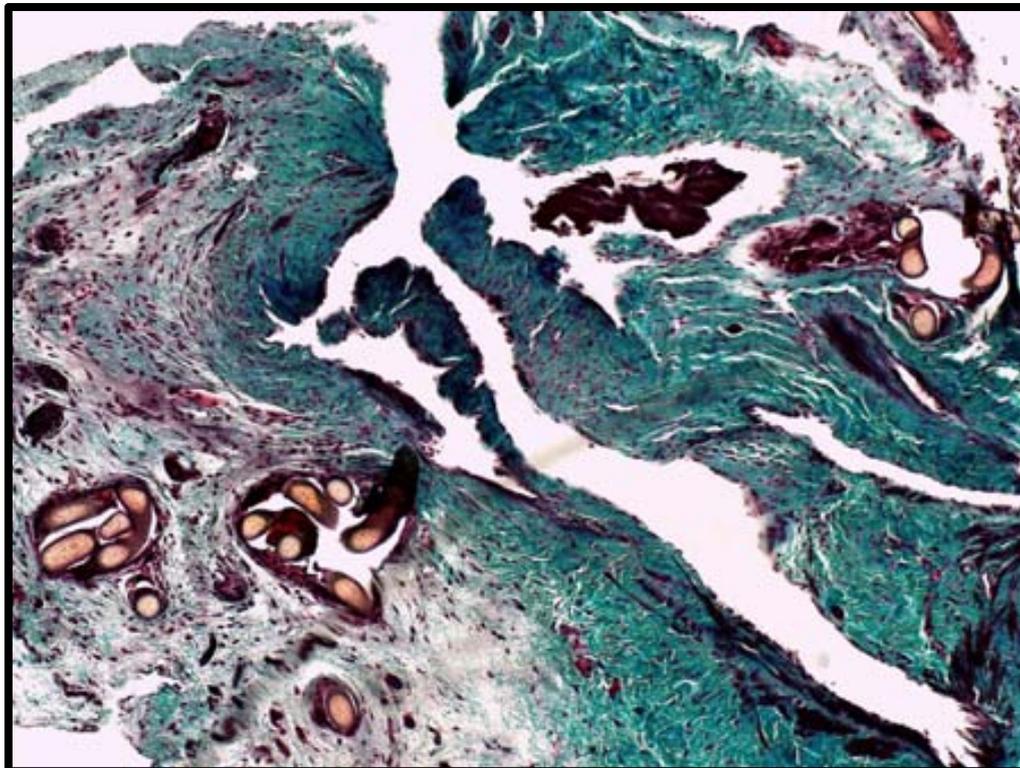


Figura 72. Imagen histológica vena grupo IRVE (corte transversal, Tricrómico 10x). Hiperplasia marcada íntima. Aplasia marcada y vacuolización de la capa media. Reacción granulomatosa a cuerpo extraño en túnica adventicia circunferenciando el material de sutura. Detalle valvular.

- Capa media:
 - La capa media presentó una disminución progresiva del número de células musculares y vacuolización de las mismas en el 100% de las muestras (35/35).
 - *No existen diferencias estadísticamente significativas IRVE respecto IRAR y NIRVE (test X^2 , $p > 0,05$).*
 - En la zona de la microanastomosis se observan zonas de calcificación y sustitución de tejido muscular por tejido fibroblástico reparativo en el 100% de las muestras analizadas (35/35).
 - *No existen diferencias estadísticamente significativas IRVE respecto IRAR y NIRVE (test X^2 , $p > 0,05$).*

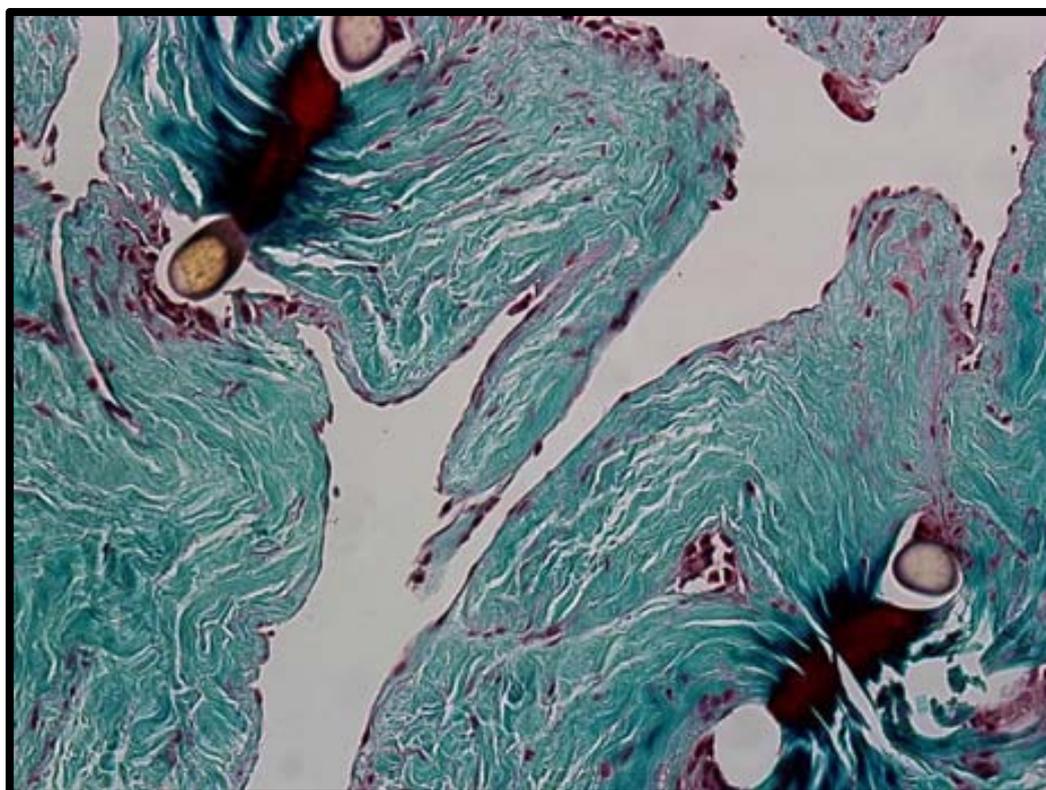


Figura 73. Imagen histológica vena grupo IRVE (corte transversal, Tricrómico 10x). Hiperplasia marcada de la capa íntima. Calcificaciones circundando el material de sutura.

- Capa adventicia:
 - En la zona de la microanastomosis se observan zonas de calcificación, edema, fibrosis e infiltración por leucocitos polimorfonucleares en el 100% de las muestras analizadas (35/35). Reacción granulomatosa a cuerpo extraño.
 - *No existen diferencias estadísticamente significativas IRVE respecto IRAR y NIRVE (test X^2 , $p > 0,05$).*
 - En el 51,4% de las muestras (18/35) se observa trombosis de vasos accesorios en la adventicia.
 - *Existen diferencias estadísticamente significativas IRVE respecto IRAR (test X^2 , $p < 0,05$).*
 - *No existen diferencias estadísticamente significativas IRVE respecto NIRVE (test X^2 , $p > 0,05$).*

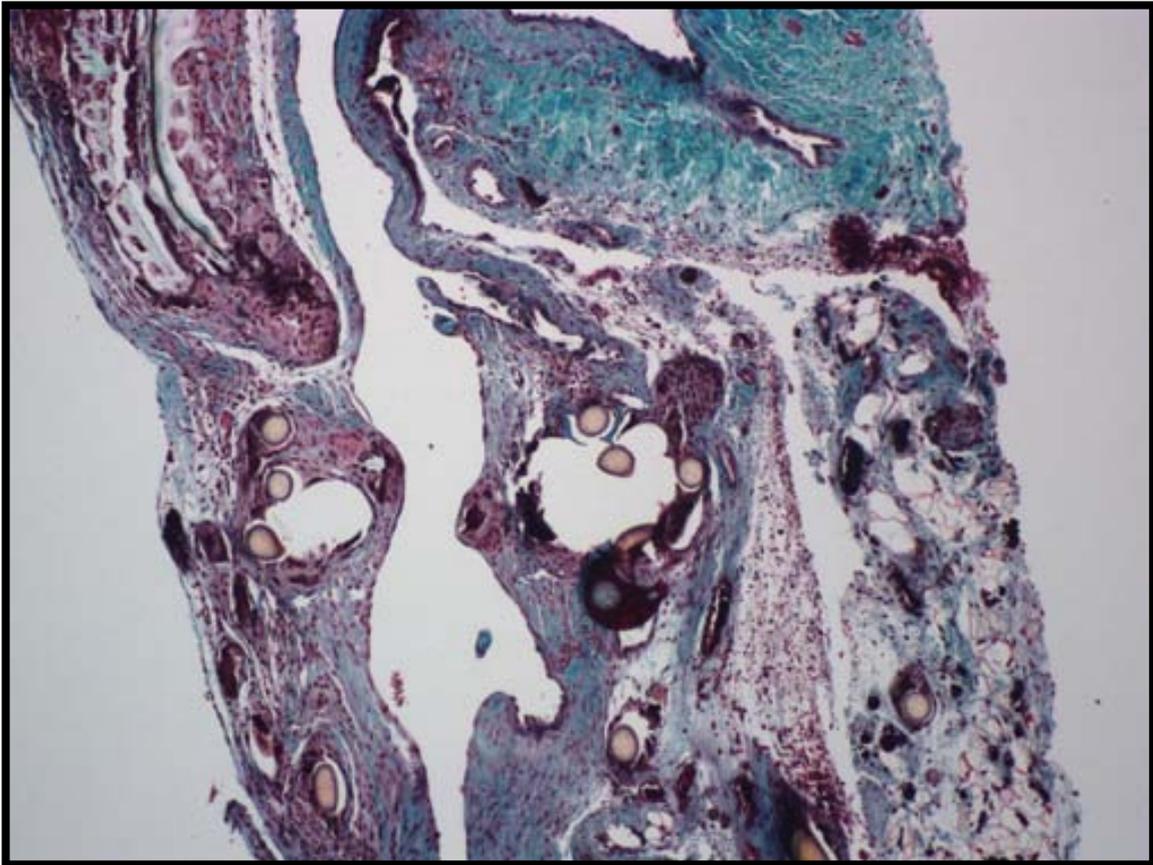


Figura 74. Imagen histológica vena grupo NIRVE (corte transversal, Tricrómico 10x) Discontinuidad endotelial, hiperplasia marcada intima. Reducción luz vascular 40-60%. Reacción granulomatosa a cuerpo extraño en túnica adventicia.

