



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**

**"RESPUESTA TISULAR DEL ALOINJERTO TRAQUEAL
LIOFILIZADO Y CRIOPRESERVADO COMBINADO CON
TERAPIA DE INMUNOSUPRESIÓN Y APLICACIÓN
TÓPICA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL
ENDOTELIO VASCULAR"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA**

P R E S E N T A :

DR. JAIME VILLALBA CALOCA

**Director de la Tesis
DR. FRANCISCO J. FLORES MURRIETA**

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2007



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 16:00 horas del día 1 del mes de OCTUBRE del 2007 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESM para examinar la tesis de grado titulada:

"RESPUESTA TISULAR DEL ALOINJERTO TRAQUEAL LIOFILIZADO Y CRIOPRESERVADO COMBINADO CON TERAPIA DE INMUNOSUPRESIÓN Y APLICACIÓN TÓPICA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR"

Presentada por el alumno:

VILLALBA
Apellido paterno

CALOCA
materno

JAIME
nombre(s)

Con registro:

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 0 | 2 | 0 | 1 | 6 | 3 |
|---|---|---|---|---|---|---|

aspirante al grado de:

DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


DR. CARLOS CASTILLO HENKEL

PRESIDENTE DEL JURADO


DR. GUILLERMO MANUEL CEBALLOS REYES

SECRETARIO DEL JURADO


DR. FRANCISCO JAVIER FLORES MURRIETA

1ER. VOCAL DEL JURADO


DR. ROBERTO MEDINA SANTILLÁN

2DO. VOCAL DEL JURADO


DR. JUAN ASBUN BOJALIL

3ER. VOCAL DEL JURADO


DR. JUAN GERARDO REYES GARCÍA

VOCAL SUPLENTE

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


M. EN C. ELEAZAR LARA PADILLA



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 7 de agosto del 2007, el que suscribe Jaime Villalba Caloca, alumno del programa de Doctorado en Ciencias en Investigación en Medicina, con número de registro A020163, adscrito a la Escuela Superior de Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Flores Murrieta, cede los derechos del trabajo titulado: **“Respuesta Tisular del Aloiinjerto Traqueal Liofilizado y Criopreservado combinado con Terapia de Inmunosupresión y aplicación tópica del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director de trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección jaimenc@iner.gob.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento y citar la fuente del mismo.

Atentamente


Dr. Jaime Villalba Caloca

Este trabajo se realizó con financiamiento del Departamento de Investigación en Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, con la participación y asesoría de los investigadores en Ciencias Médicas:

Rogelio Jasso Victoria, Raúl Olmos Zúñiga, Avelina Sotres Vega, Matilde Baltazares Lipp, Miguel Gaxiola Gaxiola, Hilda Villegas Castrejón, Alfredo Santibáñez Salgado y Patricio Santillán Doherty

Agradecimientos

A Clara y a mis hijos Francisco, Antonio, Jaime, Ignacio, Clara y Diego.

Al Dr. Francisco Flores Murrieta por la dirección de esta tesis.

Al grupo de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias: Rogelio Jasso, Avelina Sotres, Raúl Olmos, Matilde Baltazares, José Alfredo Santibáñez, Patricio Santillán, Roberto Rueda, Sergio Martínez, por su apoyo para el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Hilda Villegas por su apoyo en microscopía electrónica.

Al Dr. Miguel Gaxiola y a las técnicas Guadalupe Hiriart y Ericka Monterrubio por su apoyo en microscopía de luz.

Al personal del Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

A Angélica Velázquez por su apoyo .

A Lourdes Espinosa por su apoyo.

Al Sanatorio de Huipulco – Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

INDICE

| | |
|---|------|
| Glosario | i |
| Relación de figuras | iii |
| Relación de tablas | vii |
| Resumen | viii |
| Abstract | ix |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Anatomía, fisiología e histología de la tráquea | 1 |
| 1.1.1 Irrigación de la tráquea | 2 |
| 1.1.2 Inervación de la tráquea | 2 |
| 1.1.3 Morfología traqueal | 3 |
| 1.2 Patología de las vías aéreas | 5 |
| 1.3 Inmunosupresión | 7 |
| 1.4 Liofilización | 10 |
| 1.5 Criopreservación | 11 |
| 1.6 Angiogénesis | 12 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 14 |
| 3. HIPÓTESIS | 15 |
| 4. OBJETIVOS | 16 |
| 4.1 Objetivo General | 16 |
| 4.2 Objetivos Específicos | 16 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS | 17 |
| 5.1 Recursos | 17 |
| 5.2 Animales de experimentación | 17 |
| 5.2.1 Criterios de inclusión | 18 |
| 5.2.2 Criterios de exclusión | 18 |
| 5.2.3 Criterios de eliminación | 18 |
| 5.2.4 Criterios de terminación | 18 |

| | | |
|------|---|----|
| 5.3 | Consideraciones Éticas | 19 |
| 5.4 | Procuración de la tráquea | 19 |
| 5.5 | Liofilización de los injertos traqueales | 20 |
| 5.6 | Criopreservación de los injertos traqueales | 20 |
| 5.7 | Técnica de microscopía óptica | 21 |
| 5.8 | Técnica de microscopía electrónica | 21 |
| 5.9 | Técnica de inmunohistoquímica para determinación de VEGF en tráquea | 22 |
| 5.10 | Grupos de Estudio | 22 |
| 5.11 | Técnica quirúrgica del receptor | 23 |
| 5.12 | Tratamiento | 24 |
| 5.13 | Evaluaciones | 24 |
| | 5.13.1 Clínica | 24 |
| | 5.13.2 Radiológica | 25 |
| | 5.13.3 Endoscópica | 25 |
| | 5.13.4 Macroscópica | 25 |
| | 5.13.5 Microscópica. Luz y electrónica | 26 |
| | 5.13.6 Angiogénica | 26 |
| | 5.13.7 Análisis Estadístico | 26 |
| 6. | RESULTADOS | 28 |
| 6.1 | Evaluación clínica | 28 |
| 6.2 | Evaluación radiológica | 30 |
| 6.3 | Evaluación endoscópica | 36 |
| 6.4 | Evaluación macroscópica | 43 |
| 6.5 | Evaluación histológica por Microscopía de Luz | 50 |
| 6.6 | Evaluación histológica por Microscopía Electrónica | 60 |
| 6.7 | Evaluación angiogénica | 63 |
| 7. | DISCUSIÓN | 65 |
| 8. | CONCLUSIONES | 72 |
| 9. | SUGERENCIAS PARA TRABAJO FUTURO | 73 |
| 10. | REFERENCIAS | 74 |

G L O S A R I O

| | |
|--------------------------|--|
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| VEGF | Factor de crecimiento del endotelio vascular |
| VEGFR1/Flt-1 | Receptor 1 de tirosina cinasa clase III del Factor de crecimiento del endotelio vascular |
| VEGFR2/Flt-1/KDR | Receptor 2 de tirosina cinasa clase III del Factor de crecimiento del endotelio vascular |
| IV | Intravenoso |
| IM | Intramuscular |
| RPMI-1640 | Medio de cultivo celular (Roswell Park Memorial Institute) |
| OsO4 | Tetraóxido de Osmio |
| Anti-VEGF | Anticuerpo del Factor de crecimiento del endotelio vascular |
| TBST | Solución buffer que contiene Tween 20, Tris, Solución Salina |
| CyA | Ciclosporina A |
| Pred | Prednisona |
| Aza | Azatioprina |
| TxTraLioSI | Trasplante Tráquea Liofilizada Sin Inmunosupresión. |
| TxTraLioCI | Trasplante Tráquea Liofilizada Con Inmunosupresión. |
| TxTraLioCI + VEGF | Trasplante Tráquea Liofilizada Con Inmunosupresión + VEGF |
| TxTraCrioSI | Trasplante Tráquea Criopreservada Sin Inmunosupresión |
| TxTraCrioCI | Trasplante Tráqueas Criopreservada Con Inmunosupresión |

| | | | | |
|---------------------------|---|----------|----------------|-----|
| TxTraCrioCI + VEGF | Trasplante | Tráqueas | Criopreservada | Con |
| | Inmunosupresión + VEGF | | | |
| Post-Tx | Post-trasplante | | | |
| Crio | Criopreservados | | | |
| Crio + CyA | Criopreservados con ciclosporina | | | |
| Crio + CyA + VEGF | Criopreservados con ciclosporina y VEGF | | | |
| Lio | Liofilizados | | | |
| Lio + CyA | Liofilizados con ciclosporina | | | |
| Lio + CyA + VEGF | Liofilizados con ciclosporina y VEGF | | | |

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1 Irrigación e inervación traqueal..... 3

Figura 2 Arteria tiroidea, vena tiroidea y nervio vago..... 3

Figura 3 1) Epitelio 2) Lámina propia de tejido conjuntivo
3)Submucosa laxa con glándulas 4) Pericondrio 5) Cartílago
6) Músculo liso 7) Adventicia..... 3

Figura 4 Cartílago traqueal (10X)..... 4

Figura 5 Cartílago traqueal (40X)..... 5

Figura 6 Radiografía lateral de cuello tomada inmediatamente
después del trasplante en un animal del grupo I, en donde
se observa (A) la luz traqueal completamente permeable
(Flecha) y (B) la disminución de la luz del injerto (Flecha) al
día 14 postrasplante..... 30

Figura 7 Placa radiográfica lateral de cuello del animal del grupo II
que sobrevivió 22 días. (A) Inmediatamente postrasplante y
(B) que muestran la luz del injerto traqueal completamente
permeable (Flecha). (C) día 14 postrasplante, pérdida de la
continuidad de la anastomosis proximal del injerto traqueal,
disminución de la luz del mismo a nivel de la anastomosis
distal y enfisema subcutáneo (Flecha). (D) al día 22
postrasplante se observa pérdida completa de la
continuidad del injerto traqueal..... 31

Figura 8 Radiográfica lateral de cuello de un animal del grupo III. (A)
injerto traqueal y la luz del mismo completamente
permeable inmediatamente postrasplante(Flecha). (B) día
10 postrasplante se observó pérdida completa de la
continuidad del injerto traqueal (Flecha)..... 32

Figura 9 Rayos X laterales de cuello de un animal del grupo IV. (A)
postrasplante inmediato y (B) día 42 muestran el injerto
traqueal y la luz del mismo completamente permeable
(Flecha)..... 33

Figura 10 Placa radiográfica lateral de cuello (A) pretrasplante y (B)
postrasplante inmediato de un animal del grupo V, que
muestra la luz traqueal completamente permeable (Flecha).
(C) día 7 y (D) día 10 postrasplante se observa disminución
de la luz del injerto traqueal y pérdida de la integridad del
mismo a nivel de la anastomosis distal (Flecha)..... 34

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 11 | Traqueoscopia pretrasplante de tráquea del grupo I, que muestra la integridad de la tráquea sana (A). (B) ambas anastomosis postrasplante y el injerto completamente isquémico. (C) día 10 postrasplante ambas anastomosis completamente cicatrizadas y el injerto isquémico en su porción cartilaginosa. (D) día 22 se observan ambas anastomosis completamente cicatrizadas y la anastomosis distal con estenosis del 90%..... | 36 |
| Figura 12 | (A) endoscopia postrasplante de tráquea de un animal del grupo II, que muestra ambas anastomosis y la isquemia del injerto. (B) día 10, se observan ambas anastomosis completamente cicatrizadas postrasplante. (C) día 14, anastomosis completamente cicatrizadas y la presencia de inflamación en la porción membranosa. (D) día 22 postcirugía, se observan ambas anastomosis bien cicatrizadas y el desprendimiento de un cartílago traqueal a nivel de la anastomosis distal..... | 37 |
| Figura 13 | Traqueoscopia postrasplante inmediato (A) y (B) al día 3 postrasplante que muestran ambas anastomosis y el injerto completamente isquémico. (C) día 7 anastomosis proximal con dehiscencia y el injerto completamente isquémico. (D) día 10, estenosis y dehiscencia de la anastomosis distal, así como la fístula formada en la porción membranosa del injerto..... | 38 |
| Figura 14 | (A) Traqueoscopia postrasplante inmediato de un animal del grupo IV, en la que se observan ambas anastomosis y el injerto isquémico. (B) día 18 ambas anastomosis y el injerto con algunas zonas hemorrágicas. (C) día 25 postrasplante, ambas anastomosis bien cicatrizadas y el desarrollo de un pólipo sobre el injerto. (D) endoscopia al final del estudio en la que se muestra el injerto completamente permeable..... | 39 |
| Figura 15 | (A) traqueoscopia pretrasplante de un animal del grupo V. (B) día 9 postrasplante de tráquea, muestra ambas anastomosis bien cicatrizadas y el injerto isquémico. (C) día 12, ambas anastomosis bien cicatrizadas y el injerto isquémico. (D) día 19 postrasplante, se observa estenosis de la anastomosis proximal y la presencia de exudado purulento..... | 40 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 16 | (A) Traqueoscopia postrasplante inmediato y (B) al 9no día postcirugía en un animal del grupo VI, en las que se observan ambas anastomosis y el injerto isquémico. (C) día 15 postrasplante, muestra ambas anastomosis bien cicatrizadas, el injerto isquémico y el desprendimiento de un cartílago en la anastomosis distal. (D) día 21 anastomosis proximal bien cicatrizada y el desprendimiento de un cartílago en la anastomosis distal, el cual provocó una estenosis del 100% de la luz traqueal..... | 41 |
| Figura 17 | Fotografía que muestra la inflamación de la herida quirúrgica en un animal del grupo V..... | 43 |
| Figura 18 | Fotografía que muestra la lisis total del injerto al quinto día postrasplante en un animal del grupo II..... | 44 |
| Figura 19 | Fotografía que muestra el desarrollo de tejido fibroso en la luz del injerto traqueal en un animal del grupo IV, la cual produjo estenosis del 90%..... | 45 |
| Figura 20 | Fotografía que muestra la luz del injerto traqueal completamente permeable al final del estudio en un animal del grupo IV..... | 45 |
| Figura 21 | Fotografía que muestra la disminución del diámetro del injerto del animal del grupo V que sobrevivió 10 días..... | 46 |
| Figura 22 | Fotografía que muestra la lisis del injerto a los 18 días en un perro del grupo V | 47 |
| Figura 23 | Fotografía que muestra la lisis y formación de una fístula en el del injerto del perro que sobrevivió 21 días..... | 47 |
| Figura 24 | Epitelio (Anillos Control) (40X, H&E)..... | 50 |
| Figura 25 | (A) Epitelio, Post-Liofilización (40X, H&E), (B)Epitelio Post-criopreservación (40X, H&E)..... | 51 |
| Figura 26 | (A) Epitelio Fin de Estudio Aoinjertos Liofilizados(40X, H&E), (B) Epitelio Fin de Estudio Aoinjertos Criopreservados (40X, H&E)..... | 52 |
| Figura 27 | Glándulas (Anillos Control) (40X, H&E)..... | 53 |
| Figura 28 | (A) Glándulas Post-Liofilización (40X, H&E), (B) Glándulas Post-Criopreservación (40X, H&E)..... | 54 |
| Figura 29 | (A) Glándulas Fin de Estudio Aoinjertos Liofilizados (40X, H&E), (B) Glándulas Fin de Estudio Aoinjertos Criopreservados (40X, H&E)..... | 55 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 30 | Cartílago (Anillos Control) (40X, H&E)..... | 56 |
| Figura 31 | (A) Cartílago Post-Liofilización (40X, H&E), (B) Cartílago Post-criopreservación (40X, H&E)..... | 57 |
| Figura 32 | (A) Cartílago Fin de Estudio Aloinjertos liofilizados (40X, H&E), (B) Cartílago Fin de Estudio Aloinjertos Criopreservados (40X, H&E)..... | 58 |
| Figura 33 | (A) Fin de Estudio Aloinjertos Liofilizados (40X, H&E), (B) Fin de Estudio aloinjertos criopreservados (40X, H&E)..... | 59 |
| Figura 34 | (A) Control, (B) Post-Liofilización, (C) Post-Criopreservación del Epitelio (6200X)..... | 60 |
| Figura 35 | (A) Epitelio Fin de Estudio aloinjertos Liofilizados, (B) Epitelio Fin de Estudio Aloinjertos Criopreservados..... | 60 |
| Figura 36 | (A) Cartílago Control, (B) Post-Liofilización, (C) Post-Criopreservación..... | 61 |
| Figura 37 | (A) Cartílago Fin de Estudio Aloinjertos Liofilizados, (B) Fin de Estudio Aloinjertos Criopreservados..... | 61 |
| Figura 38 | (A) Control negativo a VEGF. (B) Injerto de tráquea liofilizada sin epitelio conservado (40X). (C) Injerto traqueal criopreservado. Fin de estudio. Vasos (40X)..... | 63 |
| Figura 39 | (A) Injerto traqueal criopreservado. Fin de estudio. Epitelio conservado (40X). (B) Injerto traqueal criopreservado. Fin de estudio. Glándulas conservadas (40X)..... | 63 |

RELACIÓN DE TABLAS

| | | |
|---------|---|----|
| Tabla 1 | Muestra la sobrevida de los perros sometidos a trasplante traqueal con aloinjertos traqueales liofilizados y criopreservados con y sin inmunosupresión..... | 29 |
| Tabla 2 | Muestra el número de animales por grupo de estudio, que mantuvieron permeable el injerto traqueal trasplantado, en su evaluación radiológica semanal..... | 35 |
| Tabla 3 | Estenosis traqueal por endoscopia..... | 42 |
| Tabla 4 | Muestra el tiempo de cicatrización de los injertos trasplantados en todos los grupos de estudio..... | 48 |
| Tabla 5 | Se observa la presencia de isquemia del injerto traqueal en todos los grupos, durante su sobrevida..... | 48 |
| Tabla 6 | Se aprecia la producción de necrosis en los animales a los que se les colocó un injerto traqueal ya sea liofilizado o criopreservado..... | 49 |
| Tabla 7 | Hallazgos histológicos: mantenimiento de la estructura traqueal por efecto de la preservación..... | 62 |
| Tabla 8 | Hallazgos histológicos: Fin de estudio..... | 62 |
| Tabla 9 | Número total de vasos: Pre-preservación, pre y postrasplante..... | 64 |

RESUMEN

A nivel mundial se han realizado múltiples estudios con el fin de llegar a practicar trasplante de la tráquea, por diferentes métodos, como son aloinjertos vascularizados, injertos desvascularizados, prótesis de diferentes materiales, como también ingeniería de tejidos.

El objetivo de este estudio fue obtener información sobre la respuesta del aloinjerto traqueal liofilizado y criopreservado, con inmunosupresión y con factor de crecimiento del endotelio vascular. Para este estudio se utilizaron 50 perros mestizos (36 receptores y 14 donadores), que se dividieron en 6 grupos de estudio. Grupo I: liofilizado, Grupo II: liofilizado más inmunosupresión, Grupo III: Liofilizado más inmunosupresión, más Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular, Grupo IV: Criopreservado, Grupo V: Criopreservado con inmunosupresión, Grupo VI: Criopreservado con inmunosupresión y Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular. A todos los animales se les realizó evaluación clínica, radiológica y endoscópica. Ocho semanas posteriores a la cirugía los animales fueron sometidos a eutanasia y se les practicó evaluación macroscópica y microscópica de luz y electrónica, así como evaluación angiogénica. Todos los animales sobrevivieron al procedimiento quirúrgico pero no al tiempo de estudio establecido. Los tiempos de sobrevivencia expresados en días promedio \pm error estándar fue significativamente mayor en el grupo IV. La disnea fue menor en el grupo IV y radiológicamente se obtuvieron mejores resultados en el grupo IV. Asimismo, el estudio broncoscópico reportó permeabilidad y buena coloración de la mucosa traqueal en el grupo IV a los 28, 42 y 60 días, así como neoformación vascular de mayor importancia en el grupo IV.

Los resultados sugieren que la criopreservación sin factor de crecimiento del endotelio vascular y sin inmunosupresión ofrecen mayores posibilidades de tratamiento.

Palabras clave: Trasplante, Liofilización, Criopreservación, Inmunosupresión, Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular.

Tisular response of the lyophilized and cryopreserved tracheal allograft treated with immunosuppressive therapy and topical application of vascular endothelial growth factor

ABSTRACT

There are many research studies that report different methods to perform a tracheal transplantation, such as vascularized allografts, devascularized grafts, prostheses from different materials and bioengineered tissues.

The aim of this study was to study the behavior of the lyophilized and cryopreserved tracheal allograft treated with immunosuppressive therapy and endothelial growth factor. We operated on 50 mongrel dogs (14 donors and 36 recipients), divided in 6 study groups as follows: Group I: Lyophilized; Group II: Lyophilized + immunosuppressive therapy; Group III: Lyophilized + immunosuppressive therapy + Endothelial Growth Factor; Group IV: Cryopreserved; Group V: Cryopreserved + immunosuppressive therapy; Group VI:

Cryopreserved + immunosuppressive therapy + Endothelial Growth Factor. The animals were evaluated clinical, radiological and endoscopically. At the moment of euthanasia, we evaluated macroscopic, microscopic, electron microscopy and angiogenic. Study length 8 weeks. All the animals survived the surgical procedure but none the study length. Study group IV showed statistical difference in survival time, expressed in median days \pm standard error, low dyspnea grade, better radiographic findings, better permeability, good tracheal mucosa coloration at days 28th, 42nd, 60^t, as well as more neoformation vessels.

These results showed that cryopreservation alone, was the best treatment.

Key words: Transplantation, Lyophilization, Cryopreservation, Immunosuppressive therapy, Vascular Endothelial Growth Factor.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Anatomía, fisiología e histología de la tráquea

El sistema respiratorio en los mamíferos es un conjunto de órganos cuyas funciones principales son la termorregulación, el equilibrio ácido base y el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono (gases respiratorios) entre el organismo y el medio ambiente.^{1,2} Se divide en tres zonas anatómicas: De conducción, de transición y respiratoria. La zona conductiva incluye la cavidad nasal (cojinete nasal, tabique nasal y los cornetes), la laringe, tráquea, bronquios, bronquiolos terminales, tejido conjuntivo y ramificaciones principales de las arterias y venas pulmonares. La zona de transición se compone de bronquiolos respiratorios y conductos alveolares. Tanto la zona conductiva como la de transición contienen vasos sanguíneos que sirven para humidificar, filtrar y distribuir aire rico en oxígeno a la unidad respiratoria, además de eliminar el dióxido de carbono del aire alveolar. La zona respiratoria contiene los alveolos, que son la unidad anatomofuncional de los pulmones y los capilares sanguíneos, y es el sitio de intercambio gaseoso entre el aire alveolar y la sangre.³

Las vías aéreas conductoras (narinis, senos paranasales, laringe, faringe, tráquea y bronquios) son una serie de compartimientos que permiten el movimiento de aire desde su entrada al organismo, hasta el área de intercambio gaseoso de los pulmones, así como para la salida de éste. Las vías aéreas conductoras también tienen función protectora al filtrar partículas como bacterias y polvo que entran con el aire inspirado, calentar y proporcionar humedad al mismo.

La tráquea tiene como función llevar el aire inspirado ya sea por la nariz o boca hacia las zonas de intercambio gaseoso. En el humano este órgano es un tubo semirígido flexible que se extiende por la parte inferior o ventral del cuello, desde el cartílago cricoides hasta el mediastino en donde a nivel de la

cuarta o quinta vértebra torácica se bifurca en dos bronquios principales (derecho e izquierdo). Tiene una longitud de 11 a 13 centímetros y de 20 a 22 anillos (2.1 anillos por centímetro).⁴

En el perro ésta se encuentra formada por 35 a 45 cartílagos en forma de “C” los cuales se unen en la porción ventral mediante una membrana elástica a la que se denomina porción membranosa de la tráquea, mientras que cada cartílago se conecta al anillo adyacente por tejido conectivo fibroelástico.^{1, 5}

1.1.1. Irrigación de la tráquea

Salassa⁶, estudió 21 especímenes de tráquea humana, 10 con técnicas convencionales y 11 con técnicas de microdissección. La tráquea recibe irrigación de la tiroidea inferior, de la subclavia, de la intercostal superior, de la mamaria y de la arteria bronquial media. Estas arterias originan anastomosis paralelas a la tráquea, de estas anastomosis salen vasos que ingresan a la tráquea en el tejido intercartilaginoso. Estos vasos transversales junto con los longitudinales originan una red que nutre a la mucosa traqueal. Las arterias esofágicas son las que irrigan la parte membranosa de la tráquea.

1.1.2. Inervación de la tráquea

La inervación en todos los mamíferos es similar y está dada tanto por fibras simpáticas como parasimpáticas del sistema nervioso autónomo. Las fibras simpáticas son de los ganglios cervicales y tronco simpático que actúan inhibiendo la contracción del músculo traqueal y secreciones glandulares, mientras que las fibras parasimpáticas son ramas craneales del nervio vago y del laringeo recurrente, las cuales controlan la contracción del músculo traqueal y la secreción glandular (Figuras 1 y 2).

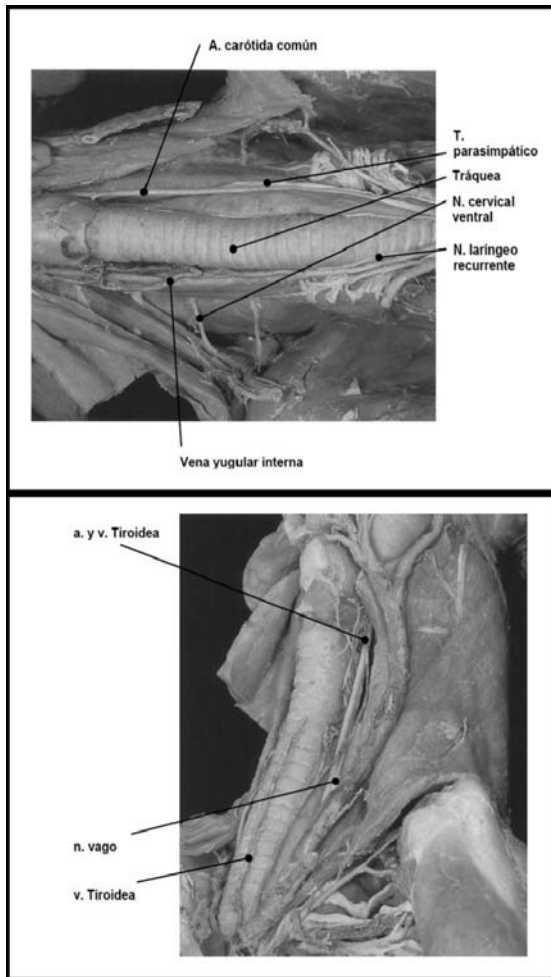


Figura 1. Irrigación e Inervación Traqueal

Figura 2. Arteria Tiroidea, Vena Tiroidea y Nervio Vago

1.1.3. Morfología traqueal

Histológicamente en todos los mamíferos la tráquea se compone de las siguientes capas (de adentro hacia fuera): mucosa, lámina propia, submucosa, cartílago y adventicia (Figura 3).