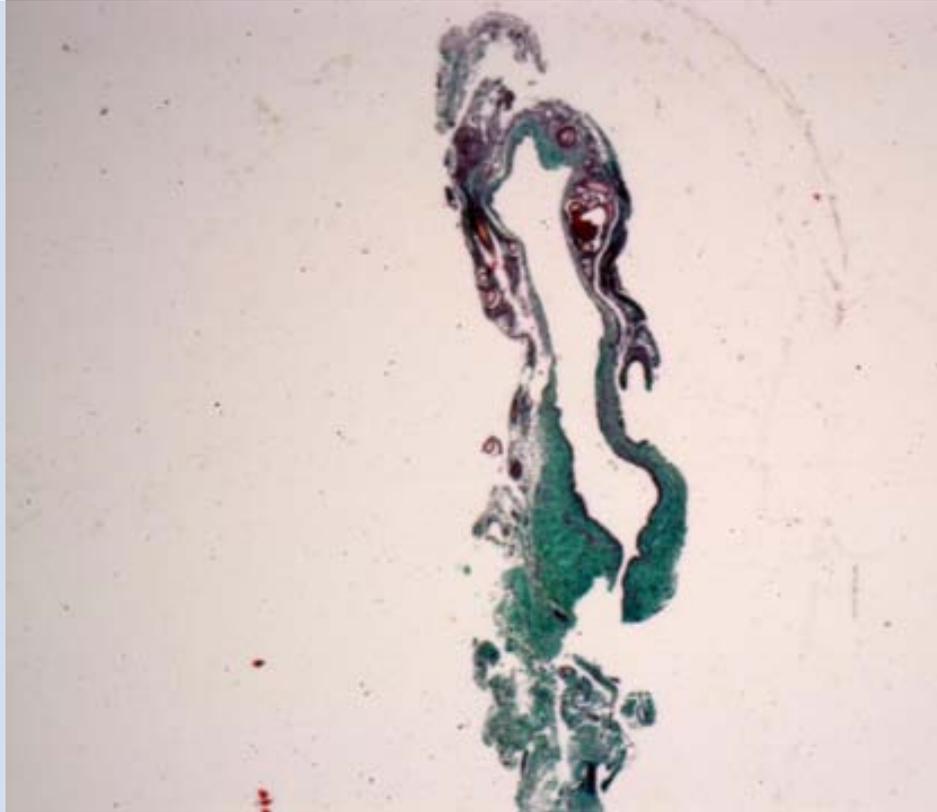
Tabla 27. Resultados medios histológicos venosos yugular externa. Viabilidad microanastomosis

Capa	Grupo NIRVE	Grupo IRVE
Endotelial	Discontinuidad 51,4% Hiperplasia endotelial 80% Trombosis 0%	Discontinuidad 71,4% Hiperplasia endotelial 85,7% Trombosis 20%
Íntima	Hiperplasia 100% Disminución luz 20-40%	Hiperplasia 100% Disminución luz 40-60%
Media	Aplasia celular 100% Vacuolización 100% Calcificaciones 100%	Aplasia celular 100% Vacuolización 100% Calcificaciones 100%
Adventicia	Edema 100% PMN 100% Granulación 100% Trombosis vasos accesorios 45,7%	Edema 100% PMN 100% Granulación 100% Trombosis vasos accesorios 51,4%

Tabla 27. Resultados histológicos venosos divididos por estratos y grupos (irradiado IRVE vs. No irradiado NIRVE). Observamos cambios en los tejidos irradiados respecto a los no irradiados. En negrita se han destacado los cambios más significativos de predominio en el estrato endotelial.

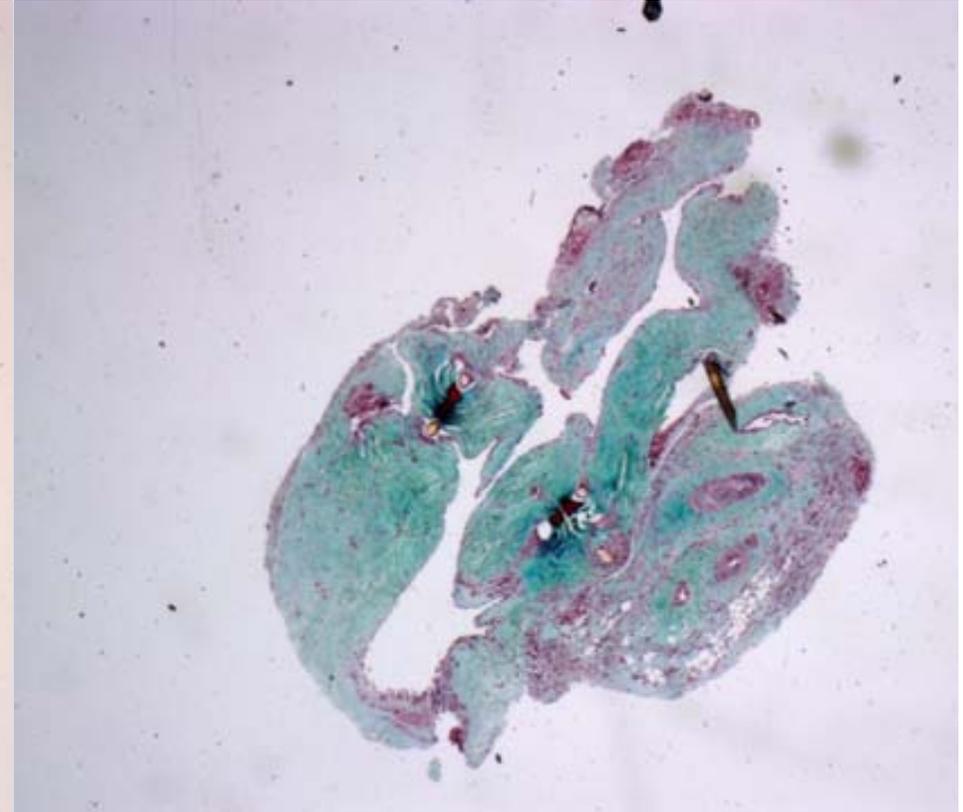
Tabla 28. Viabilidad anastomosis vascular microquirúrgica. Histología venosa

Grupo NIRVE



Muestra histológica venosa transversal. Tinción tricrómico Masson 4x.
Se observa discontinuidad de la capa endotelial.
Hiperplasia de la capa íntima.
Aplasia moderada de la capa muscular.
Fibrosis de la capa adventicia.

Grupo IRVE



Muestra histológica venosa transversal. Tinción tricrómico Masson 4x.
Se observa discontinuidad severa de la capa endotelial.
Hiperplasia severa de la capa íntima.
Aplasia moderada de la capa muscular.
Fibrosis de la capa adventicia. Reacción a cuerpo extraño.

Tabla 29. Resultados medios histológicos vasculares. Viabilidad microanastomosis vascular

Capa	Grupo NIRAR	Grupo IRAR	Grupo NIRVE	Grupo IRVE
Endotelial	Discontinuidad 11,4%*	Discontinuidad 37,1%*	Discontinuidad 51,4%*	Discontinuidad 71,4%*
	Hiperplasia endotelial 5,7%*	Hiperplasia endotelial 40%*	Hiperplasia endotelial 80%*	Hiperplasia endotelial 85,7%*
	Trombosis 0%*	Trombosis 2,8%*	Trombosis 0%*	Trombosis 20%*
Íntima	Hiperplasia 94,3%	Hiperplasia 100%	Hiperplasia 100%	Hiperplasia 100%
	Disminución luz 10-20%	Disminución luz 20-40%	Disminución luz 20-40%	Disminución luz 40-60%*
Media	Aplasia celular 40%	Aplasia celular 80%	Aplasia celular 100%	Aplasia celular 100%
	Vacuolización 40%	Vacuolización 80%	Vacuolización 100%	Vacuolización 100%
	Calcificaciones 100%	Calcificaciones 100%	Calcificaciones 100%	Calcificaciones 100%
Adventicia	0%	34,3%	45,7%	51,4%

* Resultados con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

7. DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

7.1 Nuevo modelo preclínico seguro de irradiación cervical. Modelo animal en rata

Actualmente, como resultado de los avances en las técnicas quirúrgicas y los implantes de reconstrucción, el salvamento de extremidad se ha convertido en el estándar de tratamiento en los pacientes afectados de sarcomas de partes blandas (SPB)¹⁻⁵. Además, gracias a las mejoras en el tratamiento adyuvante, ha aumentado la tasa de supervivencia y el tiempo de seguimiento de los pacientes, lo cual ha conllevado el aumento de las exigencias en la calidad de las técnicas reconstructivas⁶⁻⁸.

El tratamiento de esta patología se basa en un enfoque multidisciplinar. Generalmente requiere la combinación de cirugía con márgenes amplios y RT asociada (neoadyuvante o adyuvante), y ocasionalmente según el subtipo histológico la quimioterapia³⁰⁻³³.

7.1.1 Elección del protocolo de irradiación

Los protocolos de RT contemplan la RT neoadyuvante y adyuvante^{1,5,17-22}. Ambas opciones logran unos resultados similares en el control local tumoral y en la supervivencia del paciente. La RT neoadyuvante generalmente requiere campos (cm²) y dosis (Gy) de RE menores^{17,19,20}. Las dosis radioterápicas mayores se asocian a peores resultados funcionales y más efectos secundarios locales. Por otro lado, algunas

características tumorales tales como, el tamaño, el grado histológico, la profundidad o la localización, se asocian a un peor pronóstico vital^{24,25}. Usualmente, la RT neoadyuvante se reserva para aquellos casos en los que las características tumorales prevén un peor control local¹⁷⁻¹⁹.

A pesar de las posibles ventajas de la radioterapia preoperatoria, las tasas más elevadas de complicaciones relacionadas con la herida quirúrgica son una fuente de preocupación para los cirujanos oncológicos¹¹⁻¹⁵. Sin embargo, también se han reportado tasas altas de complicaciones de la herida en casos no irradiados, especialmente en aquellas resecciones más complicadas¹⁶. O'Sullivan et al. realizaron un ensayo clínico aleatorizado multicéntrico para determinar si la planificación de la irradiación externa (preoperatoria o postoperatoria) afectaba a la tasa de complicaciones de la herida. Estratificaron los tumores por tamaño (<10 cm o >10 cm), y se aleatorizaron 94 pacientes con RT neoadyuvante (50 Gy en 25 fracciones) y 96 pacientes con RT adyuvante (66 Gy en 33 fracciones)¹¹. El objetivo primario fue evaluar la tasa de complicaciones de la herida en los 120 días postoperatorios. Se registraron complicaciones de la herida quirúrgica en el 35% del grupo de RT neoadyuvante y 17% en el grupo de RT adyuvante. La supervivencia global fue ligeramente mejor en los pacientes que recibieron RT neoadyuvante. Por lo que recomendaron que, debido a que la RT neoadyuvante se asocia con un mayor riesgo de complicaciones de la herida que la RT postoperatoria, la elección del tratamiento en los pacientes con SPB debe tener en cuenta el momento de la cirugía y la radioterapia, y el tamaño y la localización anatómica del tumor.

A pesar de ello, la decisión terapéutica final depende en muchas ocasiones de la experiencia adquirida en cada centro, sin existir un consenso en el protocolo

radioterápico en el tratamiento de los SPB. A pesar de que actualmente no hay una evidencia científica que lo corrobore, la tendencia actual de los grupos pioneros en estudio de sarcomas es a intentar incrementar el uso de la RT neoadyuvante. Por ello, sumado a la controversia actual existente en este ámbito, hemos decidido realizar un modelo experimental animal de irradiación neoadyuvante.