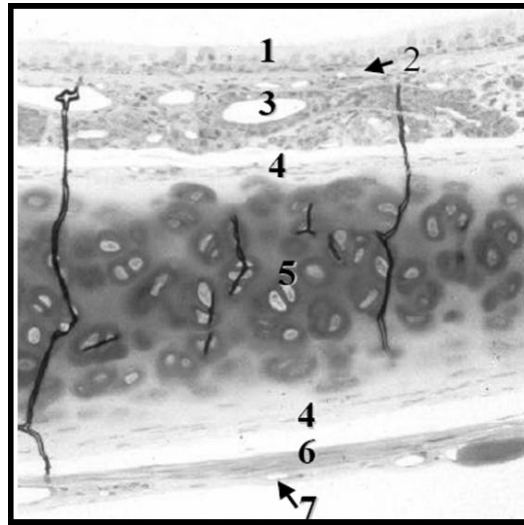


Figura 3. 1) Epitelio, 2) Lámina propia de tejido conjuntivo, 3) Submucosa laxa con glándulas, 4) Pericondrio, 5) Cartílago, 6) Músculo liso, 7) Adventicia

La mucosa está formada por el llamado epitelio respiratorio, que es de tipo pseudoestratificado y ciliado. Éste tiene como función, actuar como barrera protectora ya que produce moco que filtra y remueve (a través de los cilios) las partículas atrapadas en él hacia la parte proximal de la tráquea.

La lámina propia está formada por tejido conjuntivo laxo, principalmente a base de fibras elásticas, también posee glándulas mucosas que tienen sus conductos de salida en la luz de la tráquea.

La submucosa se encuentra constituida por una capa de fibras elásticas.

El cartílago es de tipo hialino y se encuentra revestido por pericondrio que se continúa con un tejido conectivo fibroso que une a los cartílagos entre sí y su función es darle estabilidad a la tráquea (Figura 4).

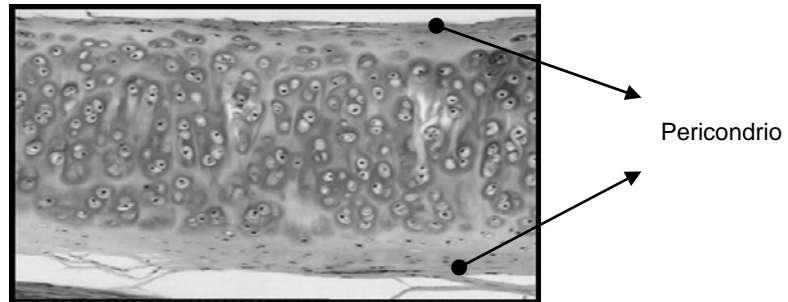


Figura 4. Cartílago traqueal (10X)

La adventicia es la cubierta externa de la tráquea y se encuentra formada por tejido conectivo laxo y su función es unir a la tráquea con los tejidos adyacentes ⁷(Figura 5).

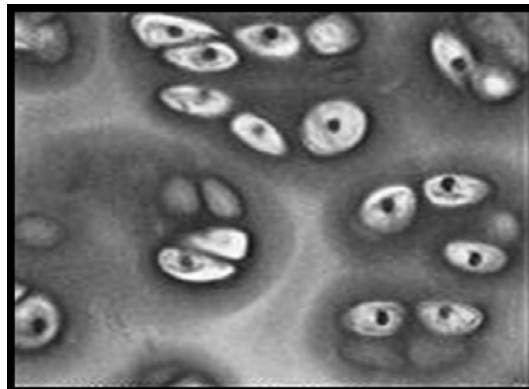


Figura 5. Cartílago traqueal (40X)

1.2. Patología de las vías aéreas

Desde mediados del siglo veinte, se ha realizado investigación clínica-quirúrgica para resolver diferentes tipos de patología traqueal,

desafortunadamente, hasta la fecha, no se cuenta con avances substanciales médico-quirúrgicos que resuelvan, lesiones extensas de este órgano.

La tráquea es un órgano tubular de forma circular que se encuentra sostenida por anillos cartilaginosos en forma de herradura que se conectan posteriormente mediante una membrana elástica. La función principal es llevar el aire inspirado y/o espirado ya sea por la nariz o por la boca a las zonas del intercambio gaseoso.

Es de mencionar que la traqueostomía se practica desde hace muchos años.⁸

Las traqueoplastías o reconstrucciones traqueales, como parte de la cirugía general de tórax, llevan poco tiempo de realizarse.⁹ El pensamiento que se tenía de que “el cartílago traqueal difícilmente cicatrizaba y que la máxima extensión, que se podía reseca de la tráquea eran dos o tres anillos”, originó que se incrementara la investigación quirúrgica para resolver, traqueopatías con extensiones mayores a dos centímetros.¹⁰ Pionero en la búsqueda de soluciones para esta patología, es el Dr. Hermes C. Grillo que ideó varios procedimientos quirúrgicos, para poder reseca más de “dos o tres anillos” (2.1 anillos por centímetro), logrando buenos resultados en extirpaciones de 4 cms.¹¹

En México, en 1954, Pacheco y cols., publicaron un trabajo de alotrasplante traqueal en “fresco” en que describen la destrucción y fibrosis del injerto.¹² Así que, por lo extenso de las lesiones traqueales, y no ser posible la anastomosis termino-terminal, se idearon “prótesis de diferentes materiales sintéticos”, para sustituir a la tráquea y dar una solución estable y permanente a la insuficiente ventilación que sufren estos enfermos.¹³⁻¹⁵

Es muy numerosa la información que existe en relación a patología traqueal y su tratamiento en la que se han descrito la aplicación de diferentes materiales, prótesis sólidas, prótesis porosas, prótesis con tejido autólogo, “colgajos” vascularizados de tejidos autógenos.¹⁶⁻¹⁸

Asimismo, aloinjertos traqueales no vascularizados,¹⁹ aloinjertos frescos desvascularizados, aloinjertos preservados desvascularizados, así como también injertos vascularizados,²⁰ aloinjertos frescos o preservados e indirectamente vascularizados.²¹⁻²²

En cuanto a “ingeniería de tejidos” se ha intentado la siembra de condrocitos que son colocados en un armazón de un polímero sintético biodegradable, estudios que están aún en desarrollo.²³

Esto hace ver que el alotrasplante traqueal se encuentra en la actualidad en fase experimental y no es una realidad clínica.⁴

En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias ingresaron de 1998-septiembre de 2007, 993 pacientes con patología traqueal, que en orden de frecuencia fueron estenosis, tumores y malacias.²⁴ Lo ideal en estos pacientes es practicar anastomosis termino-terminal, pero en los que no era posible por la extensión de la lesión, se efectuaron: traqueostomías, aplicación de rayo láser, dilataciones traqueales, colocación de diferentes tipos de stents etc., para disminuir la insuficiencia respiratoria ocasionada por la obstrucción.

Toda esta problemática ha causado, en diferentes países, que investigadores quirúrgicos se dediquen prioritariamente a preservar tráqueas a través de diferentes técnicas, para ser transplantadas en individuos de la misma

especie, en portadores de extensas lesiones de tráquea y en los que no había la posibilidad de hacer anastomosis termino-terminal.²⁵⁻²⁷ De ser posible, y si se lograra eficaz preservación, se podría tener un “banco de tráqueas”²⁸ para manejar esta insuficiencia respiratoria, que provoca en el paciente complicaciones funcionales e infecciosas que son fatales. Esta es la razón principal de la propuesta y la realización de este protocolo.

1.3. Inmunosupresión

El descubrimiento de la ciclosporina por Borel en 1976 mejoró notablemente los resultados de diferentes tipos de trasplante.²⁹

La ciclosporina es un péptido cíclico producido por un hongo *Tolypocladium inflatum* que penetra al citoplasma celular, formando con las proteínas las llamadas ciclofilinas. La ciclosporina-ciclofilina se une a la calcineurina en el protoplasma celular.

La calcineurina normalmente actúa como una fosfatasa que regula la desfosforilización de proteínas nucleares, tales como el factor nuclear de activación de las células T, facilitando su paso a través de la membrana nuclear donde actúan como factores de transcripción para la activación de regiones promotoras de varias citocinas. El complejo ciclosporina-ciclofilina inactiva la acción de la calcineurina, y así inhibe la transcripción de citocinas (IL-2, -3, -4 y IL-5, interferon γ , factor de necrosis tumoral α y factor estimulador de colonias granulocitos/macrófagos).³⁰

La limitada cantidad de calcineurina en células inmunes, comparadas con células no inmunes y el hecho de que la calcineurina es importante para la activación de células T justifica la sensibilidad de los linfocitos T hacia la ciclosporina.

La ciclosporina es una molécula lipofílica que en los pacientes tiene variación en la absorción y en la biodisponibilidad. La formulación de ciclosporina como microemulsión hace que aumente la solubilidad y la absorción en el intestino delgado, este preparado reduce los efectos de la comida y también la presencia de bilis en cuanto a la absorción.

Sin embargo, es fundamental su monitoreo para mantener la mayor eficacia con la mínima incidencia de eventos adversos.³¹

La azatioprina es un inhibidor del ciclo celular. Actúa sobre la síntesis del ácido deoxirribonucleico y del ácido ribonucleico, e interfiere con los precursores de la síntesis de la purina y suprime de novo la síntesis de la purina. Tiene un efecto sobre la proliferación de linfocitos T y B pero no tiene efecto en la producción de citocinas. También tiene acción antiinflamatoria debido probablemente a su efecto sobre la proliferación celular.³²

En la mayoría de los programas de trasplante, asimismo en los de tráquea se utiliza un triple esquema que incluye esteroides. El uso de esteroides en el postoperatorio inmediato ha sido controversial, por lo que algunos médicos han adoptado el uso de dosis moderadas en el postoperatorio.

Estos fármacos actúan sobre el número de linfocitos y sobre todo sobre la función de estas células. Ejercen los mismos efectos sobre reacciones inmunitarias en el huésped. Los factores que quedan inhibidos incluyen interferon γ , factor estimulante de colonias de granulocitos/monocitos, interleucinas (1,2,6) y factor de necrosis tumoral α . La red de citocinas tienen participaciones esenciales en los efectos de macrófagos linfocitos T y B y no sorprenden que la inhibición de la síntesis de citocinas y el efecto de las mismas por los glucocorticoides suprime de modo considerable la reacción inmunitaria.

Existen otros inmunosupresores como son: anticuerpos policlonales antilinfocitos, anticuerpos monoclonales anti-CD3, anticuerpos monoclonales anti-interleucina 2.

Asimismo hay otros productos biológicos como son: el Tacrolimus, que es derivado de *Streptomyces tsukubaensis*. Actúa de manera similar a la ciclosporina.

También se utiliza en algunos casos Micomofenil, Micofenolato en lugar de la Azatioprina.

De estos últimos inmunosupresores no tenemos experiencia.

En cuanto a inmunosupresores más nuevos, hay reportes del Sirolimus (Rapamicina), el Everolimus y FTY720 de los cuales como anteriormente se dijo, no se tiene experiencia.³³⁻³⁶

1.4. Liofilización

La liofilización es un método de deshidratación o secado, realizado por el enfriamiento de productos húmedos previamente congelados que hace que el hielo formado, y por “sublimación” , por la baja presión parcial se transforme en vapor de agua sin pasar al estado líquido.

Las muestras húmedas, previamente congeladas pueden mantenerse **así “congeladas”** al colocarlas en vacío dado que la temperatura de la muestra desciende por evaporación fría. En general, se pierde en promedio 15% del agua contenida en el material húmedo. En la práctica, es posible que las sustancias no se mantengan completamente congeladas especialmente si se trata de soluciones acuosas y en estos casos el proceso de liofilización debe de completarse con un periodo de secado por reabsorción.

La importancia de la liofilización radica en que se reduce el riesgo de causar daños estructurales en materiales sensibles al calor en las que es posible aplicar congelamiento (por ejemplo procesos de calor desnaturalizan las proteínas).³⁷

Muchos microorganismos y proteínas sobreviven a la deshidratación que genera el proceso de secado por liofilización preservando la integridad estructural y esto ha dado lugar a que el método se utilice en vacunas, fracciones sanguíneas, productos farmacéuticos, materiales para diagnóstico y productos alimenticios. Todos los productos que se preservan mediante liofilización requieren de una rápida y fácil rehidratación para recuperar su estructura física normal pre-liofilización.

Ventajas de la liofilización: 1.- Proceso de deshidratación que permite la preservación de diferentes compuestos alimenticios, farmacéuticos, tisulares, celulares y virales entre otros sin alterar la integridad estructural y la actividad funcional de los mismos. 2.- Permite el almacenamiento de los productos liofilizados a temperatura ambiente, lo que evita la refrigeración, la congelación y facilita el almacenamiento. 3.- Los productos liofilizados se reconstituyen fácilmente mediante simple hidratación con lo que adquieren su consistencia física inicial. 4.- Mantiene la esterilidad de diversos productos, dado que la deshidratación destruye “bacterias” . Sin embargo, por cuestiones de extrema seguridad, se recomienda esterilizar los productos con óxido de etileno en forma posterior a la liofilización.³⁸

1.5. Criopreservación

La criopreservación es una técnica que ha demostrado tener utilidad en el mantenimiento estructural y funcional de diferentes células y tejidos, es

probablemente el método mas efectivo para la protección de los parámetros morfológicos y bioquímicos.³⁹⁻⁴¹ La criopreservación consiste básicamente en sumergir el biomaterial que se desea criopreservar dentro de una solución capaz de evitar o disminuir el daño osmótico (medio de criopreservación) adicionada con los nutrientes adecuados de acuerdo con las características propias del biomaterial además de un agente crioprotector y mantenerlo almacenado bajo temperaturas extremas de congelación (tradicionalmente nitrógeno líquido) durante periodos prolongados de tiempo. Una vez que concluye el tiempo de criopreservación, el biomaterial debe de ser descongelado en “baño maría” lo mas rápido posible para lo cual se utilizan habitualmente temperaturas que oscilan entre 25°C y 40°C. Entre los agentes crioprotectores mas utilizados se encuentran el glicerol y el dimetilsulfóxido (DMSO) que tienen como finalidad deshidratar a la célula y prevenir la formación intracelular de cristales de hielo.⁴²⁻⁴⁴

En general, la criopreservación se inicia con un proceso de congelación programada en el que la temperatura se disminuye gradualmente hasta alcanzar un rango entre -80°C y -100°C, la mayoría de las alteraciones celulares se presentan cuando el tejido alcanza la denominada “temperatura de riesgo” que oscila entre 0°C y -60°C. El daño tisular por efecto de la congelación se clasifica como directo cuando depende del rango de la temperatura y como indirecto cuando se presenta como consecuencia de un periodo prolongado de criopreservación.⁴⁵

1.6. Angiogénesis

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes.⁴⁶

Este proceso angiogénico requiere de una serie de pasos que incluye: la migración celular y proliferación de células endoteliales dentro y fuera de la

microvasculatura original, el rompimiento de membranas basales, y finalmente la expresión controlada de enzimas proteolíticas que pueden degradar matriz extracelular, reensamblar a la misma y formar tubos endoteliales.⁴⁷

En el proceso normal de angiogénesis existe un balance de moléculas proangiogénicas /antiangiogénicas. Dentro de las moléculas angiogénicas que se conocen en la actualidad y de las más estudiadas es el VEGF (factor de crecimiento de endotelio vascular).⁴⁸

El VEGF, también conocido como factor de permeabilidad vascular, es una proteína homodimérica de 46 kilodaltones. La expresión de VEGF se asocia principalmente a las células musculares lisas, lo que indica un papel clave de estas células como moduladoras de las células endoteliales, con capacidad mitogénica específica sobre las mismas.⁴⁹

El VEGF actúa selectivamente sobre células endoteliales a través de la unión específica a receptores tirosina cinasa clase III, denominados VEGFR1/Flt-1 y VEGFR2/Flk-1/KDR.

Las propiedades angiogénicas del VEGF están muy bien establecidas, razón por lo que actualmente existen una serie de estudios experimentales que apoyan su aplicación como un agente terapéutico de angiogénesis, con lo cual se pretende incrementar el proceso natural de formación de vasos sanguíneos colaterales en los tejidos isquémicos.⁵⁰

2. JUSTIFICACIÓN

La reconstrucción de grandes defectos traqueales > a 7cm., puede llevarse a cabo mediante la realización de trasplante traqueal. Sin embargo no existe un método de preservación confiable que permita mantener la viabilidad de las células de este órgano sin aporte sanguíneo y que permita la angiogénesis del injerto trasplantado aún en presencia de terapia inmunosupresora.

Con base en lo anterior, se puede pensar que el realizar un trasplante de tráquea cervical mayor a 7 cm utilizando injertos traqueales criopreservados o liofilizados, combinados con la aplicación del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) e inmunosupresión, permitirá probablemente obtener mejores resultados.

3. HIPÓTESIS

Considerando que:

- 1.- La liofilización y la criopreservación son técnicas que mantienen la estructura y funcionalidad celular.
- 2.- La inmunosupresión disminuye la respuesta inmune.
- 3.- El factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) favorece la angiogénesis.

El trasplante de tráqueas preservadas mediante liofilización y criopreservación en combinación con la inmunosupresión y la aplicación de VEGF probablemente mejore la viabilidad del aloinjerto.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar la viabilidad de injertos traqueales liofilizados o criopreservados, trasplantados en la tráquea cervical con la aplicación tópica del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en los sitios de anastomosis y terapia de inmunosupresión.

4.2. Objetivos Específicos

4.2.1 Evaluar las técnicas de liofilización y criopreservación de injertos traqueales cuando se realiza trasplante traqueal.

4.2.2 Valorar si la administración de terapia inmunosupresora favorece la utilidad de injertos traqueales liofilizados y criopreservados al realizar trasplante traqueal.

4.2.3 Evaluar si la administración de terapia inmunosupresora combinada con la aplicación tópica del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en los sitios de anastomosis favorece la angiogénesis y la cicatrización del trasplante traqueal liofilizado o criopreservado.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Recursos

Los recursos humanos y materiales utilizados para el desarrollo de este protocolo fueron otorgados por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Se contó con la participación de los investigadores y técnicos del Departamento de Investigación en Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, que proporcionaron los quirófanos, equipos de anestesia inhalada, monitores, aparato de RX (Diagnostic X-Ray Unit Super 80 ACOMA X-Ray Industry Co. LTD Tokio, Japan) e instrumental necesario para la realización de los procedimientos quirúrgicos, tratamientos y seguimiento posoperatorios de los animales.

Así como la participación de investigadores del Departamento de Morfología Celular y Molecular del Instituto Nacional de Rehabilitación, quienes realizaron estudios por microscopía electrónica utilizando el microscopio electrónico de transmisión Tecnai 10 Philips.

Los animales que se utilizaron en este estudio fueron obtenidos de antirrábicos y proporcionados por el Bioterio del INER.

5.2. Animales de experimentación

Se utilizaron 50 perros mestizos (36 receptores y 14 donadores), clínicamente sanos, con un peso entre 15 y 35 kg., los cuales fueron manejados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-Z00-1999) para el uso y cuidado de los animales de laboratorio. Los animales estuvieron confinados en jaulas individuales con espacio suficiente en amplitud y altitud para permitir movimientos y actitud normal de la especie, con comederos y bebederos individuales localizados en la puerta a una

altura pertinente del suelo para evitar contaminación con excretas, con disposición de suficiente agua y alimento *ad libitum*. Asimismo se encontraban protegidos de condiciones climáticas extremas y siempre estuvieron bajo la supervisión de un Médico Veterinario Zootecnista.

Los perros fueron sometidos a anestesia general mediante 6 mg/kg de propofol (Diprivan, Astra Zeneca, México) más 0.1 mg/kg de clorhidrato de xilacina vía IV (Rompum, Bayer, México) mezclados en la misma jeringa, se intubaron, se conectaron a un ventilador de volumen (Harvard, Apparatus) con un vaporizador (Isotec 3 Ohmeda), y la anestesia se mantuvo durante el procedimiento quirúrgico con isoflurano al 1.5%.

5.2.1 Criterios de inclusión

Se incluyeron perros clínicamente sanos, que no presentaron antecedentes de alguna enfermedad respiratoria desde su llegada al Bioterio del INER y antes de que se les realizara el procedimiento quirúrgico.

5.2.2 Criterios de exclusión

Los animales con datos clínicamente patológicos durante su estancia en el Bioterio del INER y previos al procedimiento quirúrgico o con antecedentes de alguna cirugía de tórax, fueron excluidos del estudio.

5.2.3 Criterios de eliminación

Todo animal con signos clínicos de cualquier patología que no fuera provocada por el procedimiento quirúrgico.

5.2.4 Criterios de terminación

Todo animal con signos de dificultad respiratoria severa, por dehiscencia o necrosis del segmento anastomosado, o cualquier otra patología que

produzca signos evidentes de enfermedad fueron objeto de terminación del estudio.

5.3. Consideraciones Éticas

El estudio fue conducido de acuerdo con los lineamientos de investigación en animales de laboratorio, (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) de los Estados Unidos y también lo descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM- 062-ZOO-1999). Asimismo fue revisado y aprobado por el comité de Bioética y el Comité Científico del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Los animales estuvieron confinados en jaulas individuales con protección a climas extremos, disposición de agua y alimento ad libitum, durante todo el tiempo del estudio, y siempre estuvieron bajo la supervisión de un médico veterinario zootecnista.

Para evitar el dolor de los animales se utilizó dipirona (Metamizol sódico Nondol-Sector Salud) 28 mg/kg IV durante el procedimiento quirúrgico y vía IM durante 3 días posteriores a la cirugía.

Una vez transcurrido el tiempo de estudio, todos los animales fueron sometidos a eutanasia con sobredosis de pentobarbital sódico (Anestesal, Pfizer S. A. de C. V. México)⁵¹

5.4. Procuración de la tráquea

En los animales donadores se practicó incisión media desde el cartílago cricoides hasta xifoides. Disección de planos superficiales hasta llegar a la tráquea. Ésta fue procurada, se colocó sobre una charola de mayo, se realizó una limpieza de la tráquea (coágulos) y se enjuagó con una solución glucosada al 50% (Solución DX-50, PISA) mantenida en un baño de hielo y

adicionada con 5000U de heparina (Inhepar,PISA), 1 g de estreptomina (Sulfaestrep, PISA) y 100000U de penicilina (PISA) por cada litro de solución. Por medio de un bisturí, la tráquea se cortó en segmentos de 15 anillos que fueron divididos al azar para su preservación mediante cualquiera de las técnicas utilizadas (liofilización y criopreservación).

5.5. Liofilización de los injertos traqueales

Se liofilizaron 18 segmentos traqueales. Cada uno de los segmentos, se colocó sobre un soporte de polietileno dentro de un matraz erlenmeyer perfectamente sellado. Los matraces se congelaron a -70°C durante 24 horas y transcurrido el tiempo de congelación, se colocaron en una liofilizadora (Labconco) a -55°C durante un tiempo que varió entre 12 y 24 horas. Concluido el tiempo de liofilización, los injertos traqueales liofilizados se desmontaron del soporte de polietileno y se empaquetaron para su esterilización con óxido de etileno. Los injertos traqueales liofilizados se almacenaron a temperatura ambiente durante 2 meses hasta el momento de su uso, para lo cual se rehidrataron durante 30 minutos en solución salina fisiológica mantenida a 40°C .

5.6. Criopreservación de los injertos traqueales

Se criopreservaron 18 segmentos traqueales. Cada uno de los segmentos, se colocó de manera individual dentro de un criotubo que contenía medio RPMI-1640 adicionado con 10% de dimetil sulfóxido, 20% de suero bovino fetal y una solución antibiótica-antimicótica.⁵² Se congelaron a -70°C durante 24 horas y transcurrido el tiempo de congelación se colocaron dentro de un tanque de criopreservación con nitrógeno líquido (fase de vapor) durante 2 meses hasta el momento de su uso, para lo cual los criotubos se colocaron en agua mantenida a 40°C para su descongelación. Una vez que los injertos traqueales criopreservados se descongelaron, se retiraron del criotubo y se

enjuagaron durante 30 minutos con solución salina fisiológica mantenida a 40°C.^{53-56,43}

5.7. Técnica de microscopía óptica

Se tomaron muestras de los injertos traqueales, pre, post preservación y post trasplante, se fijaron en formaldehído al 10%, se incluyeron en parafina, se les realizaron cortes de 4 μ y finalmente se tiñeron con hematoxilina-eosina, tricrómica de Masón, azul de toluidina y Verhoef para su evaluación.

5.8. Técnica de microscopía electrónica

Se tomaron muestras de los injertos traqueales, pre, post preservación y post trasplante, se les realizó microscopía electrónica de transmisión.

Las muestras de tráquea se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en buffer de fosfatos (0.2M) por 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron cuatro lavados de 5 minutos cada uno con buffer de fosfatos.

Se posfijaron por 1 hora en tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1% en buffer de fosfatos y se lavaron 4 veces durante 5 minutos con buffer de fosfatos.

Todas las muestras se deshidrataron gradualmente con alcoholes al 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y 100% realizando cambio de 10 minutos cada uno.

Se infiltraron con óxido de propileno y resina Embed 812 (2:1) por una hora a temperatura ambiente.

Se realizó un cambio de óxido de propileno y resina Embed 812 (1:1) y se dejaron por 24 horas a temperatura ambiente.

Se incluyeron en resina Embed 812 para polimerizar en una estufa a 60°C durante 24 horas, se realizaron cortes finos, con cuchilla de diamante y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. La evaluación se llevó a cabo con el microscopio electrónico de transmisión Tecnai 10 Philips.⁵⁷⁻⁶⁰

5.9. Técnica de inmunohistoquímica para determinación de VEGF en tráquea

Para la cuantificación del VEGF producido por los vasos de neoformación, se obtuvieron muestras de las anastomosis traqueales, se fijaron en formol amortiguado al 10% durante 24 horas, se montaron en bloques de parafina, se hicieron cortes de 1-3 micras y se montaron en laminillas silanizadas, las cuales se desparafinaron en una estufa por 20 minutos a 36 grados y posteriormente se rehidrataron y clarificaron en xilol y alcohol. Posteriormente las laminillas se colocaron en una cámara de recuperación de antígeno en buffer de citratos pH:6 y se pusieron en un baño Maria a 80 grados x 20 minutos, se enfriaron y se les realizó un primer lavado con TBST 3 X 5 minutos. Acto seguido se removió la peroxidasa endógena y se colocó el 1er. Anticuerpo en las laminillas (anti-VEGF 20µg/ml antibody R&D systems catalog number:AF564), inmediatamente se incubó por 24 horas a 4 grados. Concluido esto se procedió a la incubación con el 2do. Anticuerpo biotilnilado durante 10 minutos a temperatura ambiente, las laminillas se lavaron con TBST 3x5 minutos y se incubaron nuevamente con el conjugado streptavidina/peroxidasa 15 minutos, se lavaron nuevamente y se le añadió el cromógeno revelador amino-etil –carbazole se incubó de 1-5 minutos dependiendo de la intensidad de la marca. Finalmente las laminillas se trataron con hematoxilina para virar el color del tejido y se montaron en un medio acuoso y se hace aparente el VEGF.⁶¹⁻⁶³

5.10. Grupos de Estudio

Los 36 animales receptores fueron divididos al azar en 6 grupos de estudio en los que se resecó un segmento traqueal que fue reparado con aloinjerto traqueal liofilizado o criopreservado y fueron tratados de la siguiente manera:

Grupo I (n=6). El segmento traqueal resecado se sustituyó con aloinjerto traqueal liofilizado y los animales no recibieron ningún tipo de tratamiento.