7.1.2 Elección del animal de estudio

La elección de la rata cepa Sprague-Dawley como el modelo experimental, fue en base a los modelos previos descritos, donde el uso de las ratas es ampliamente mayoritario (tabla 30), respecto a otros modelos en animales intermedios como el conejo o el *mini-pig*.

El uso de ratas en experimentación está ampliamente extendido ya que fue el primer animal domesticado por razones puramente científicas. La importancia histórica de esta especie para la investigación científica se refleja en la cantidad de literatura sobre el mismo, alrededor de un 50% más que en ratones. Las ratas de experimentación difieren de las ratas silvestres en varios aspectos: son más tranquilas, menos propensas a morder, presentan mayor tolerancia al hacinamiento y mayor capacidad de reproducción²³.

Sprague-Dawley es una raza consanguínea polivalente de rata albina. Su principal ventaja es su tranquilidad y facilidad de manejo²⁴.

7.1.3 Elección de la dosis de irradiación

En este estudio, hemos creado un modelo de irradiación neoadyuvante mediante una técnica sencilla, reproducible y económica. Hemos seleccionado una

monodosis de radiación externa de 20 Gy. Los efectos histológicos arteriales, venosos y neurales fundamentales de la RT, como la disminución de la angiogénesis, el retraso de la transformación miofibroblástica, discontinuidad de estrato endotelial e hiperplasia de la capa íntima, aplasia y vacuolización de la capa muscular, además de edema y fibrosis de la capa adventicia, pueden ser objetivados con una única dosis de 20 Gy¹⁴, motivo por el que se ha decidido utilizar esta dosis en el actual modelo. Los hallazgos obtenidos en el análisis histológico de las muestras de este estudio se corresponden con los presentados previamente en la literatura^{10,12-13,24}.

A pesar de todo ello, la dosis utilizada en este modelo, es superior a la administrada en algunos de los modelos experimentales previos en los que se utilizan dosis de 2,5 a 15 Gy, incluso utilizando dosis fraccionadas semanalmente^{10,12,14,26-29}.

La finalidad de utilizar mayor dosificación de irradiación externa y hacerlo en una dosificación única, es, de acuerdo a los trabajos presentados previamente, la de reproducir con la mayor fidelidad posible las peores condiciones clínicas y favorecer la aparición de efectos secundarios locales agudos post RT. Así, en estas circunstancias podemos probar con mayor rotundidad nuestro modelo experimental.

7.1.4 Elección de la localización de irradiación

Los resultados en la bibliografía más estables y satisfactorios en términos de permeabilidad microquirúrgica vascular, se han obtenido en la zona cervical respecto a la zona inguinal³²⁻³³. Esto probablemente sea debido al tamaño y a la accesibilidad del paquete NV cervical (arteria carótida común, vena yugular interna y nervio vago). Por otro lado, los modelos experimentales previos de irradiación de la región de la cabeza y el cuello en rata han presentado efectos locales devastadores comparados con los

efectos locales de la zona inguinal^{26-30,34,35}. Es por ello, que gran parte de los estudios experimentales microquirúrgicos en territorio irradiado se han realizado en la zona inguinal, sin obtener resultados equiparables en términos de viabilidad de la anastomosis vascular a los obtenidos en la zona cervical^{4,6-8,10,12,14,31}.

De todo ello, surge nuestra necesidad de crear un modelo seguro de irradiación del paquete NV cervical, con datos altamente reproducibles y bajos efectos secundarios locales. Este modelo de irradiación, al contrario que los previamente descritos en los que se irradiada indiscriminadamente cabeza y cuello²⁶⁻²⁹, se basa en la irradiación selectiva de la región hemicervical izquierda mediante un campo frontal de 2 x 2 cm que cubre el paquete neurovascular cervical y evita la irradiación innecesaria de las estructuras vitales circundantes.

7.1.5 Evaluación del modelo animal experimental

Nagler (2001) evaluó en un estudio experimental los efectos agudos, subagudos y crónicos de la irradiación cervical en ratas⁴⁹. Distribuyó las ratas en 6 grupos de 18 a 20 ratas, y las controló clínicamente durante un año. El grupo de control no irradiado se comparó con grupos irradiados con 2,5 Gy, 5, 7,5, 10 y 15 Gy. Encontraron una disminución dependiente de la dosis, tanto en la supervivencia como en el peso corporal.

Los efectos agudos postRT (2 primeras semanas) son consecuencia de una severa mucositis orofaríngea. En el estudio de Nagler, estaba presente en el 66% de los animales irradiados con 15 Gy, lo que provocó la ralentización de la ganancia de peso corporal, úlceras bucales, muerte del 30% de los animales irradiados con 10 Gy y muerte del 40% de los irradiados con 15 Gy²⁶⁻²⁹. Stiubea-Cohen (2012) presentó un

estudio experimental en ratas en el que evaluaba el efecto de la RT craneal en las glándulas submandibulares¹⁰⁴. Objetivó que una sola dosis de 15 Gy de RT en cabeza y cuello en un modelo de rata reduce la producción de saliva en un 50%, con una reducción de la ganancia de peso del 25% y aumento de la mortalidad del 32%. Nuestro modelo presenta una mortalidad aguda postRT del 7% (5 muertes / 72 casos), una mortalidad subaguda del 2% (1 muerte / 48 casos) y una mortalidad total del 8,3% (6 muertes / 72 casos), menor que los presentados anteriormente en la literatura.

Otros efectos secundarios muy prevalentes en la literatura^{26-29,34,35,49,104}, relacionados con los tejidos y órganos expuestos dentro del campo de irradiación cervical, como xerostomía, osteoradionecrosis, trastornos de la deglución, aneurismas vasculares o hipofunción tiroidea, también han sido minimizados en nuestro modelo experimental. Todo ello, se ha visto reflejado en el peso corporal de los animales, que registró un aumento progresivo en todos los grupos, sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos no irradiados y grupos irradiados. Estos datos no se corresponden con la literatura publicada²⁶⁻³⁰, donde la pérdida de peso corporal se relaciona como efecto secundario dosis dependiente de la irradiación, objetivándose diferencias de peso estadísticamente significativas en los grupos RT (15 Gy).

El modelo de irradiación cervical de 20 Gy presentado logra inducir cambios radicos importantes en el paquete NV cervical sin afectar a los tejidos vitales circundantes. Lo que se traduce en un modelo seguro y reproducible con tasas de morbilidad y mortalidad en las ratas muy inferiores a los modelos previos y permitiría disenar y realizar estudios experimentales terapéuticos sobre el paquete NV cervical recreando las dimensiones (diámetro vascular y longitud del pedículo) y características mecánicas (grosor de la pared vascular) y fisiológicas de las estructuras humanas¹⁰⁵.

Tabla 30. Modelos experimentales previos de microanastomosis en población irradiada

Autor	Animal cepa	Nº	Tipo RT	Zona RT	Dosis RT	Tipo IQ	Resultados
Baker 1978	Rata Sprague-Dawley	28	Neoadyuvante 4 semanas pre	Inguinal	4-6 Gy	Anastomosis arterial femoral	No diferencias significat Trombosis RT 22,2% Trombosis no RT 30%
Tan 1978	Conejos New Zealand	48	Neoadyuvante 6 semanas pre 3 meses pre	Inguinal	2 Gy	Colgajo libre femoral a epigástrico	Diferencias significativas Necrosis 50% colgajos RT Necrosis 10% colgajos no RT
Watson 1979	Rata Sprague-Dawley	40	Neoadyuvante 3 meses pre 9 meses pre	Inguinal	2,5-9 Gy	Anastomosis arterial/venosa femoral	Diferencias significativas 4-5% Trombosis Arterial 31% Trombosis Venosa RT
Bruce 1979	Rata Fischer-Lewis	20	Neoadyuvante Secuenciada 6 semanas pre	Inguinal	4-6 Gy	Colgajo libre femoral a epigástrico	No diferencias significativas Trombosis RT 20% Trombosis no RT 0%
Krag 1982	Conejos New Zealand	20	Neoadyuvante 6 semanas pre	Cervical	20 Gy	Anastomosis arterial/venosa Carótida/Facial	Diferencias significativas 2% Trombosis Arterial 12% Trombosis Venosa RT
Aitasalo 1992	Ratas Wistar Albino	24	Neoadyuvante 1 semana pre	Femoral	20 Gy	Colgajo libre femoral a epigástrico	No diferencias significativas Trombosis RT 23,1% Trombosis no RT 18,2%
Arinci 2000	Rata Sprague-Dawley	40	Neoadyuvante 2 semanas pre	Femoral	20 Gy	Anastomosis arterial femoral	No diferencias significativas Trombosis RT 20% Trombosis no RT 0%
Takan 2004	Guinea Pigs	18	Neoadyuvante 2 semanas pre	Femoral	20 Gy	Colgajo libre femoral a epigástrico	No diferencias significat. Trombosis RT 25% Trombosis no RT 19%

7.2 Viabilidad de la anastomosis vascular microquirúrgica en población

irradiada

En ocasiones, es preciso recurrir a técnicas microquirúrgicas para completar el tratamiento integral de los SPB. El uso de técnicas microquirúrgicas actualmente está ampliamente extendido en la reconstrucción de defectos funcionales (óseos o musculares) y de cobertura cutánea, generados durante la resección quirúrgica oncológica^{2-5,11,15,82-89}. La tasa de éxito en procedimientos microquirúrgicos en tejidos no irradiados varía desde el 90 al 99% según las series^{7-11,14-16,30,85}. Existe amplia controversia sobre si estos resultados se mantienen sobre campos previamente irradiados^{11,15-16}. Es ampliamente aceptado que la mayoría de fracasos en procedimientos microquirúrgicos se deben a fenómenos vasculares como la trombosis arterial, venosa o de ambos vasos^{2-6,8,10,12,31}.

Halle et al. (2009)²¹ demostraron una asociación entre la RT preoperatoria y la oclusión microvascular en biopsias de colgajos libres en reconstrucciones de cabeza y cuello²¹. Anteriormente, Bui et al. (2007)¹⁰⁶ mediante una revisión retrospectiva de 1193 colgajos libres, evaluaron las indicaciones, los resultados y los motivos de las revisiones quirúrgicas y los fracasos de los colgajos, y evidenciaron que los motivos vasculares y específicamente las complicaciones venosas son primordiales. Sin embargo, la patología vascular subyacente sigue sin esclarecerse completamente.

Ante la disparidad de resultados entre las diferentes series, diferentes autores han realizado trabajos en modelos experimentales. Algunos modelos preclínicos en animales previos han tratado de examinar la radiosensibilidad de la anastomosis microvascular. Los resultados obtenidos referentes a la permeabilidad de las anastomosis microvasculares han sido muy diversos^{2-6,10,12,14}. Además, esta variabilidad

en los resultados de la permeabilidad microvascular aumenta con la asociación de la RT^{2-6,10,12,14}. La opinión general es que la tasa de permeabilidad de las suturas microvasculares disminuye significativamente en aquellos vasos postRT^{11,15-16}. A pesar de ello, determinados estudios han logrado tasas muy elevadas de permeabilidad en vasos irradiados^{10,14}, aunque las diferencias en las técnicas quirúrgicas y radioterápicas utilizadas entre los diversos estudios dificulta una comparación directa objetiva.