Grupo II (n=6). Se realizó trasplante de tráquea cervical utilizando aloinjerto traqueal liofilizado. Los animales recibieron terapia inmunosupresora con 15mg/kg/día ciclosporina A (CyA), 2 mg/kg/día prednisona (Pred) y 2mg/kg/día de azatioprina (Aza).

Grupo III (n=6). Se realizó trasplante de tráquea cervical utilizando aloinjerto traqueal liofilizado. Los animales recibieron terapia inmunosupresora con 15mg/kg/día CyA, 2 mg/kg/día Pred y 2mg/kg/día de Aza y ésta se combinó con la aplicación de una dosis única de 0.2 mg de VEGF en el sitio de las anastomosis.

Grupo IV (n=6). El segmento traqueal resecado se sustituyó con aloinjerto traqueal criopreservado y los animales no recibieron ningún tipo de tratamiento.

Grupo V (n=6). Se realizó trasplante de tráquea cervical utilizando aloinjerto traqueal criopreservado. Los animales recibieron terapia inmunosupresora con 15mg/kg/día ciclosporina A (CyA), 2 mg/kg/día prednisona (Pred) y 2mg/kg/día de azatioprina (Aza).

Grupo VI (n=6). Se realizó trasplante de tráquea cervical utilizando aloinjerto traqueal criopreservado. Los animales recibieron terapia inmunosupresora con 15mg/kg/día CyA, 2 mg/kg/día Pred y 2mg/kg/día de Aza y ésta se combinó con la aplicación de una dosis única de 2 ng/3ml de VEGF en el sitio de las anastomosis.

5.11. Técnica quirúrgica del receptor

Los animales receptores se prepararon bajo las mismas condiciones de ayuno y anestesia descritas para los donadores, utilizando las técnicas quirúrgicas habituales, se resecó un segmento de tráquea cervical con una

longitud de 10 anillos y se realizó el implante con aloinjerto traqueal liofilizado o criopreservado de igual dimensión.

5.12. Tratamiento

En los grupos II y V se administró terapia inmunosupresora diaria, la cual se inició inmediatamente después de la cirugía y durante 8 semanas que fue el tiempo de duración del estudio. En los grupo III y VI además de la terapia inmunosupresora, se combinó con la aplicación de una dosis única de 2ng/3ml de VEGF en el sitio de las anastomosis.

5.13. Evaluaciones

Al concluir el tiempo de estudio establecido (8 semanas) los animales fueron sometidos a eutanasia mediante una sobredosis de anestesia.

5.13.1. Clínica

Se realizó evaluación clínica diaria durante la primera semana posquirúrgica y cada tres días, durante el tiempo del estudio. En ésta se evaluó el grado de disnea de acuerdo a una escala modificada a la utilizada por la Medical Research Council⁶⁴, la cual se basa en la severidad de ésta: 0 = sin dificultad para respirar después de correr, 1 = dificultad para respirar después de correr, 2 = dificultad para respirar en reposo.

La evaluación clínica consistió en realizar observación de cada animal dentro de su jaula, toma de temperatura, valoración de la coloración de mucosa oral, auscultación de la cavidad torácica para evaluar la frecuencia respiratoria, ruidos respiratorios, y frecuencia cardiaca. Así como también se evaluó la presencia de infección o sangrado de la herida quirúrgica.

El grado de disnea fue evaluado primero observando a los animales en reposo dentro de su jaula y posteriormente se les hizo correr 20 metros.

Inmediatamente después se observó si los animales presentaban dificultad para respirar, vigilando la frecuencia cardíaca y respiratoria, escuchando los ruidos respiratorios, estridor al ladrido, así como si presentaban respiración torácica o abdominal y la coloración de la mucosa oral.

5.13.2. Radiológica

Se tomaron placas de rayos X laterales de cuello prequirúrgicas y posquirúrgicas, al tercer día postcirugía y posteriormente cada semana durante tres semanas y en éstas se evaluó el estado de la traqueoplastia y el porcentaje de estenosis, tomando como referencia el diámetro ventro-dorsal de la tráquea antes de ser operada. El grado de estenosis se midió con una regla estándar tomando el diámetro total de la tráquea y el diámetro de la zona de menor luz traqueal. Se midió en milímetros pero se reportó en porcentaje (%) de estenosis.

5.13.3. Endoscópica

Se realizó evaluación visual directa de la tráquea mediante traqueoscopia antes de la cirugía y posterior a ésta cada tres días durante el tiempo del estudio y se valoró el estado de la anastomosis, así como la posible presencia de estenosis. Los procedimientos se videograbaron con una videocasetera VHS. La presencia de estenosis se evaluó de acuerdo a la escala descrita por Cotton: Grado I = sin obstrucción de la luz hasta un 50% de obstrucción, Grado II = de un 51% de obstrucción de la luz hasta un 70%, Grado III = de 71% hasta 99%, Grado IV = luz traqueal no detectable.⁶⁵

5.13.4. Macroscópica

Una vez transcurridas 8 semanas postcirugía, los animales fueron sometidos a eutanasia con sobredosis de pentobarbital sódico (Anestosal, Pfizer S.A. de C.V. México) y se realizó evaluación macroscópica y microscópica de la anastomosis.

Macroscópicamente se revisó el estado de la anastomosis, la cicatrización extraluminal, la presencia de dehiscencia, infección, así como la formación de fístulas. Para evaluar el estado de la mucosa, el lumen y la cicatrización de la tráquea, se retiró el segmento anastomosado y se incidió por la parte membranosa de la tráquea para evaluar la estenosis y tipo de cicatriz formada.

5.13.5. Microscópica. Luz y electrónica

Para la evaluación microscópica se tomaron muestras de los sitios de anastomosis y se fijaron en formaldehído al 10%, se incluyeron en parafina, se les realizaron cortes de 4 μ y se tiñeron con hematoxilina –eosina y tricrómica de Masson para determinar la presencia de vasos de neoformación, inflamación o fibrosis.

5.13.6 Angiogénica

En todos los aloinjertos traqueales se realizó evaluación angiogénica “in situ” (determinación inmunohistoquímica del VEGF) en forma previa y posterior a la liofilización o criopreservación de los aloinjertos así como al concluir el tiempo de estudio post-reconstrucción traqueal.

5.13.7. Análisis Estadístico

La supervivencia en cada grupo de estudio fue evaluado por ANDEVA y TUKEY, el grado de disnea por Kruskal Wallis. La continuidad del injerto así como el porcentaje de estenosis observado en los estudios radiológicos y endoscópicos se realizó por Kruskal Wallis y ANDEVA.

Los resultados macroscópicos como cicatrización, isquemia y necrosis fueron evaluados mediante Kruskal Wallis y por último la evaluación de angiogénesis se realizó con ANDEVA y TUKEY.

Todos los hallazgos observados se compararon dentro de cada grupo y entre grupos y se consideraron como significativos los valores de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. Evaluación clínica

Todos los animales operados sobrevivieron al procedimiento quirúrgico pero no al tiempo de estudio establecido.

Clínicamente todos los animales durante la primera semana mostraron una evolución clínica satisfactoria. Sin embargo a partir de la segunda semana postcirugía empezaron a mostrar estridor y disnea en reposo, además de inflamación severa con olor desagradable de la herida quirúrgica.

Los animales en cada grupo se sometieron a eutanasia por mostrar disnea severa en los siguientes tiempos:

Grupo I: día 22, 14, 11, 16, 10, 12 postcirugía (Tabla 1).

Grupo II: día 22, 8, 17, 5 y 15 postrasplante respectivamente. Un perro falleció al día 11 sin causa aparente (Tabla 1).

Grupo III: día 10, 8, 10, 7, 9 y 10 postrasplante respectivamente (Tabla 1).

Grupo IV, Se sometieron a eutanasia a los días 28, 15, 17 y 13 días postcirugía. Los otros dos animales de este grupo tuvieron una evolución clínica satisfactoria hasta los días 43 y 60 postcirugía que fue cuando se decidió someterlos a eutanasia (Tabla 1).

Grupo V: Se sometieron a eutanasia al día 10, 19, dos al día 7 postcirugía, uno al día 11 y el restante al día 13 (Tabla 1).

Grupo VI, se sometieron a eutanasia a los días 18, 12, 18, 16, 21 y 14 días postcirugía (Tabla 1).

Con respecto a la supervivencia, dentro de cada grupo no hubo diferencia significativa. Sin embargo, al comparar entre grupos el de trasplante de tráquea criopreservada sin inmunosupresión y sin VEGF (Grupo IV) mostró

mayor sobrevida que los otros grupos de estudio, la cual sólo fue estadísticamente significativa en comparación con los grupos I, II, III y V ($p < 0.05$ ANDEVA, TUKEY) (Tabla 1).

Al evaluar semanalmente (1-8) el grado de disnea dentro de cada grupo, posterior a la reconstrucción traqueal, no se observó diferencia alguna ($p = \text{NS}$, ANDEVA y TUKEY). Sin embargo, al compararla entre grupos, los animales del grupo IV fueron los que mostraron menor grado de disnea durante todo el estudio en comparación con los demás grupos ($p < 0.01$ Kruskal Wallis).

Tabla 1. Muestra la sobrevida de los perros sometidos a trasplante traqueal con aloinjertos traqueales liofilizados y criopreservados con y sin inmunosupresión

| Sobrevida de perros sometidos a trasplante de tráquea. | | | | | | |
|---|---------------------------|----------------------------|------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Grupos de Estudio | | | | | | |
| Animal Experimental | Grupo I TxTraLioSI | Grupo II TxTraLioCI | Grupo III TxTraLioCI + VEGF | Grupo IV TxTraCrioSI | Grupo V TxTraCrioCI | Grupo VI TxTraCrioCI + VEGF |
| 1 | 22 días | 22 días | 10 días | 28 días | 10 días | 18 días |
| 2 | 14 días | 8 días | 8 días | 43 días* | 19 días | 12 días |
| 3 | 11 días | 11 días | 10 días | 60 días* | 7 días | 18 días |
| 4 | 16 días | 17 días | 7 días | 15 días | 7 días | 16 días |
| 5 | 10 días | 5 días | 9 días | 17 días | 11 días | 21 días |
| 6 | 12 días | 15 días | 10 días | 13 días | 13 días | 14 días |

* $p < 0.05$ ANDEVA, TUKEY

TxTraLioSI: (Trasplante Tráquea Liofilizada Sin Inmunosupresión).

TxTraLioCI: (Trasplante Tráquea Liofilizada Con Inmunosupresión).

TxTraLioCI + VEGF (Trasplante Tráquea Liofilizada Con Inmunosupresión + VEGF)

TxTraCrioSI: (Trasplante Tráqueas Criopreservada Sin Inmunosupresión).

TxTraCrioCI: (Trasplante Tráqueas Criopreservada Con Inmunosupresión).

TxTraCrioCI + VEGF (Trasplante Tráqueas Criopreservada Con Inmunosupresión + VEGF.)

6.2. Evaluación radiológica

Radiográficamente inmediatamente después de la cirugía en todos los grupos se observó los sitios de las anastomosis traqueales sin anomalías aparentes, permeables y de buen calibre.

En los animales del **grupo I** en la segunda semana del estudio, 3 animales operados mostraron estenosis del injerto > al 50% en el día 9, 11 y 17 postrasplante, respectivamente. Los otros 3 animales mostraron enfisema subcutáneo y pérdida de la continuidad del injerto a los días 10, 12 y 16 postcirugía (Figura 6).

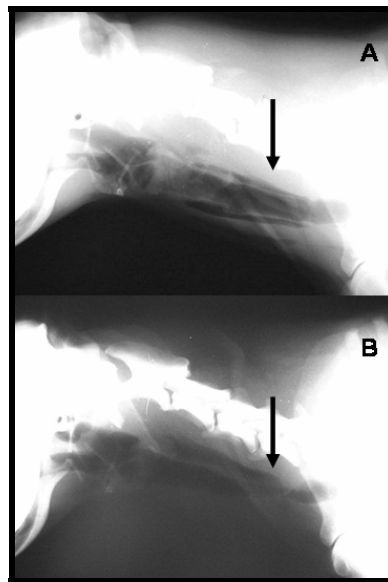


Figura 6. Radiografía lateral de cuello tomada inmediatamente después del trasplante en un animal del grupo I, en donde se observa (A) la luz traqueal completamente permeable (Flecha) y (B) la disminución de la luz del injerto (Flecha) al día 14 postrasplante.

En el **grupo II**, tres animales de este grupo presentaron estenosis mayor al 50% del injerto al día 3 postcirugía y pérdida de continuidad del injerto al día 5 y 8 postcirugía.

Los otros tres animales de experimentación de este grupo durante la primera semana postrasplante mostraron continuidad del injerto sin anomalías

aparentes y permeables en su totalidad. Estos animales mostraron enfisema subcutáneo y pérdida de la continuidad del injerto en el día 15, 17 y 22, postrasplante (Figura 7). El otro animal falleció al día 11 sin que los estudios radiológicos mostraran alteración alguna.

En general todos los animales de este grupo, mostraron estenosis del injerto > al 50% y pérdida de la continuidad de la tráquea en la segunda y tercer semana postcirugía.

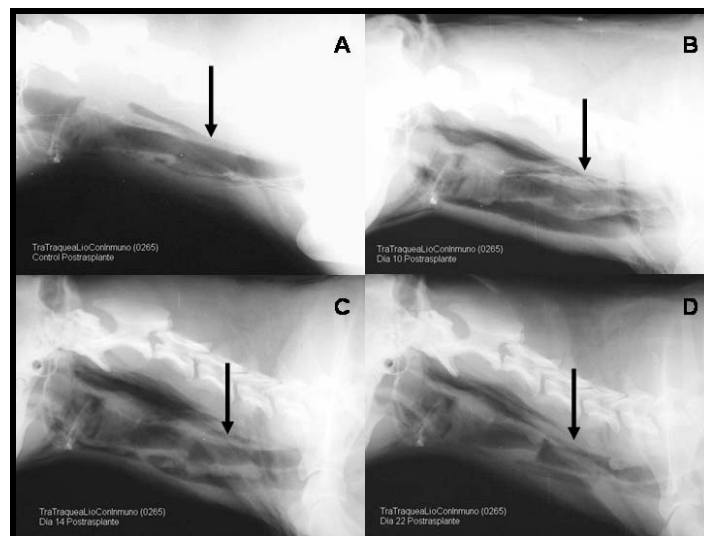


Figura 7. Placa radiográfica lateral de cuello del animal del grupo II que sobrevivió 22 días. (A) Inmediatamente postrasplante y (B) que muestran la luz del injerto traqueal completamente permeable (Flecha). (C) día 14 postrasplante, pérdida de la continuidad de la anastomosis proximal del injerto traqueal, disminución de la luz del mismo a nivel de la anastomosis distal y enfisema subcutáneo (Flecha). (D) al día 22 postrasplante se observa pérdida completa de la continuidad del injerto traqueal.

En los animales del **grupo III** los animales operados también mostraron estenosis del injerto > al 50% al día 7 postrasplante y pérdida de la continuidad del injerto en la segunda semana del estudio (día 10, 8, 10, 7, 9 y 10) (Figura 8).

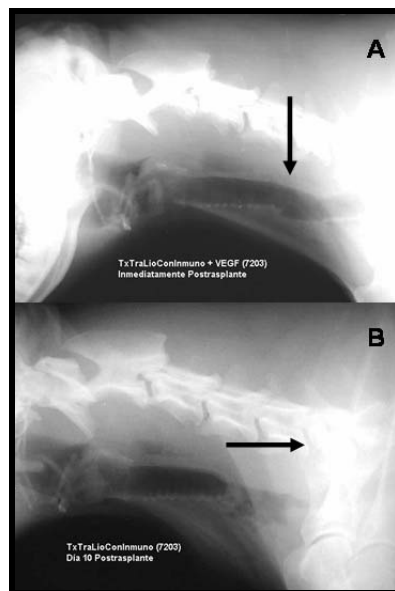


Figura 8. Radiografía lateral de cuello de un animal del grupo III. (A) injerto traqueal y la luz del mismo completamente permeable inmediatamente postrasplante(Flecha). (B) día 10 postrasplante se observó pérdida completa de la continuidad del injerto traqueal (Flecha).

En el **grupo IV**, 3 animales mostraron estenosis del injerto mayor al 50% y pérdida de la continuidad de la tráquea en la segunda semana del estudio, mientras que en otro animal la tráquea se mantuvo permeable hasta el día 18 y al día 28 mostró una estenosis del 90 %. En los dos perros restantes la tráquea se mantuvo permeable hasta que se decidió someterlos a eutanasia (Figura 9).

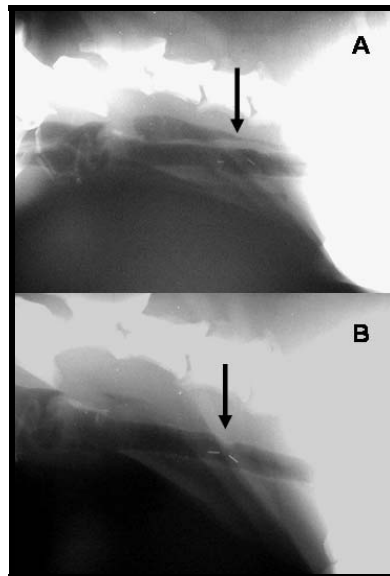


Figura 9. Rayos X laterales de cuello de un animal del grupo IV. (A) postrasplante inmediato y (B) día 42 muestran el injerto traqueal y la luz del mismo completamente permeable (Flecha).

En el **grupo V**, un animal al día 7 postcirugía presentó enfisema subcutáneo en región cervical anterior y estenosis del 30% en el sitio de ambas anastomosis. Otro animal mostró evolución radiológica satisfactoria hasta el día 16 postrasplante ya que al día 17 presentó enfisema subcutáneo, al día 19 enfisema subcutáneo y pérdida de la continuidad de la tráquea. Los 4 animales restantes de este grupo presentaron permeabilidad y buena continuidad de la tráquea hasta los días 3 y 4 postrasplante y al día 7 iniciaron con enfisema subcutáneo y pérdida de la continuidad de la tráquea (Figura 10).

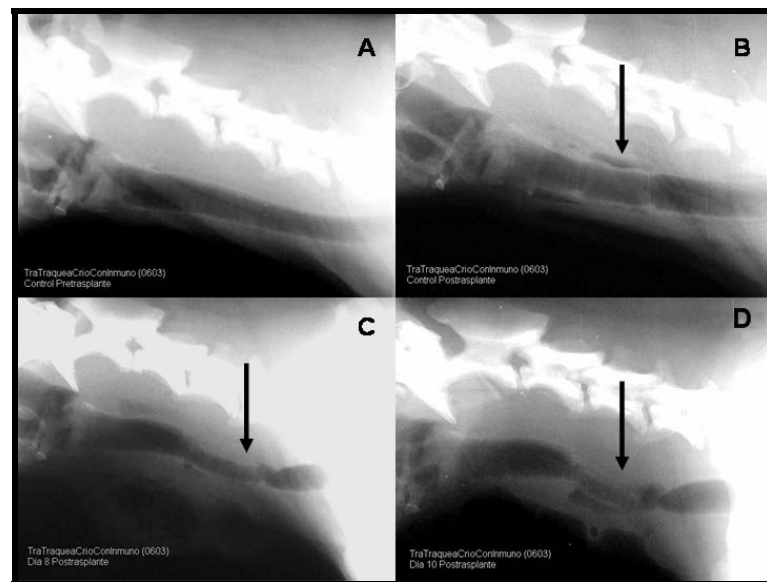


Figura 10. Placa radiográfica lateral de cuello (A) pretrasplante y (B) postrasplante inmediato de un animal del grupo V, que muestra la luz traqueal completamente permeable (Flecha). (C) día 7 y (D) día 10 postrasplante se observa disminución de la luz del injerto traqueal y pérdida de la integridad del mismo a nivel de la anastomosis distal (Flecha).

En el **grupo VI**, los perros de este grupo, presentaron permeabilidad y buena continuidad de la tráquea hasta el día 7 postrasplante y a partir del día 10 iniciaron con estenosis y pérdida de la continuidad de la tráquea a los días 18, 12, 18, 16 y 21 con presencia de enfisema subcutáneo en la región cervical.

Al realizar el análisis estadístico de los hallazgos encontrados por rayos X durante todo el tiempo de estudio, se observó que en el grupo III perdió la continuidad del injerto durante la primera y segunda semana del estudio y esto fue estadísticamente significativo (Kruskal Wallis $p < 0.01$, ANDEVA $p < 0.01$) al compararla entre grupos.

También se observó que hubo diferencia significativa de los dos animales del grupo IV que sobrevivieron 6 y 8 semanas, al compararlo dentro de su grupo como entre grupos. (Kruskal Wallis $p < 0.01$, ANDEVA $p < 0.01$). (Tabla 2).

Tabla 2. Muestra el número de animales por grupo de estudio, que mantuvieron permeable el injerto traqueal trasplantado, en su evaluación radiológica semanal

| Continuidad de la tráquea | | | | | |
|----------------------------------|-----------|------------|-----------|------------|------------|
| | 1ª Semana | 2ª. Semana | 3ª Semana | 6ª. Semana | 8ª. Semana |
| Grupo I | 6 | 2 | 0 | - | - |
| Grupo II | 4 | 3 | 0 | - | - |
| Grupo III | 0 | 0 | - | - | - |
| Grupo IV | 6 | 3 | 2* | 2* | 2* |
| Grupo V | 4 | 2 | 0 | - | - |
| Grupo VI | 6 | 4 | 0 | - | - |

* $p < 0.05$ ANDEVA,

* $p < 0.01$ Kruskal Wallis

6.3. Evaluación endoscópica

En todos los grupos inmediatamente después de la cirugía las anastomosis traqueales se observaron permeables en su totalidad y sin anomalías aparentes.

En todos los grupos al tercer día post cirugía los injertos se observaron isquémicos y sin presencia de tejido cicatrizal y se empezó a desarrollar a partir del 7 día postrasplante.

En el **grupo I** al día 7 los seis animales operados mostraron cicatrización de ambas anastomosis pero el injerto se encontraba isquémico e inflamado en los sitios de sutura. Al día 9 postcirugía, un animal mostró necrosis de la parte media del injerto, mientras que los otros la presentaron al día 10, 12, 14, 16 y 22 postcirugía. En todos los casos se observó desprendimiento de los cartílagos del injerto (lo que hacía que se observará estenosis en los rayos X) (Figura 11).

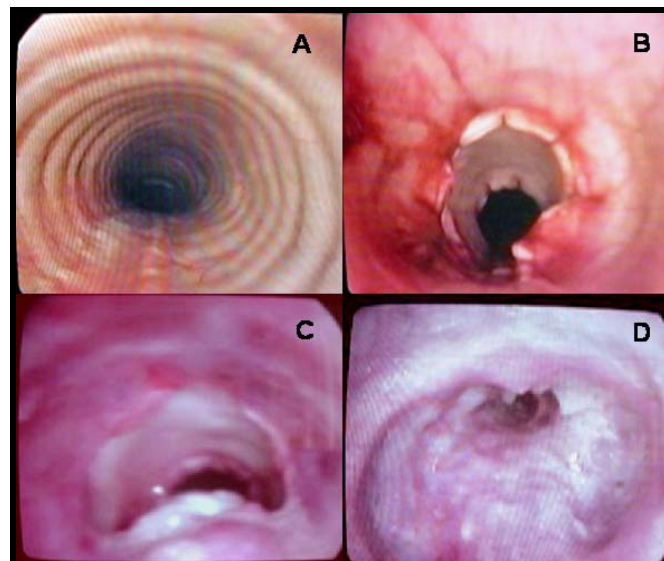


Figura 11. Traqueoscopia pretrasplante de tráquea del grupo I, que muestra la integridad de la tráquea sana (A). (B) ambas anastomosis postrasplante y el injerto completamente isquémico. (C) día 10 postrasplante ambas anastomosis completamente cicatrizadas y el injerto isquémico en su porción cartilaginosa. (D) día 22 se observan ambas anastomosis completamente cicatrizadas y la anastomosis distal con estenosis del 90%.

En el **grupo II**, cuatro de los animales mostraron buena cicatrización de ambas anastomosis al día 9 postcirugía y necrosis de la porción media del injerto al día 22, 11, 17 y 15. El perro que sobrevivió 22 días al final del estudio presentó desprendimiento de un anillo cartilaginoso a nivel de la anastomosis distal. Los otros dos animales mostraron dehiscencia de la anastomosis proximal y necrosis del injerto al día 8 y 5 (Figura 12).

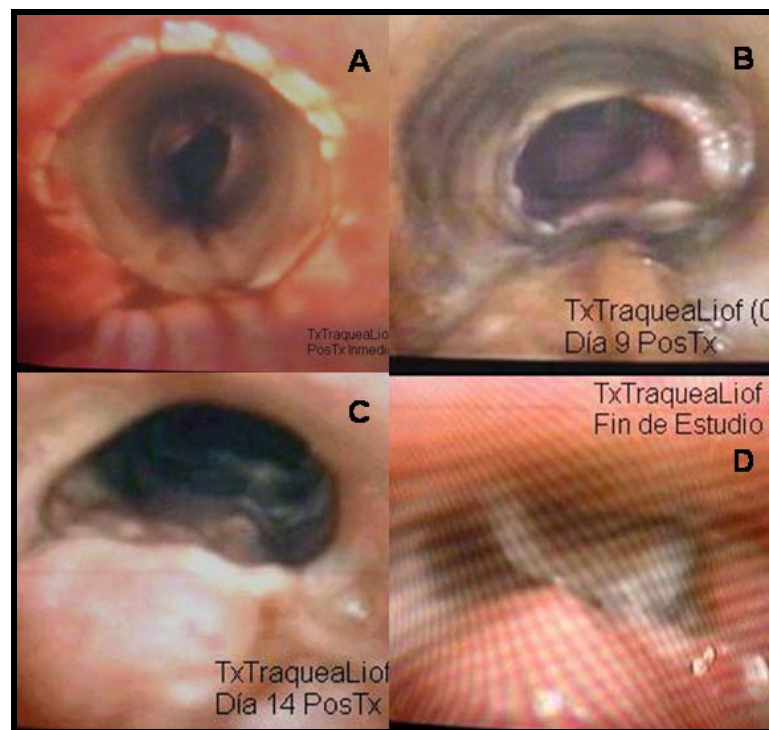


Figura 12. (A) endoscopía postrasplante de tráquea de un animal del grupo II, que muestra ambas anastomosis y la isquemia del injerto. (B) día 10, se observan ambas anastomosis completamente cicatrizadas postrasplante. (C) día 14, anastomosis completamente cicatrizadas y la presencia de inflamación en la porción membranosa. (D) día 22 postcirugía, se observan ambas anastomosis bien cicatrizadas y el desprendimiento de un cartílago traqueal a nivel de la anastomosis distal.