Tan et al. (1978) y Krag et al. (1982) realizaron estudios en modelos animales en conejos que mostraron un mayor número de fracasos en colgajos cuando los vasos receptores habían sido previamente irradiados^{8,9}. Por el contrario, Baker et al. (1978) demostraron que la RT no disminuye la permeabilidad de la microanastomosis arterial¹⁰ en modelo animal en rata. Watson et al. (1979) evidenció que la radiación puede tener efectos perjudiciales mayoritariamente en venas¹¹.

Además, líneas de evidencia científica in vitro, Fischer-Dzoga et al. (1984) y Gaugler et al. (1998) y nuevos estudios in vivo en modelos animales en ratón, Paris et al. (2001) sugieren que la RT ejerce una influencia desfavorable sobre la función de las células endoteliales vasculares¹²⁻¹⁴.

A pesar de todo ello, la mayoría de los estudios experimentales en modelos animales previamente expuestos (tabla) presentan graves errores metodológicos con multitud de grupos de estudio y un pequeño número de animales por grupo, que implica un aumento desproporcionado de hasta un 50% de posibilidades de cometer errores tipo II^{23,24}. A pesar de que nuestros resultados en cuanto a la permeabilidad vascular han sido acordes al estudio de Watson et al. (1979), el cálculo estadístico muestral realizado en la fase de planificación experimental de este trabajo acepta un error tipo I o falsos positivo del 5% y un error tipo II o falso negativo del 20%, con lo

que podemos concluir con mayor potencia estadística nuestros resultados.

Los resultados obtenidos en el presente estudio reafirman los hallazgos previos. La irradiación externa (20 Gy) provoca una disminución de la permeabilidad de la microanastomosis venosa termino-terminal yugular en un modelo animal en rata. Consideramos que este hallazgo se puede deber a diversos factores, como a la mayor complejidad técnica de la microanastomosis venosa, factores histológicos y fisiológicos¹⁰⁵.

Hemos evaluado la complejidad técnica de los diferentes procedimientos quirúrgicos realizados, y hemos observado que la microsutura venosa es más compleja y costosa que la arterial en términos de tiempo quirúrgico, número de puntos utilizados por anastomosis y número de reintentos hasta obtener una permeabilidad exitosa inicial. Además, las características anatómicas de la pared vascular venosa, con una capa muscular menor que la arterial, provocan un mayor colapso vascular y mayor dificultad en el reconocimiento de la luz vascular. Todo ello conlleva un aumento del riesgo del error en la técnica quirúrgica¹⁰⁵. Por otra parte, la menor presión sistólica/diastólica del sistema cardiovascular venoso y el sistema valvular venoso provocan menor tolerancia de la microanastomosis al error técnico en la realización de la misma. A pesar de ello, evaluando los resultados obtenidos en la tasa de permeabilidad vascular arterial no irradiada respecto a la venosa no irradiada, observamos que en manos de un microcirujano experimentado, los resultados entre ambos procedimientos son comparables. Por lo tanto, parece fundamental el efecto de la irradiación externa en la histología/genética vascular venosa.

De este modo, basándonos en los resultados histológicos obtenidos en nuestro estudio, observamos diferencias significativas entre el patrón histológico vascular

venoso no irradiado, venoso irradiado y venoso irradiado y anastomosado. También observamos diferencias significativas respecto al patrón histológico vascular arterial. Básicamente observamos como la radioterapia provoca una mayor discontinuidad y aplasia del estrato endotelial venoso respecto al arterial. Por otro lado observamos una hiperplasia muy significativa de la capa íntima en las muestras venosas irradiadas anastomosadas respecto a las no anastomosadas provocando un descenso significativo del lumen vascular. De tal manera que, observamos como el efecto sumatorio de la irradiación y la microanastomosis provoca cambios tisulares significativos en el patrón vascular venoso respecto al arterial, lo que se corresponde con los resultados clínicos en cuanto a la tasa de permeabilidad vascular. Tanto la RT como la cirugía inducen efectos de inflamación aguda que pueden provocar el daño tisular y mediar en la trombosis microvascular^{16,23}. Halle et al. (2010)²² identificaron que la respuesta inflamatoria aguda por la radiación contribuye a la disfunción endotelial venosa, a la activación de la coagulación con un aumento de citoquinas y la expresión de moléculas de adhesión de leucocitos. Además también provoca una reducción de la fibrinólisis local mediante un incremento en la expresión de la molécula PAI-1, que es el principal inhibidor del sistema fibrinolítico, una condición que ha sido histológicamente vinculado a la formación de trombos en la microcirculación¹⁶, que podría explicar los hallazgos previos de una mayor tasa de oclusiones microvasculares después de la radioterapia preoperatoria en reconstrucciones con colgajos microvascular libres³. Estos datos han sido corroborados también por estudios in vitro²⁰⁻²⁷.

Estos resultados han sido obtenidos, a diferencia de los estudios previos presentados (tabla 30), de un modelo basado en un número mínimo de animales por grupo (35) calculado con una potencia estadística significativa. Por otro lado, la técnica

microquirúrgica seleccionada se ha realizado en el paquete neurovascular cervical, que es el considerado más estable, con menor colapso y menor efecto espasmódico en el modelo animal en rata¹⁰⁵.

7.3 Irradiación neoadyuvante en el tratamiento de sarcomas de partes blandas

blandas

A sí, con los resultados obtenidos en este estudio, donde se objetiva la RT neoadyuvante como un factor predisponente a la trombosis en la microanastomosis vascular venosa, debemos conocer el riesgo de planificar la reconstrucción de un SPB mediante un colgajo microvascular libre, ya que un factor negativo importante en los resultados de calidad de vida en estos pacientes es la complicación de la herida quirúrgica⁸²⁻⁹⁰.

El índice de complicaciones graves de la herida quirúrgica está relacionado con la temporalidad de la RT. Aunque la RT neoadyuvante se asocia con un mayor riesgo de complicaciones de la herida que la RT adyuvante, debe ser considerada la anatomía local cuando se hacen recomendaciones sobre el manejo de un paciente específico⁹¹⁻⁹⁵. La personalización del tratamiento en cada paciente es esencial en el tratamiento de este tipo de patología. La RT neoadyuvante es preferible en aquellos casos en los que se precisen campos o dosis de irradiación elevados, teniendo en cuenta características tales como la localización anatómica, la proximidad a estructuras sensibles, el riesgo y las consecuencias de las complicaciones, y el modo de reconstrucción de heridas. Aunque el protocolo de RT neoadyuvante presenta mayor índice de complicaciones en el período postoperatorio temprano (es decir las 6 semanas después de la cirugía), los resultados se equiparan al año después de la cirugía⁹⁴.

El objetivo de la cirugía y RT combinadas en el SPB es lograr la curación, y preservar la función. Actualmente, ambos protocolos de RT logran similares niveles de control local en el SPB de las extremidades, sin diferencias significativas en las tasas de

supervivencia libre de progresión. Aunque sólo unos pocos ensayos controlados aleatorizados han comparado la RT neoadyuvante respecto la RT adyuvante en oncología. Por otro lado, la RT preoperatoria mejora la supervivencia en pacientes con tumores en otras localizaciones, como el tracto digestivo²⁶. Actualmente, algunos estudios han detectado una tendencia no significativa hacia el descenso de la mortalidad en pacientes afectos de un SPB y tratados mediante un protocolo de RT neoadyuvante³⁰⁻³³.

Por lo que la decisión de aceptar el aumento de la morbilidad a corto plazo de complicaciones en la cicatrización de la herida en la RT neoadyuvante, debe equilibrarse con los efectos potenciales de las grandes dosis de radiación y los volúmenes asociados con la radioterapia adyuvante.

Además, hay que tener en cuenta los efectos que produce la RT en la evolución de los colgajos microvasculares libres utilizados en la reconstrucción tumoral. Fosnot et al. (2010)¹⁸ evaluaron de forma retrospectiva 226 colgajos microvasculares libres en reconstrucción oncológica mamaria, en pacientes previamente irradiados. Además de la historia médica y quirúrgica, se registraron las complicaciones vasculares, incluyendo la trombosis intraoperatoria y postoperatoria y las dificultades técnicas intraoperatorias. Sus conclusiones fueron que la RT neoadyuvante aumenta la tasa de complicaciones vasculares en la reconstrucción mamaria mediante colgajo libre. La mayoría de las complicaciones fueron intraoperatorias. Y aunque la RT no impide el éxito global de la reconstrucción, o aumenta las complicaciones vasculares postoperatorias, los cirujanos deben ser conscientes de que el trabajo en un campo previamente irradiado conlleva un riesgo técnico adicional.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que el efecto perjudicial de la RT

neoadyuvante es de menor importancia en la reconstrucción por cáncer de mama, como objetivaron Fosnot et al., mientras que la evolución postoperatoria en reconstrucciones oncológicas en cabeza y cuello y SPB es peor. Además, Kroll et al. (1998)¹⁶ y Kunisada et al. (2002) objetivaron que la evolución postoperatoria depende de la RT preoperatoria, incluyendo dosis más altas de radiación y los vasos receptores incluidos en el centro del campo de irradiación^{6,7}.

Debemos tener en cuenta que en el estudio presentado, el modelo de irradiación cervical en rata centraba el campo de irradiación en el paquete NV cervical (arteria carótida, vena yugular externa y nervio vago), y presentaba similitudes al protocolo de irradiación habitual de los SPB. Así el aumento de la tasa de trombosis venosa en el grupo irradiado podría relacionarse con los hallazgos clínicos presentados por Kroll et al. (1998)¹⁶ y Kunisada et al. (2002).