En el grupo **III**, los seis animales se observó dehiscencia de las anastomosis y el injerto necrótico entre los días 7 y 10. Un animal de este grupo mostró el desarrollo de una fístula en la porción membranosa del injerto a nivel de la anastomosis distal (Figura 13).

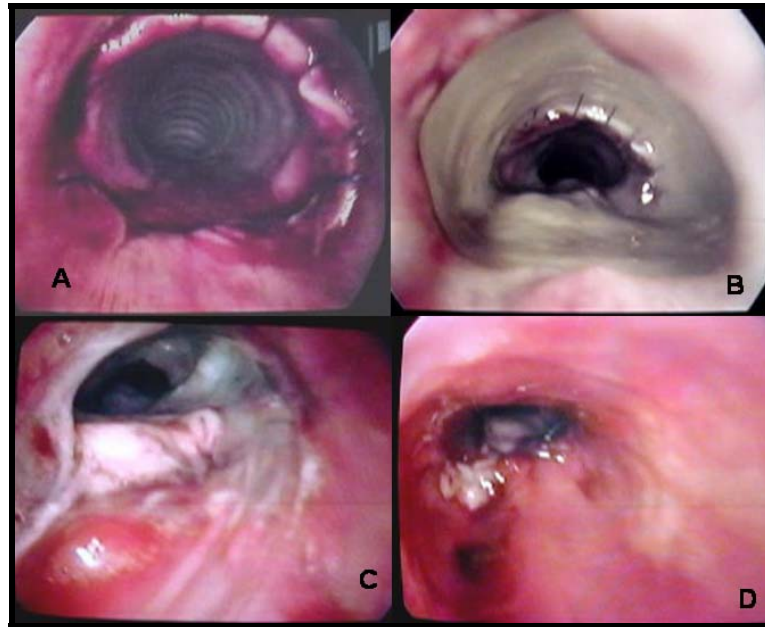


Figura 13. Traqueoscopia postrasplante inmediato (A) y (B) al día 3 postrasplante que muestran ambas anastomosis y el injerto completamente isquémico. (C) día 7 anastomosis proximal con dehiscencia y el injerto completamente isquémico. (D) día 10, estenosis y dehiscencia de la anastomosis distal, así como la fístula formada en la porción membranosa del injerto.

Tres de los animales del **grupo IV** mostraron buena cicatrización de ambas anastomosis al día 9 postcirugía y necrosis de la porción media del injerto al día 15, 17 y 13. Los tres animales de este grupo también mostraron cicatrización de las anastomosis al día 9 postcirugía, sin embargo la porción media del injerto se mantuvo isquémica hasta el día 18 sin sufrir necrosis y se desarrolló tejido fibroso sobre todo el injerto.

De estos animales uno tuvo que ser sometido a eutanasia al día 28 por que el desarrollo de tejido fibroso le produjo una estenosis del 90% del injerto. En otro animal al día 34 postrasplante presentó desprendimiento de un anillo

cartilaginoso y el injerto se necrosó al día 43. El otro perro mostró su injerto permeable hasta el día 60 (Figura 14).

Al parecer en estos tres animales el injerto se fue integrando a la tráquea nativa, debido a que fue disminuyendo su tamaño conforme fue avanzando el estudio.

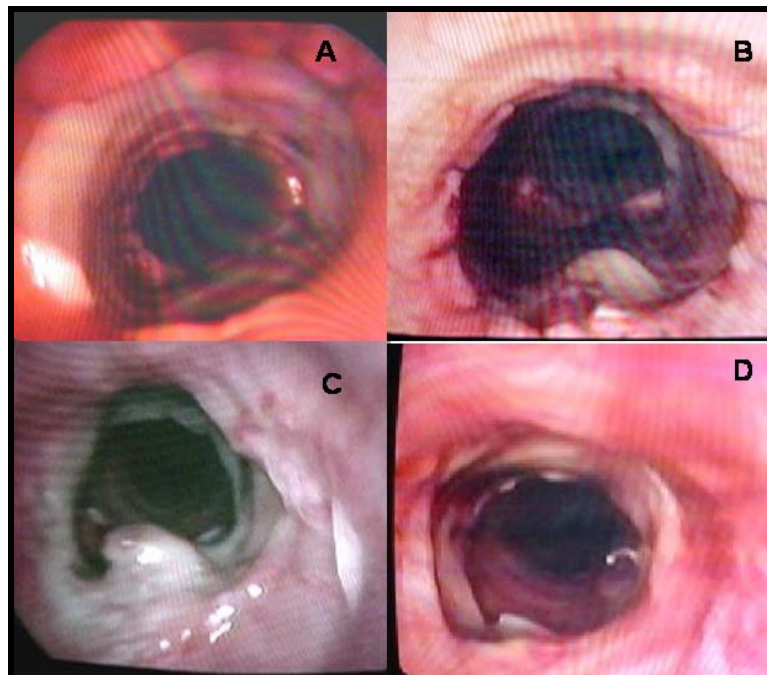


Figura 14. (A) Traqueoscopia postrasplante inmediato de un animal del grupo IV, en la que se observan ambas anastomosis y el injerto isquémico. (B) día 18 ambas anastomosis y el injerto con algunas zonas hemorrágicas. (C) día 25 postrasplante, ambas anastomosis bien cicatrizadas y el desarrollo de un pólipo sobre el injerto. (D) endoscopia al final del estudio en la que se muestra el injerto completamente permeable.

En el **grupo V** dos animales mostraron dehiscencia y estenosis del injerto durante la primera semana postcirugía. Tres animales mostraron cicatrización de ambas anastomosis al día 9 postrasplante pero los injertos se encontraban isquémicos y con algunas zonas de necrosis en su porción media, tanto a nivel del cartílago como de la zona membranosa. El animal restante también presentó cicatrización de ambas anastomosis al día 9 poscirugía, sin embargo, se observaba isquémico y al día 12 se observaron

zonas de necrosis en toda la luz del injerto y este mostró necrosis total al día 17 después de la cirugía (Figura 15).

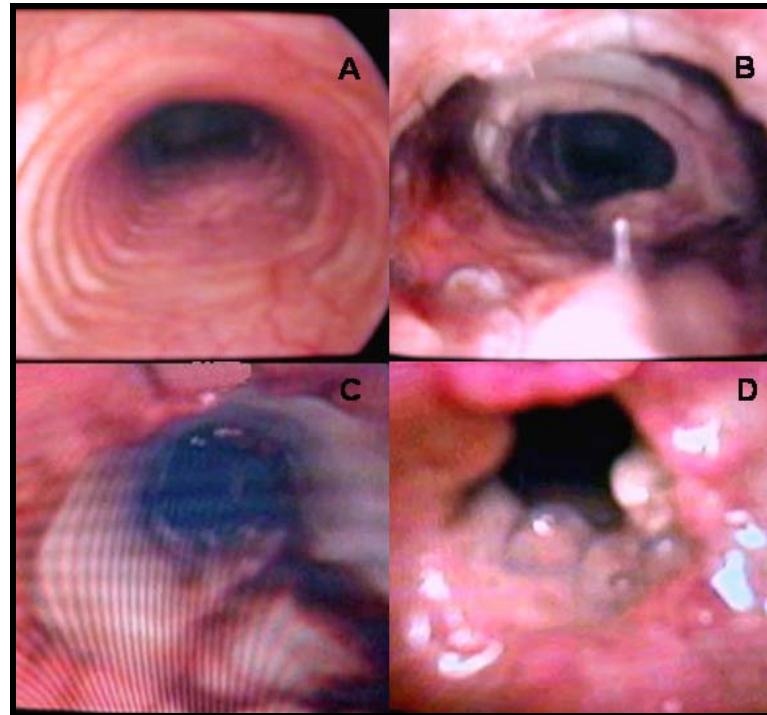


Figura 15. (A) traqueoscopia pretrasplante de un animal del grupo V. (B) día 9 postrasplante de tráquea, muestra ambas anastomosis bien cicatrizadas y el injerto isquémico. (C) día 12, ambas anastomosis bien cicatrizadas y el injerto isquémico. (D) día 19 postrasplante, se observa estenosis de la anastomosis proximal y la presencia de exudado purulento.

En el **grupo VI**, los seis animales de este grupo mostraron buena cicatrización y permeabilidad del injerto traqueal hasta el día 9 postx, aunque el injerto se encontraba completamente isquémico.

El injerto se observó necrótico a los días 18, 12, 18 16 y 21 días postrasplante.

En el perro que sobrevivió 21 días al día 15 se observó el desprendimiento de un cartílago de la anastomosis distal, el cual al día 21 provocó una estenosis del 95 % de la luz del injerto (Figura 16).

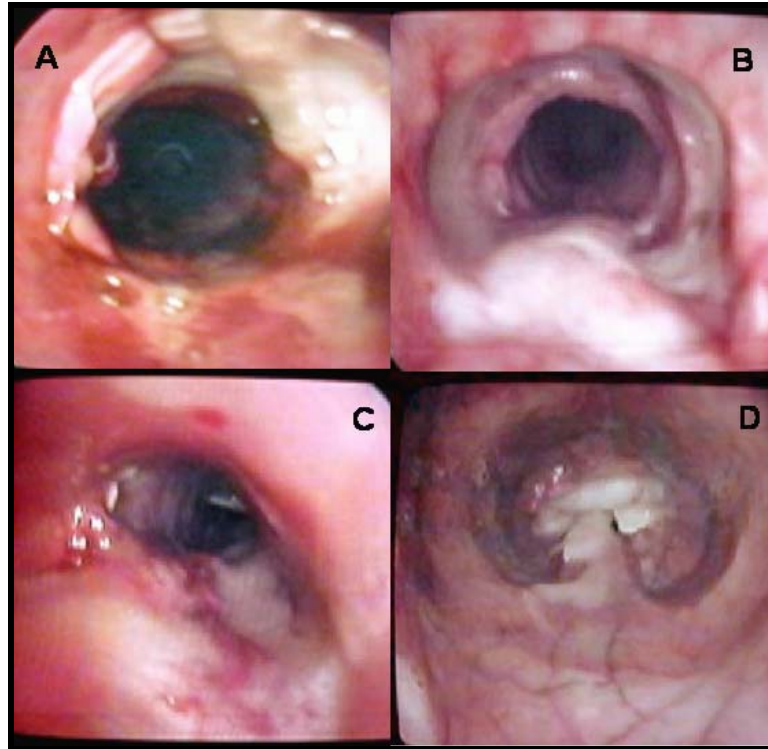


Figura 16. (A) Traqueoscopia postrasplante inmediato y (B) al 9no día postcirugía en un animal del grupo VI, en las que se observan ambas anastomosis y el injerto isquémico. (C) día 15 postrasplante, muestra ambas anastomosis bien cicatrizadas, el injerto isquémico y el desprendimiento de un cartílago en la anastomosis distal. (D) día 21 anastomosis proximal bien cicatrizada y el desprendimiento de un cartílago en la anastomosis distal, el cual provoco una estenosis del 100% de la luz traqueal.

Al realizar el análisis estadístico de la presencia de estenosis por endoscopia se observó que los animales del grupo III y V mostraron disminución de la luz traqueal durante la primer semana postcirugía (principalmente por desprendimiento de los anillos traqueales) y fue estadísticamente significativo al compararlo con los otros grupos de estudio (Kruskal Wallis $p < 0.01$). En la segunda y tercer semana aunque todos los grupos mostraron

disminución de la luz traqueal al compararla ésta no fue significativa ($p=NS$ Kruskal Wallis).

A la sexta y octava semana en los animales grupo III que sobrevivieron, la estenosis mostrada al compararla con los otros grupos de estudio fue significativa ($p<0.05$ Kruskal Wallis) (Tabla 3).

Tabla 3. Muestra la estenosis traqueal observada por endoscopia en todos los grupos durante todo el tiempo de estudio

| Estenosis traqueal por endoscopia | | | | | |
|--|-----------|------------|-----------|------------|------------|
| | 1ª Semana | 2ª. Semana | 3ª Semana | 6ª. Semana | 8ª. Semana |
| Grupo I | 0 | 3 | 0 | - | - |
| Grupo II | 3 | 2 | 0 | - | - |
| Grupo III | 6* | - | - | - | - |
| Grupo IV | 0 | 3 | 2* | 2* | 2* |
| Grupo V | 6* | - | 0 | - | - |
| Grupo VI | 0 | 0 | 0 | - | - |

* $p<0.05$ ANDEVA, TUKEY

6.4. Evaluación macroscópica

Una vez que los animales fueron sometidos a eutanasia los hallazgos fueron los siguientes: En todos los casos se observó inflamación severa de la herida quirúrgica (Figura 17).



Figura 17. Fotografía que muestra la inflamación de la herida quirúrgica en un animal del grupo V.