A pesar de estas reticencias en el aspecto técnico y la incerteza sobre el aumento de la tasa de trombosis vascular en la microanastomosis venosa en territorio irradiado, en los últimos años se está desarrollando un campo de investigación para disminuir la tasa de trombosis vascular. La intervención farmacológica peroperatoria también está siendo investigada, sobre todo con el desarrollo de anticoagulantes para la permeabilidad microvascular en otras disciplinas como la cardiología. Estudios previos han examinado el efecto de la aspirina, que tiene un efecto predominantemente antiplaquetario, y la heparina de bajo peso molecular, que actúa principalmente en la formación de fibrina con algún efecto sobre la agregación plaquetaria. La terapia combinando el tratamiento con heparina y aspirina se ha demostrado clínicamente efectiva con una tasa del 2,8% de fracaso de colgajos microvasculares¹⁰⁷⁻¹¹⁴. Aydin et al. (2004)¹¹⁵ presentaron un estudio con amifostina,

que es un compuesto tiofosfato orgánico, que tiene efectos citoprotectores y radioprotectores. Se realizó un estudio experimental para investigar los efectos de su uso en cirugía reconstructiva en el tratamiento del cáncer. Aunque las tasas de supervivencia del colgajo microvascular no se vieron afectadas, se observó mejor cicatrización del colgajo en el subgrupo de la RT postoperatoria con el tratamiento amifostina. Sin embargo, el tratamiento con amifostina no resultó en una diferencia estadísticamente significativa en términos de permeabilidad de la anastomosis y la regeneración del nervio, ya fuera con radioterapia preoperatoria o postoperatoria. Infanger et al. (2005)¹¹⁶ realizaron un estudio sobre la aplicación intraluminal del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) para valorar si mejoraba la cicatrización de anastomosis microvascular en un modelo de rata. Objetivaron que la osteopontina y la TGF-β1, ambas inducidas por el VEGF, pueden desempeñar un papel importante en el proceso de remodelación vascular. Los resultados sobre la aplicación de VEGF para acelerar la reendotelialización y la mejora de la cicatrización vascular después de la microcirugía fueron muy alentadores. Lewis et al. (2008)¹¹⁷ mediante un estudio aleatorizado en un modelo animal en rata de trombosis venosa, concluyeron que el uso de desirudina preoperatoria aumenta la tasa de permeabilidad de la anastomosis microvascular, disminuye la aparición de coágulos, y aumenta el tiempo de sangrado en un modelo preclínico en rata, lo que indica la eficacia potencial en pacientes sometidos a transferencia de tejido libre microvascular. Janz et al. (2011)¹¹⁸ estudiaron el efecto de la toxina botulínica tipo B en un modelo de rata para determinar su capacidad en la reducción del vasoespasmo y la prevención de la trombosis después de la división aguda de los vasos y la reparación de la anastomosis. El estudio obtuvo

resultados significativos en la reducción del vasoespasmo y la prevención de la trombosis.

De esta manera, aunque debemos ser cautos en la indicación de un colgajo microvascular en un territorio previamente irradiado, debido al factor trombogénico que supone la RT en la microanastomosis venosa, con este nuevo campo de investigación abierto sobre la intervención farmacológica peroperatoria con resultados esperanzadores, podemos optimizar los resultados y disminuir la tasa de necrosis de los colgajos de reconstrucción.

7.4 Limitaciones del estudio

Se trata de un trabajo experimental preclínico en un modelo animal en rata. Como cualquier trabajo experimental en animales, existen ciertas limitaciones en la translación clínica de la información obtenida.

7.4.1 Modelo animal

El modelo animal elegido es la rata de cepa Sprague-Dawley. Evidentemente, a pesar de tener ventajas como el tamaño vascular del paquete NV estudiado acorde al tamaño de los vasos anastomosados en el pedículo del colgajo microvascular, el hecho de tratarse de un animal considerado pequeño (<1Kg) dificulta la aplicabilidad clínica al humano. A pesar de ello, actualmente en la investigación preclínica, se instauran estudios iniciales en los considerados animales pequeños. Son animales de fácil estabulación y aclimatación, muy resistentes a los tratamientos y más económicos que los animales grandes. En función de los resultados obtenidos en estudios como el actual, se decide realizar estudios experimentales preclínicos en animales grandes y finalmente en humanos. Destacar que el modelo animal presentado se basa en la exposición radioterápica sin afectación tumoral local.

7.4.2 Radioterapia

El modelo de irradiación utilizado en este estudio experimental (monodosis, 20 Gy) difiere en diversos aspectos del modelo general de irradiación actual en la práctica clínica. Los efectos de la RT en el parénquima circundante al territorio irradiado son irreversibles. Por ello, en la última década, se ha intentado disminuir sus efectos utilizando una variedad de enfoques que se pueden agrupar en 3 categorías:

- Enfoque físico, como la radioterapia de intensidad modulada y 3D de la RT²⁵. Actualmente la dosificación de la irradiación se realiza secuenciada temporalmente, fraccionada y específicamente dirigida al centro tumoral, con lo que los efectos secundarios se han conseguido reducir notablemente.
- Enfoque farmacológico, como explorar la utilidad de sialagogos o eliminadores de radicales para proteger a las glándulas de daños¹⁰⁷⁻¹¹⁷.
- Enfoque biológico, tales como la transferencia genética²⁶ y la metodología en tejidos y células de regeneración^{4,15,27,28}.

Sin embargo, en modelos animales experimentales previos, se ha demostrado que una monodosis alta como la de nuestro estudio (20 Gy) o su dosis equivalente en RT fraccionada, desarrolla esencialmente el mismo resultado final, por ejemplo reducción de la secreción de saliva⁴⁷⁻⁴⁹. Por ello, utilizamos una única dosis en nuestro experimento. Estudios previos, objetivaron que una sola dosis de 15 Gy de RT en cabeza y cuello en un modelo de rata reduce la producción de saliva en un 50% de lo normal^{12,30}, así como la inducción de un daño mínimo del tejido salival sin signos de fibrosis^{2,11,12}.

7.4.3 Anastomosis vascular

Aunque en el estudio presentado el modelo de irradiación cervical en rata centraba el campo de irradiación en el paquete NV cervical, y presenta similitudes clínicas al protocolo de irradiación habitual de los SPB, debemos tener en cuenta que, como en otros modelos animales previos, la anastomosis microvascular se realizaba entre dos cabos vasculares irradiados. En la práctica clínica generalmente se realiza la

microanastomosis vascular entre un vaso no irradiado proveniente del colgajo libre y un vaso irradiado del lecho periférico tumoral⁸²⁻⁸⁷.

7.5 Trascendencia clínica del estudio

Para objetivar la trascendencia clínica de este estudio es importante comprender su objetivo principal, que es evaluar si la irradiación externa neoadyuvante en la zona cervical de la rata compromete la viabilidad de la anastomosis termino-terminal vascular microquirúrgica.

Hemos determinado que la irradiación externa (20 Gy) es un factor que aumenta la tasa de trombosis vascular en la microanastomosis termino-terminal venosa, no así en la microanastomosis termino-terminal arterial.

Es importante discernir el objetivo final de los estudios previamente descritos. Hay un primer grupo de estudios experimentales en los que el objetivo principal era evaluar la tasa de trombosis vascular en la microanastomosis quirúrgica y su relación con la RT.

Por otro lado, hay un segundo grupo de estudios experimentales que evalúa la tasa de necrosis de colgajos microquirúrgicos y su relación con la RT. Y como ya hemos comentado, la variable principal y de mayor importancia en la viabilidad de un colgajo microvascular es la permeabilidad vascular.

Finalmente, los estudios clínicos son el tercer grupo, y evalúan la tasa de fracaso de colgajos microquirúrgicos y su relación con la RT. Estos reflejan que la permeabilidad vascular es primordial y que el fracaso de un colgajo, además de por trombosis vascular, se puede producir por múltiples factores, como la dehiscencia de la herida, la infección del colgajo y factores relacionados con la disección durante la exéresis tumoral⁸²⁻⁸⁹.

En nuestro estudio decidimos evaluar la variable primordial para la supervivencia del colgajo, que es la permeabilidad vascular o la tasa de trombosis. Nuestros resultados con una potencia estadística superior, son acordes al primer grupo de estudios experimentales, en los que el objetivo a evaluar es común: identificar la RT como un factor que aumenta la tasa de trombosis venosa en la microanastomosis termino-terminal. Además, existen artículos publicados recientemente, en los que se identifica la RT como un agente lesivo para el estrato endotelial vascular y activador de factores protrombóticos^{20,21}.

Por otro lado, nuestros resultados no se correlacionan con la mayoría de aquellos estudios experimentales o clínicos, en los que el objetivo es evaluar la necrosis del colgajo microvascular. Mayoritariamente, estos estudios reflejan que aunque existe un mayor índice de complicaciones vasculares intraoperatorias (lo que sí se relaciona con nuestros resultados en cuanto a índice de complejidad del procedimiento), esto no aumenta la tasa de necrosis final del colgajo⁸²⁻⁸⁹.

Así, ¿a qué se debe esta incongruencia en los resultados entre los diferentes estudios realizados? Principalmente se debe a que los colgajos microvasculares libres generalmente se disecan con un pedículo vascular formado como mínimo por una arteria y dos venas. Por lo general, este protocolo utilizado por los microcirujanos se basa en la mayor dificultad técnica de la sutura vascular venosa como hemos reflejado anteriormente. Esto facilita que en caso de trombosis vascular venosa, el colgajo pueda sobrevivir, aunque en algunas ocasiones con aumento de la congestión venosa o necrosis parcial del colgajo, con tan sólo una vena. De forma que, a pesar de presentar un evento de trombosis vascular, no se cumpla el objetivo de identificar

necrosis del colgajo. Evidentemente, es muy ocasional poder revisar un colgajo que ha evolucionado favorablemente sin necrosis, por lo que es difícil objetivar este evento de trombosis vascular. Por otro lado, aunque en algunas ocasiones es precario, los colgajos poseen un drenaje suplementario del sistema venoso superficial al profundo, lo que disminuye el riesgo de necrosis del colgajo a pesar de la trombosis de una de las dos venas del pedículo.

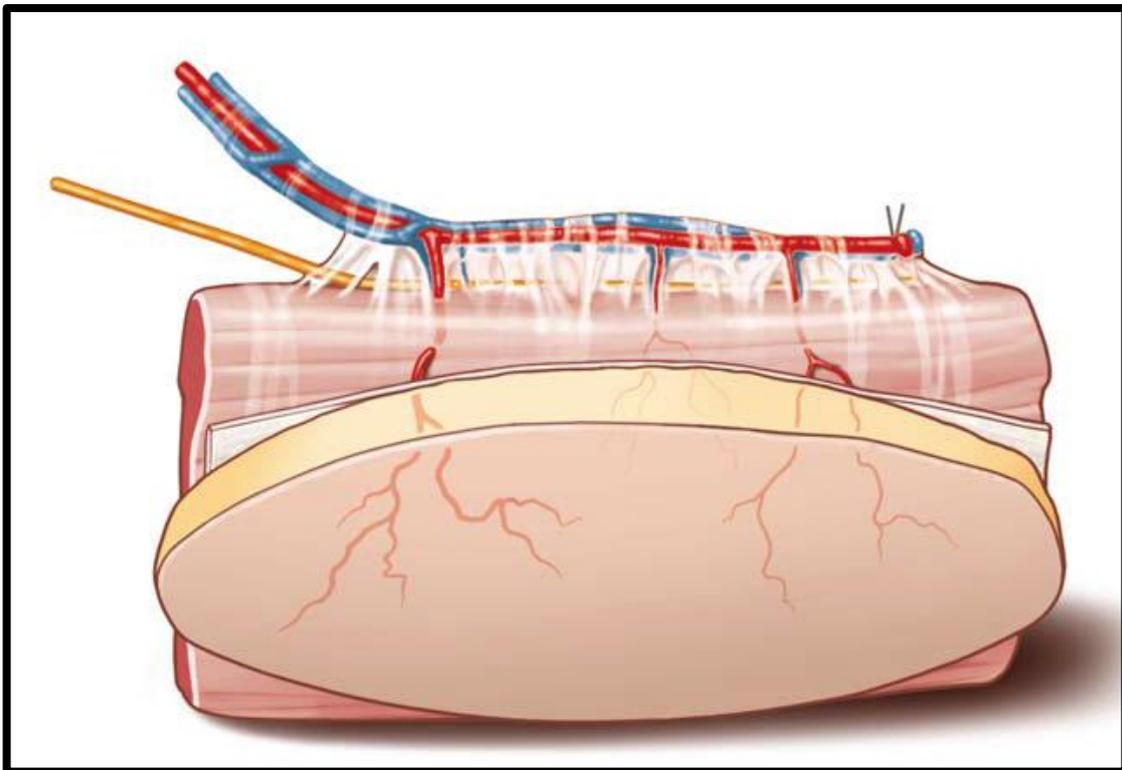


Figura 75. Esquema de un colgajo libre músculo-cutáneo, observamos el pedículo compuesto por una arteria y dos venas concomitantes.

Así, para que un colgajo microvascular libre presente una necrosis de origen vascular, se debe presentar un evento de trombosis arterial o tantos eventos de trombosis venosa como microanastomosis venosas se hayan incluido en el colgajo. Por ejemplo, tomando como referencia los resultados del presente estudio e imaginando un colgajo con un pedículo estándar basado en una anastomosis arterial y dos venosas

y, teniendo en cuenta que la tasa de trombosis arterial en territorio irradiado fue del 2,9% y que la tasa de trombosis venosa en territorio irradiado fue del 20%, las posibilidades de necrosis de un colgajo, basada en nuestros resultados, sería del 2,9% (trombosis arterial) + $[0,2 (1 \text{ trombosis venosa}) \times 0,2 (1 \text{ trombosis venosa}) = 0,04] 4\% = 6,9\%$. De esta manera, a pesar de presentar en un 20% de los casos una trombosis microvascular venosa, el riesgo de necrosis vascular por motivos vasculares es del 6,9%, lo que se corresponde con la literatura presentada.

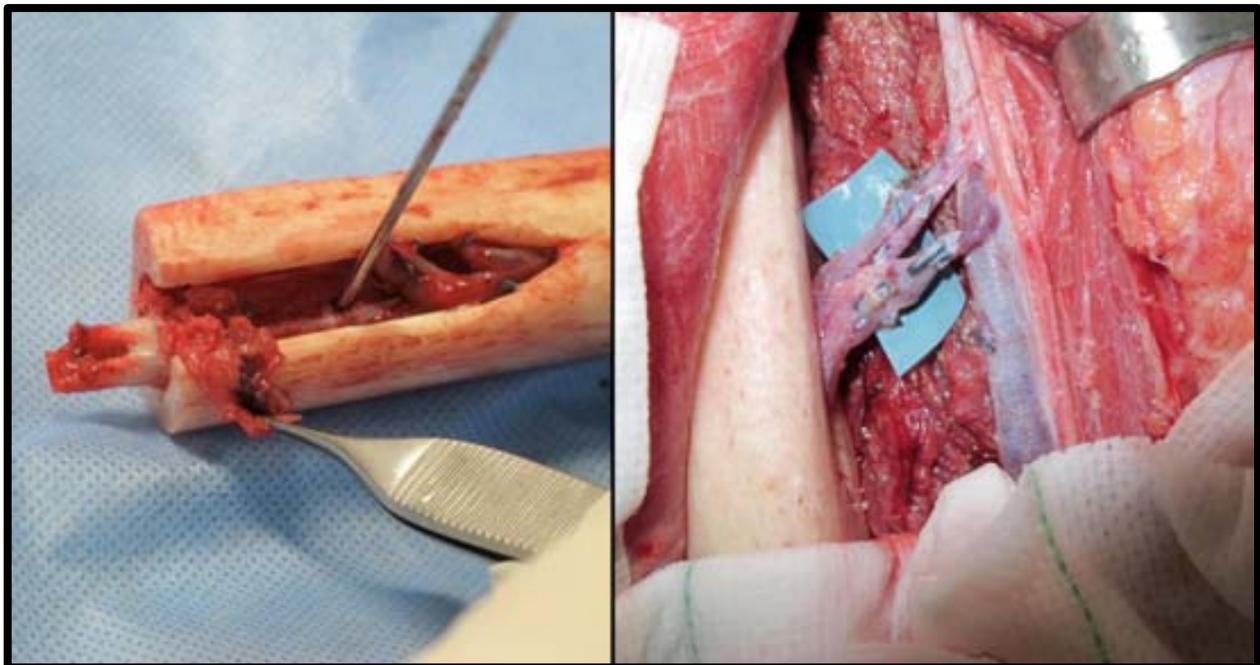


Figura 76. Fotografías intraoperatorias de un colgajo óseo vascularizado (peroné) en el interior de un aloinjerto óseo estructural (técnica de Capanna¹¹⁹). A la izquierda observamos el pedículo del colgajo sin disecar, y a la derecha observamos el pedículo (compuesto por la arteria y las venas peroneas) tras la anastomosis vascular. Cortesía del Dr. Aguirre, Dr. Vélez y Dr. Llusa (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona).

A pesar de todo lo anterior, debemos identificar la RT como un factor trombogénico, y por ello es interesante tener en cuenta los estudios actuales e incluir alguna pauta farmacológica peroperatoria antitrombótica y, en aquellos casos en que anatómica y clínicamente sea posible, incorporar otra anastomosis venosa en el colgajo microquirúrgico.

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

A. Hipótesis:

1) La **irradiación externa neoadyuvante** de la zona cervical de la rata **disminuye** la tasa de viabilidad de la anastomosis microquirúrgica **venosa** término-terminal.

2) La **irradiación externa neoadyuvante** de la zona cervical de la rata **no compromete** la viabilidad de la anastomosis microquirúrgica **arterial** término-terminal.

B. Objetivos:

1) El **modelo diseñado de irradiación cervical** induce **cambios rdicos vasculares selectivamente**, sin afectar los tejidos circundantes, y disminuye las tasas de morbimortalidad del modelo experimental.

2) Este modelo permitirá disenar y realizar nuevos estudios experimentales terapéuticos sobre los efectos de la radioterapia en el paquete vascular cervical.

3) Dado que en nuestro estudio sobre la viabilidad de la anastomosis vascular microquirúrgica en población irradiada la aplicación de radioterapia externa ha aumentado la tasa de **trombosis venosa**: esta debe considerarse como la principal causa del fracaso de un **colgajo microquirúrgico** en un contexto de irradiación externa neoadyuvante.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Evans GRD, Black JJ, Robb GL, Baldwin BJ, Kroll SS, Miller MJ, et al. Adjuvant therapy: the effects on microvascular lower extremity reconstruction. *Ann Plast Surg.* 1997; 39: 141-144.
- 2) Rosenberg SA, Tepper JE, Glatstein EJ, Costa J, Baker A, Brennan M, et al. The treatment of softtissue sarcomas of the extremities: prospective randomized evaluations of (1) limb-sparing surgery plus radiation therapy compared with amputation and (2) the role of adjuvant chemotherapy. *Ann Surg.* 1982; 196: 305-315.
- 3) Suit HD, Mankin HJ, Wood WC, Proppe KH. Preoperative, intraoperative, and postoperative radiation in the treatment of primary soft tissue sarcoma. *Cancer.* 1985; 55: 2659-2667.
- 4) Wennerberg J. Pre versus post-operative radiotherapy of resectable squamous cell carcinoma of the head and neck. *Acta Otolaryngol.* 1995; 115: 465-474.
- 5) Muramatsu K, Ihara K, Miyoshi T, Yoshida K, Hashimoto T, Taguchi T. Transfer of latissimus dorsi muscle for the functional reconstruction of quadriceps femorismuscle following oncological resection of sarcoma in the thigh. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2011; 64: 1068-1074.
- 6) Proppe KH, Mankin HJ, Wood WC. Preoperative, intraoperative, and postoperative radiation in the treatment of primary soft tissue sarcoma. *Cancer.* 1993; 52: 259-266-.
- 7) Pisters PW, Harrison LB, Leung DH, Woodruff JM, Casper ES, Brennan MF. Long-term results of a prospective randomized trial of adjuvant brachytherapy in soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol.* 1996; 14: 859-868.

- 8) Yang JC, Chang AE, Baker AR, Sindelar WF, Danforth DN, Topalian SL, et al. Randomized prospective study of the benefit of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcomas of the extremity. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 197-203.
- 9) Nielsen OS, Cummings B, O'Sullivan B, Catton C, Bell RS, Fornasier VL. Preoperative and postoperative irradiation of soft tissue sarcomas: effect of radiation field size. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1991; 21: 1595-1599.
- 10) Sadoski C, Suit HD, Rosenberg A, Mankin H, Efird J. Preoperative radiation, surgical margins, and local control of extremity sarcomas of soft tissues. *J Surg Oncol*. 1993; 52: 223-230.
- 11) Wilson AN, Davis A, Bell RS, O'Sullivan B, Catton C, Madadi F, et al. Local control of soft tissue sarcoma of the extremity: the experience of a multidisciplinary sarcoma group with definitive surgery and radiotherapy. *Eur J Cancer*. 1994; 30: 746-751.
- 12) Simon Michael A, Springfield D. *Surgery for bone and soft-tissue tumors*. New York: Lippincott-Raven Publishers Philadelphia; 1998.
- 13) Gronchi A, Casali PG, Mariani L, Miceli R, Fiore M, Lo Vullo S, et al. Status of surgical margins and prognosis in adult soft tissue sarcomas of the extremities: a series of patients treated at a single institution. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 96-104.
- 14) Dormand EL, Banwell PE, Goodacre TE. Radiotherapy and wound healing. *Int Wound J*. 2005; 2: 112-127.
- 15) Aitasalo K, Aro HT, Virolainen P, Virolainen E. Healing of microvascular free skin flaps in irradiated recipient tissue beds. *Am J Surg*. 1992; 164: 662-666.

- 16)** Kroll SS, Robb GL, Reece GP, Miller MJ, Evans GR, Baldwin BJ, et al. Does prior irradiation increase the risk of total or partial free-flap loss?. *J Reconstr Microsurg.* 1998; 14: 263-268.
- 17)** Sidorov VB, Minachenko VK, Rekhter MD, Pshenisnov KP, Mironov AA, Bauman OA. The influence of radiotherapy and chemotherapy on regeneration at arterial microanastomoses: an experimental and clinical study. *Ann Plast Surg* 1994; 32: 45-51.
- 18)** Fosnot J, Fischer JP, Smartt JM Jr, Low DW, Kovach SJ 3rd, Wu LC, et al. Does Previous Chest Wall Irradiation Increase Vascular Complications in Free Autologous Breast Reconstruction?. *Plast Reconstr Surg.* 2011; 127: 496-504.
- 19)** Innocenti M, Abed YY, Beltrami G, Delcroix L, Balatri A, Capanna R. Quadriceps muscle reconstruction with free functioning latissimus dorsi muscle flap after oncological resection. *Microsurgery.* 2009; 29: 189-198.
- 20)** Kubo T, Yano K, Hosokawa K. Management of flaps with compromised venous outflow in head and neck microsurgical reconstruction. *Microsurgery.* 2002; 22: 391-395.
- 21)** Halle M, Bodin I, Tornvall P, Wickman M, Farnebo F, Arnander C. Timing of radiotherapy in head and neck free flap reconstruction - a study of postoperative complications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2009; 62: 889-895.
- 22)** Halle M, Ekström M, Farnebo F, Tornvall P. Endothelial activation with prothrombotic response in irradiated microvascular recipient veins. *Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010; 63: 1910-1916.

- 23) Virolainen P, Aitasalo K. Effect of postoperative irradiation on free skin flaps: an experimental study in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2002; 36: 257-261.
- 24) Arinci A, Topalan M, Aydin I, Solakoglu S, Olgaç V, Merla R, et al. Effects of early pre- and postoperative irradiation on the healing of microvascular anastomoses. *J Reconstr Microsurg*. 2000; 16: 573-576.
- 25) Blackwell KE. Unsurpassed reliability of free flaps for head and neck reconstruction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999; 125: 295-299.
- 26) Ezzat WH, Dahl JP, Luginbuhl A, Gordin E, Krein H, Heffelfinger RN. Recombinant human tissue factor pathway inhibitor prevents thrombosis in a venous tuck model. *Laryngoscope*. 2010; 120: 2172-2176.
- 27) Schultze-Mosgau S, Keilholz L, Rödel F, Labahn D, Neukam FW. Experimental model for transplantation of a modified free myocutaneous gracilis flap to an irradiated neck region in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001; 30: 63-69.
- 28) Evans GRD, Black JJ, Robb GL, Baldwin BJ, Kroll SS, Miller MJ, et al. Adjuvant therapy: the effects on microvascular lower extremity reconstruction. *Ann Plast Surg*. 1997; 39: 141-144.
- 29) Suit HD, Mankin HJ, Wood WC, Proppe KH. Preoperative, intraoperative, and postoperative radiation in the treatment of primary soft tissue sarcoma. *Cancer*. 1985; 55: 2659-2667.
- 30) García Del Muro X, Martín J, Maurel J, Cubedo R, Bagué S, de Álava E, Pousa AL, Narváez JA, Ortiz E, Pomés J, Poveda A, Romasanta LP, Tendero O, Viñals JM; Grupo Español de Investigación en Sarcomas (GEIS). Soft tissue sarcomas: clinical practice guidelines. *Med Clin*. 2011 Apr 9; 136:408.

- 31) National Institute for Health and Clinical Excellence. Improving outcomes for people with sarcomas. NICE Cancer Service Guidance 2006.
- 32) Nijhuis PH, Schaapveld M, Otter R, Hoekstra HJ. Soft tissue sarcoma—compliance with guidelines. *Cancer*. 2001; 91: 2186-2195.
- 33) Fletcher CD. World Health Organization Classification of Tumours. En: Pathology and Genetics. Tumours of Soft Tissue and Bone. Lyon: IARC Press; 2002.
- 34) Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. Recommendations for the reporting of soft tissue sarcoma. *Virchows Arch*. 1999; 434: 187-191.
- 35) Abdul-Karim FW, Bauer TW, Kilpatrick SE, Raymond KA, Siegal GP. Recommendations for the reporting of bone tumors. Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. *Hum Pathol*. 2004; 35: 1173-1178.
- 36) Casali PG, Jost L, Sleijfer S, Verweij J, Blay JY. Soft tissue sarcomas: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2008; 19: 89-93.
- 37) Ray-Coquard I, Thiesse P, Ranchere-Vince D, Chauvin F, Bobin JY, Sunyach MP, et al. Conformity to clinical practice guidelines, multidisciplinary management and outcome of treatment for soft tissue sarcomas. *Ann Oncol*. 2004; 15: 307-15.
- 38) Simon Michael A, Springfield D. Surgery for bone and soft-tissue tumors. New York: Lippincott-Raven Publishers Philadelphia; 1998.
- 39) Pisters PW, Harrison LB, Leung DH, Woodruff JM, Casper ES, Brennan MF. Long-term results of a prospective randomized trial of adjuvant brachytherapy in soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol*. 1996; 14: 859-868.

- 40) Yang JC, Chang AE, Baker AR, Sindelar WF, Danforth DN, Topalian SL, et al. Randomized prospective study of the benefit of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcomas of the extremity. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 197-203.
- 41) Nielsen OS, Cummings B, O'Sullivan B, Catton C, Bell RS, Fornasier VL. Preoperative and postoperative irradiation of soft tissue sarcomas: effect of radiation field size. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1991; 21: 1595-1599.
- 42) Sadoski C, Suit HD, Rosenberg A, Mankin H, Efird J. Preoperative radiation, surgical margins, and local control of extremity sarcomas of soft tissues. *J Surg Oncol*. 1993; 52: 223-230.
- 43) Wilson AN, Davis A, Bell RS, O'Sullivan B, Catton C, Madadi F, et al. Local control of soft tissue sarcoma of the extremity: the experience of a multidisciplinary sarcoma group with definitive surgery and radiotherapy. *Eur J Cancer*. 1994; 30: 746-751.
- 44) Balach T, Stacy GS, Haydon RC. The clinical evaluation of soft tissue tumors. *Radiol Clin North Am*. 2011; 49: 1185-1196.
- 45) Wunder JS, Healey JH, Davis AM, Brennan MF. A comparison of staging systems for localized extremity soft tissue sarcoma. *Cancer*. 2000; 88: 2721-2730.
- 46) Karasek K, Constine LS, Rosier R. Sarcoma therapy: functional outcome and relationship to treatment parameters. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992; 24: 651-656.
- 47) Nagler RM, Nagler A. Effects of ionizing irradiation and b-adrenergic stimulation on gene expression in rat submandibular glands. *Anticancer Res*. 1996; 16: 2749-2756.

- 48) Nagler RM, Baum BJ, Fox PC. Acute effects of x-irradiation on the function of rat salivary glands. *Radiat Res.* 1993; 136: 42-47.
- 49) Nagler RM. Extended-term effects of head and neck irradiation in a rodent. *European Journal of Cancer* 2001; 37: 1938-1945.
- 50) Menard TW, Izutsu KT, Ensign WY, Keller PJ, Morton TH, Truelove EL. Radioprotection by WR-2721 of g-irradiated rat parotid gland: effect on gland weight and secretion at 8–10 days post-radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1984; 10: 1555-1559.
- 51) Simşek T, Eroglu L, Engin MS, Kaplan S, Yildiz L. End-to-end microvascular anastomosis in the rat carotid artery using continuous horizontal mattress sutures. *J Reconstr Microsurg.* 2006; 22: 631-640.
- 52) Başar H, Erol B, Tetik C. Use of continuous horizontal mattress suture technique in end-to-side microsurgical anastomosis. *Hand Surg.* 2012; 17: 419-427.
- 53) Lazarus CL, Logemann JA, Pauloski BR, Colangelo LA, Kahrilas PJ, Mittal BB, et al. Swallowing disorders in head and neck cancer patients treated with radiotherapy and adjuvant chemotherapy. *Laryngoscope.* 1996; 106: 1157-1166.
- 54) Cooper JS, Fu K, Marks J, Silverman S. Late effects of radiation therapy in the head and neck region. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995; 31: 1141-1164.
- 55) Rydholm A. Management of patients with soft-tissue tumors. Strategy developed at a regional oncology center. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1983; 203: 13-77.
- 56) Johnson CJ, Pynsent PB, Grimer RJ. Clinical features of soft tissue sarcomas. *Ann R Coll Surg Engl.* 2001; 83: 203-205.

- 57) Kulkarni A GR, Pynsent P. When is a lump a sarcoma? An analysis of 1100 lumps. Connective Tissue Oncology Society (CTOS). 9th Annual Meeting. Barcelona: 2003.
- 58) Mankin HJ, Lange TA, Spanier SS. The hazards of biopsy in patients with malignant primary bone and soft-tissue tumors. *J Bone Joint Surg Am.* 1982; 64: 1121-1127.
- 59) Mankin HJ, Mankin CJ, Simon MA. The hazards of the biopsy, revisited. Members of the Musculoskeletal Tumor Society. *J Bone Joint Surg Am.* 1996; 78: 656-663.
- 60) Kandel R, Bell R, O'Sullivan B, Catton C, Ferguson P, Blackstein M, et al. Histological assessment of peritumoral edema in soft tissue sarcoma. CTOS 9th Annual Meeting. Barcelona: 2003.
- 61) Stojadinovic A, Leung DH, Hoos A, Jaques DP, Lewis JJ, Brennan MF. Analysis of the prognostic significance of microscopic margins in 2,084 localized primary adult soft tissue sarcomas. *Ann Surg.* 2002; 235: 424-434.
- 62) Trovik CS, Gustafson P, Bauer HC, Saeter G, Klepp R, Berlin O, et al. Consequences of local recurrence of soft tissue sarcoma: 205 patients from the Scandinavian Sarcoma Group Register. *Acta Orthop Scand.* 2000; 71: 488-495.
- 63) Eilber FC, Rosen G, Nelson SD, Selch M, Dorey F, Eckardt J, et al. High-grade extremity soft tissue sarcomas: factors predictive of local recurrence and its effect on morbidity and mortality. *Ann Surg.* 2003; 237: 218-226.
- 64) Stojadinovic A, Leung DH, Allen P, Lewis JJ, Jaques DP, Brennan MF. Primary adult soft tissue sarcoma: time-dependent influence of prognostic variables. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 4344-4352.

- 65) Wiklund T, Huuhtanen R, Blomqvist C, Tukiainen E, Virolainen M, Virkkunen P, et al. The importance of a multidisciplinary group in the treatment of soft tissue sarcomas. *Eur J Cancer*. 1996; 32: 269-273.
- 66) Bauer HC, Trovik CS, Alvegard TA, Berlin O, Erlanson M, Gustafson P, et al. Monitoring referral and treatment in soft tissue sarcoma: study based on 1,851 patients from the Scandinavian Sarcoma Group Register. *Acta Orthop Scand*. 2001; 72: 150-159.
- 67) Paszat L, O'Sullivan B, Bell R, Bramwell V, Groome P, Mackillop W, et al. Processes and outcomes of care for soft tissue sarcoma of the extremities. *Sarcoma*. 2002; 6: 19-26.
- 68) Bhanu AA, Beard JA, Grimer RJ. Should Soft Tissue Sarcomas be Treated at a Specialist Centre? *Sarcoma*. 2004; 8: 1-6.
- 69) Van Dalen T. Management of soft tissue sarcoma in the retroperitoneal space: a population based study in the Netherlands. Utrecht: University of Utrecht; 2000.
- 70) Picci P, Bacci G, Campanacci M, Gasparini M, Pilotti S, Cerasoli S, et al. Histologic evaluation of necrosis in osteosarcoma induced by chemotherapy. Regional mapping of viable and nonviable tumor. *Cancer*. 1985; 56: 1515-1521.
- 71) Gronchi A, Casali PG, Mariani L, Miceli R, Fiore M, Lo Vullo S, et al. Status of surgical margins and prognosis in adult soft tissue sarcomas of the extremities: a series of patients treated at a single institution. *J Clin Oncol*. 2005;23:96-104.
- 72) Campanacci M. *Bone and Soft Tissue Tumors*, 2.a ed, Padova: Piccin Nuova Libreria; 1999.

- 73)** Malawer M, Sugarbaker Paul H. Musculoskeletal Cancer Surgery. En: Treatment of Sarcomas and Allied Diseases. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2001.
- 74)** Herbert SH, Corn BW, Solin LJ, Lanciano RM, Schultz DJ, McKenna WG, et al. Limb-preserving treatment for soft tissue sarcomas of the extremities. The significance of surgical margins. *Cancer*. 1993; 72: 1230-1238.
- 75)** Bannasch H, Haivas I, Momeni A, Stark GB. Oncosurgical and reconstructive concepts in the treatment of soft tissue sarcomas: a retrospective analysis. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2009; 129: 43-49.
- 76)** Wright EH, Gwilym S, Gibbons CL, Critchley P, Giele HP. Functional and oncological outcomes after limb-salvage surgery for primary sarcomas of the upper limb. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2008; 61: 382-387.
- 77)** Mathes SJ. Plastic Surgery. En: Volume I General Principles 2nd ed, Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006.
- 78)** Geddes CR, Morris SF, Neligan PC. Perforator flaps: evolution, classification, and applications. *Ann Plast Surg*. 2003; 50: 90-99.
- 79)** Masquelet AC, Gilbert A. An atlas of flaps in limb reconstruction London Martin Dunitz Ltd; 1995.
- 80)** Servant JM, Arnault E, Revol M, Danino A. Reconstruction of large thoracoabdominal defects using two-stage free tissue transfers and prosthetic materials. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2006; 59: 360-365.
- 81)** Hidalgo DA, Disa JJ, Cordeiro PG, Hu QY. A review of 716 consecutive free flaps for oncologic surgical defects: refinement in donor-site selection and technique. *Plast Reconstr Surg*. 1998; 102: 722-732.

- 82)** Schwarzbach MH, Hormann Y, Hinz U, Bernd L, Willeke F, Mechtersheimer G, et al. Results of limb-sparing surgery with vascular replacement for soft tissue sarcoma in the lower extremity. *J Vasc Surg.* 2005; 42: 88-97.
- 83)** Ghert MA, Davis AM, Griffin AM, Alyami AH, White L, Kandel RA, et al. The surgical and functional outcome of limb-salvage surgery with vascular reconstruction for soft tissue sarcoma of the extremity. *Ann Surg Oncol.* 2005; 12: 1102-1110.
- 84)** Takushima A, Harii K, Asato H, Ueda K, Yamada A. Neurovascular free-muscle transfer for the treatment of established facial paralysis following ablative surgery in the parotid region. *Plast Reconstr Surg.* 2004; 113: 1563-1572.
- 85)** Chang DW, Weber KL. Use of a vascularized fibula bone flap and intercalary allograft for diaphyseal reconstruction after resection of primary extremity bone sarcomas. *Plast Reconstr Surg.* 2005; 116: 1918-1925.
- 86)** Yilmaz M, Vayvada H, Menderes A, Demirdover C, Kizilkaya A. A comparison of vascularized fibular flap and iliac crest flap for mandibular reconstruction. *J Craniofac Surg.* 2008; 19: 227-234.
- 87)** Bach AD, Kopp J, Stark GB, Horch RE. The versatility of the free osteocutaneous fibula flap in the reconstruction of extremities after sarcoma resection. *World J Surg Oncol.* 2004; 2: 22.
- 88)** Hameed A, Akhtar S, Naqvi A, Pervaiz Z. Reconstruction of complex chest wall defects by using polypropylene mesh and a pedicled latissimus dorsi flap: a 6-year experience. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2008; 61: 628-635.

- 89) Chang RR, Mehrara BJ, Hu QY, Disa JJ, Cordeiro PG. Reconstruction of complex oncologic chest wall defects: a 10-year experience. *Ann Plast Surg.* 2004; 52: 471-479.
- 90) Mundt AJ, Awan A, Sibley GS, Simon M, Rubin SJ, Samuels B, et al. Conservative surgery and adjuvant radiation therapy in the management of adult soft tissue sarcoma of the extremities: clinical and radiobiological results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995;32:977-85.
- 91) Wolfson AH, Benedetto PW, Mnaymneh W, Moffat FL, Robinson DS, Boyer C, et al. Does a radiation dose-response relation exist concerning survival of patients who have soft-tissue sarcomas of the extremities? Radiation dose response relation for soft-tissue sarcomas. *Am J Clin Oncol.* 1998;21:270-4.
- 92) Al Yami AH, Griffin AM, Ferguson PC, Catton CN, Chung PW, Bell RS, et al. Positive surgical margins in soft tissue sarcoma treated with preoperative radiation: Is a postoperative boost necessary? *Connective Tissue Oncology Society (CTOS) 12th Annual Meeting, Venice, 2006.* *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010; 77: 1191-1197.
- 93) Kraybill WG, Harris J, Spiro IJ, Ettinger DS, DeLaney TF, Blum RH, et al. Phase II study of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in the management of high-risk, high-grade, soft tissue sarcomas of the extremities and body wall: Radiation Therapy Oncology Group Trial 9514. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 619-625.
- 94) Edmonson JH, Petersen IA, Shives TC, Mahoney MR, Rock MG, Haddock MG, et al. Chemotherapy, irradiation, and surgery for function-preserving therapy of primary extremity soft tissue sarcomas: initial treatment with ifosfamide,

- mitomycin, doxorubicin, and cisplatin plus granulocyte macrophage-colonystimulating factor. *Cancer*. 2002; 94: 786-792.
- 95)** Alektiar KM, Brennan MF, Singer S. Influence of site on the therapeutic ratio of adjuvant radiotherapy in soft-tissue sarcoma of the extremity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005; 63: 202-208.
- 96)** Delaney TF, Kepka L, Goldberg SI, Hornicek FJ, Gebhardt MC, Yoon SS, et al. Radiation therapy for control of soft-tissue sarcomas resected with positive margins. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007; 67: 1460-1469.
- 97)** Habrand JL, Gerbaulet A, Pejovic MH, Contesso G, Durand S, Haie C, et al. Twenty years experience of interstitial iridium brachytherapy in the management of soft tissue sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1991; 20: 405-411.
- 98)** Harrison LB, Franzese F, Gaynor JJ, Brennan MF. Long-term results of a prospective randomized trial of adjuvant brachytherapy in the management of completely resected soft tissue sarcomas of the extremity and superficial trunk. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1993; 27: 259-265.
- 99)** Pisters PW, Harrison LB, Leung DH, Woodruff JM, Casper ES, Brennan MF. Longterm results of a prospective randomized trial of adjuvant brachytherapy in soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol*. 1996; 14: 859-868.
- 100)** Rosenblatt E, Meushar N, Eidelman M, Kuten A. Low dose-rate interstitial brachytherapy in soft tissue sarcomas. *Sarcoma*. 1999; 3: 101-105.
- 101)** Shiu MH, Turnbull AD, Nori D, Hajdu S, Hilaris B. Control of locally advanced extremity soft tissue sarcomas by function-saving resection and brachytherapy. *Cancer*. 1984; 53: 1385-1392.

- 102)** Pisters PW, Harrison LB, Woodruff JM, Gaynor JJ, Brennan MF. A prospective randomized trial of adjuvant brachytherapy in the management of low-grade soft tissue sarcomas of the extremity and superficial trunk. *J Clin Oncol.* 1994; 12: 1150-1155.
- 103)** Alekhteyar KM, Leung DH, Brennan MF, Harrison LB. The effect of combined external beam radiotherapy and brachytherapy on local control and wound complications in patients with high-grade soft tissue sarcomas of the extremity with positive microscopic margin. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996; 36: 321-324.
- 104)** Stiubea-Cohen R, David R, Neumann Y, Krief G, Deutsch O, Zacks B, Aframian DJ, Palmon A. Effect of irradiation on cell transcriptome and proteome of rat submandibular salivary glands. *PLoS One.* 2012;7: e40636.
- 105)** Nasir S, Aydin MA, Karahan N, Demiryürek D, Sargon M. New microvenous anastomosis model for microsurgical training: external jugular vein. *J Reconstr Microsurg.* 2006;22: 625-630.
- 106)** Bui DT, Cordeiro PG, Hu QY, Disa JJ, Pusic A, Mehrara BJ. Free flap reexploration: indications, treatment, and outcomes in 1193 free flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119: 2092-2100.
- 107)** Peter FW, Franken RJ, Wang WZ, et al. Effect of low dose aspirin on thrombus formation at arterial and venous microanastomoses and on the tissue microcirculation. *Plast Reconstr Surg* 1997; 99: 1112–1121.
- 108)** Hadlock TA, Kim J, Deschler DG. The effect of subcutaneously administered low-molecular-weight heparin on microarterial thrombosis in the rat. *Arch Facial Plast Surg* 2003; 5: 36–39.

- 109)** Murthy P, Riesberg MV, Hart S, et al. Efficacy of perioperative thromboprophylactic agents in the maintenance of anastomotic patency and survival of rat microvascular free groin flaps. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129: 176–182.
- 110)** Emerick KS, Deschler DG. The effect of low-molecular-weight heparin on microvenous thrombosis in a rat model. *Arch Facial Plast Surg* 2007; 9: 19–21.
- 111)** Nayak VK, Deschler DG. Clopidogrel use for reducing the rate of thrombosis in a rat model of microarterial anastomosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 131: 800–803.
- 112)** Bernat A, Mares AM, Defreyn G, Maffrand JP, Herbert JM. Effect of various antiplatelet agents on acute arterial thrombosis in the rat. *Thromb Haemost* 1993; 70: 812–816.
- 113)** Moore MG, Deschler DG. Clopidogrel (plavix) reduces the rate of thrombosis in the rat tuck model for microvenous anastomosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 136: 573–576.
- 114)** Snyderman CH. The pathogenesis of vascular thrombosis and its impact in microvascular surgery. *Head Neck* 1999; 21: 355–362.
- 115)** Aydin A, Ozden BC, Mezdeği A, Kurul S, Meral R, Solakoğlu S. Effects of amifostine on healing of microvascular anastomoses, flap survival, and nerve regeneration with preoperative or postoperative irradiation. *Microsurgery*. 2004; 24: 392-399.
- 116)** Infanger M, Shakibaei M, Kossmehl P, Hollenberg SM, Grosse J, Faramarzi S, Schulze-Tanzil G, Paul M, Grimm D. Intraluminal application of

vascular endothelial growth factor enhances healing of microvascular anastomosis in a rat model. *J Vasc Res.* 2005; 42: 202-213.

117) Lewis CM, Deschler DG. Desirudin reduces the rate of microvenous thrombosis in a rat model. *Laryngoscope.* 2008; 118: 1149-1152.

118) Janz BA, Thomas PR, Fanaa SP, Dunn RE, Wilgis EF, Means KR Jr. Prevention of anastomotic thrombosis by botulinum toxin B after acute injury in a rat model. *J Hand Surg Am.* 2011; 36: 1585-1591.

119) Capanna R, Campanacci D, Belot N, Beltrami G, Manfrini M, Innocenti M. A new reconstructive technique for intercalary defects of long bones. *Orthop Clin N Am.* 2007; 38: 51-60.