En el **grupo I**, en todos los casos hubo reducción del tamaño del injerto. Todas las anastomosis se observaron bien cicatrizadas pero la parte cartilaginosa de la tráquea se observó completamente necrótica. Dos de los tres animales operados presentaron estenosis del 70% de todo el injerto, dehiscencia de la anastomosis proximal y necrosis de todo el injerto con desprendimiento de anillos de cartílago en la anastomosis distal.

En los 6 animales del **grupo II**, se observó dehiscencia de las anastomosis, abundantes secreciones mucopurulentas y lisis total del injerto cuando fueron sometidos a eutanasia, de estos un animal mostró desprendimiento de los anillos traqueales al día 5 postrasplante (Figura 18) y otro al día 22.

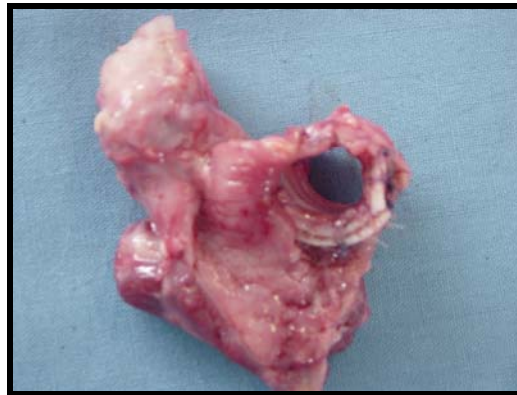


Figura 18. Fotografía que muestra la lisis total del injerto al quinto día postrasplante en un animal del grupo II.

En el **grupo III** en los seis animales se observó dehiscencia de las anastomosis y lisis total del injerto con formación de exudado purulento. Un animal desarrolló una fístula en la porción membranosa del injerto a nivel de la anastomosis distal.

Tres perros del **grupo IV** mostraron dehiscencia y el injerto completamente necrótico con formación de exudado purulento. Un animal presentó disminución del tamaño del injerto traqueal, pero presentó el desarrollo de una fibrosis excesiva en ambas anastomosis, principalmente en la distal la cual desarrolló una estenosis del 90%, la consistencia de la cicatriz era fuerte (Figura 19).

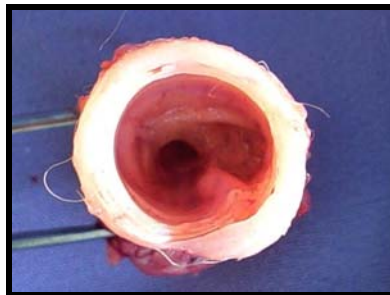


Figura 19. Fotografía que muestra el desarrollo de tejido fibroso en la luz del injerto traqueal en un animal del grupo IV, la cual produjo estenosis del 90%.

En otro animal que sobrevivió 43 días, mostró disminución del tamaño del injerto traqueal y desarrollo de tejido fibroso sobre ambas anastomosis, sin embargo esta fibrosis produjo disminución de la luz traqueal del 40%. Mientras que el perro que sobrevivió 60 días, disminuyó el tamaño del injerto, hubo formación de tejido fibroso sobre ambas anastomosis y la luz se mantuvo permeable en un 90% (Figura 20).



Figura 20. Fotografía que muestra la luz del injerto traqueal completamente permeable al final del estudio en un animal del grupo IV.

En el **grupo V** los dos animales que finalizaron su estudio durante la primera semana postcirugía mostraron dehiscencia y lisis total del injerto. Los otros 3 animales mostraron cicatrización de ambas anastomosis sin embargo al finalizar el estudio el injerto se observó completamente necrosado. El animal restante que sobrevivió 10 días presentó buena cicatrización en las dos anastomosis, sin embargo el diámetro del injerto se observó disminuido (Figura 21).



Figura 21. Fotografía que muestra la disminución del diámetro del injerto del animal del grupo V que sobrevivió 10 días.

Cuatro animales del **grupo VI** mostraron deshiscencia y necrosis del injerto al finalizar el estudio (Figura 22). En el perro que sobrevivió 21 días ambas anastomosis se encontraron bien cicatrizadas, sin embargo la porción media del injerto se necrosó y formó una fístula en la porción membranosa del injerto, así como el desprendimiento de los anillos cartilagosos (Figura 23).



Figura 22. Fotografía que muestra la lisis del injerto a los 18 días en un perro del grupo VI.

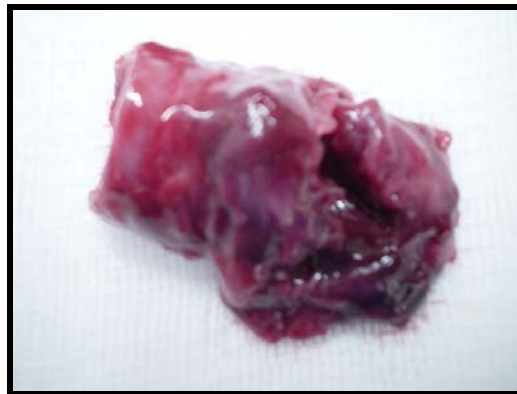


Figura 23. Fotografía que muestra la lisis y formación de una fístula en el del injerto del perro que sobrevivió 21 días.

En resumen se puede decir que en todos los grupos de estudio los injertos traqueales mostraron cicatrización de las anastomosis en la segunda semana postcirugía, a excepción del grupo III en la que no se presentó. Al realizar el análisis estadístico de estos hallazgos se observó que no hubo diferencia significativa al comparar dentro de cada grupo. ($p=NS$ Kruskal Wallis). Sin embargo, al compararlo entre grupos la falta de cicatrización en

el 100% de los animales del grupo III fue estadísticamente diferente. ($p < 0.01$ Kruskal Wallis) (Tabla 4).

Tabla 4. Muestra el tiempo de cicatrización de los injertos trasplantados en todos los grupos de estudio

| Cicatrización | | |
|----------------------|------------|------------|
| | 1ª. Semana | 2ª. Semana |
| Grupo I | 0 | 6 |
| Grupo II | 0 | 6 |
| Grupo III | 0 | 0* |
| Grupo IV | 0 | 6 |
| Grupo V | 0 | 6 |
| Grupo VI | 0 | 6 |

* $p < 0.01$ Kruskal Wallis

A pesar de que los injertos traqueales trasplantados se observaron cicatrizados, estos se mantuvieron isquémicos durante las primeras dos semanas posteriores al trasplante, a excepción de los animales del grupo VI en los que esta isquemia se mantuvo por tres semanas y esto fue estadísticamente significativo entre grupos ($p < 0.001$ Kruskal Wallis) (Tabla 5).

Tabla 5. Se observa la presencia de isquemia del injerto traqueal en todos los grupos, durante su sobrevida

| Isquemia del injerto | | | | |
|-----------------------------|-----------|------------|------------|-----------|
| | 1ª Semana | 2ª. Semana | 3ª. Semana | 6ª semana |
| Grupo I | 6 | 3 | 0 | 0 |
| Grupo II | 6 | 3 | 0 | 0 |
| Grupo III | 6 | 0 | 0 | 0 |
| Grupo IV | 6 | 3 | 3 | 0 |
| Grupo V | 6 | 4 | 1 | - |
| Grupo VI | 6 | 6* | 5* | - |

* $p < 0.001$ Kruskal Wallis

Con respecto a la presencia de necrosis de los injertos traqueales trasplantados se observó que en los grupos III y VI mostraron desprendimiento de los anillos cartilaginosos en la segunda y tercer semana postcirugía respectivamente a diferencia de los otros grupos de estudio en

los que la necrosis se presentó en diferentes tiempos del estudio. ($p < 0.05$ Kruskal Wallis) (Tabla 6).

Tabla 6. Se aprecia la producción de necrosis en los animales a los que se les colocó un injerto traqueal ya sea liofilizado o criopreservado

| Necrosis del injerto | | | | |
|-----------------------------|-----------|------------|------------|-----------|
| | 1ª Semana | 2ª. Semana | 3ª. Semana | 6ª semana |
| Grupo I | 0 | 4 | 2 | 0 |
| Grupo II | 1 | 2 | 3 | 0 |
| Grupo III | 0 | 6* | 0 | 0 |
| Grupo IV | 0 | 1 | 3 | 1 |
| Grupo V | 2 | 3 | 1* | - |
| Grupo VI | 0 | 1 | 5 | - |

* $p < 0.01$ Kruskal Wallis

6.5. Evaluación histológica por Microscopía de Luz

Epitelio:

- a) **Anillos Control (Pre-Criopreservación, Pre-Liofilización y Tráquea Nativa del Receptor):** El epitelio se observó en su mayoría normal sin alteraciones, conservado con cilios. En algunos anillos se observaron zonas con desprendimiento parcial o total del epitelio atribuibles a la manipulación del tejido traqueal (Figura 24). (Tabla 7).

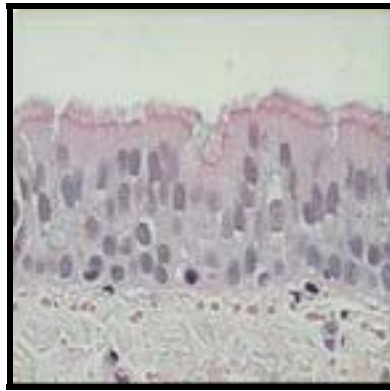
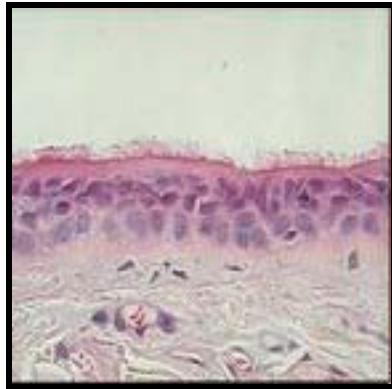
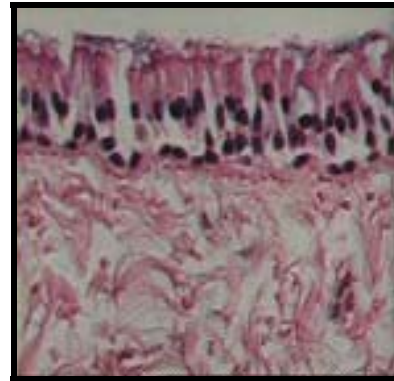


Figura 24. Epitelio (Anillos Control) (40X, H&E)

b) Anillos obtenidos en forma posterior a la preservación (Post-Liofilización y Post-Criopreservación) y en forma previa a la reconstrucción traqueal: En general, la liofilización provocó desprendimiento parcial o total del epitelio con pérdida de la estructura ciliar en la mayoría de los anillos, en comparación con la criopreservación en donde a pesar de que en algunos anillos se observaron zonas con desprendimiento parcial o total del epitelio, este se mantuvo en su mayoría normal sin alteraciones, conservado con cilios (Figura 25 A,B). (Tabla 7).

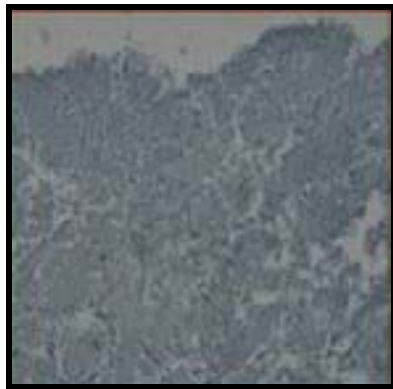


A
Figura. 25 Epitelio Post-Liofilización
(40X, H&E)



B
Epitelio Post-Criopreservación
(40X, H&E)

c) Anillos de fin de estudio obtenidos en forma posterior a la reconstrucción traqueal (Post-Tx Liofilizados y Post-Tx Criopreservados): En forma posterior a la reconstrucción traqueal, independientemente de que esta se realizara con injertos traqueales liofilizados o criopreservados, los anillos traqueales presentaron en general, grandes zonas con pérdida total casi total del epitelio, con mantenimiento de escasas células epiteliales de la capa basal. Sin embargo, cuando la reconstrucción se realizó con injertos traqueales liofilizados se observó una franca alteración en la captación de la tinción (Figura 26 A,B). (Tabla 7).



A
Figura 26. Epitelio Fin de Estudio
Aloinjertos Liofilizados
(40X, H&E)



B
Epitelio Fin de Estudio
Aloinjertos Criopreservados
(40X, H&E)

Glándulas:

a) Anillos Control (Pre-Criopreservación, Pre-Liofilización y Tráquea Nativa del Receptor): Las glándulas serosas y mucosas se observaron con la estructura normal sin alteraciones, con mantenimiento del lumen, de las células epiteliales y la presencia de moco (Figura 27). (Tabla 7).

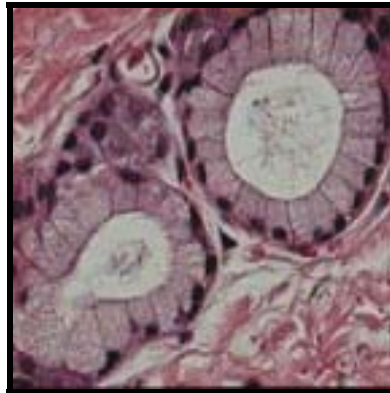
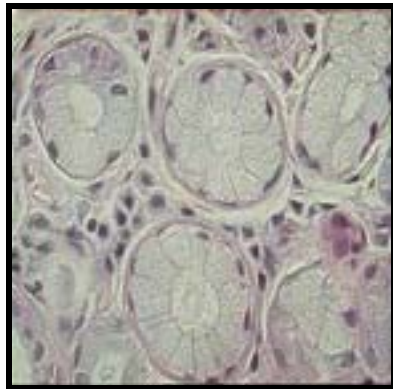
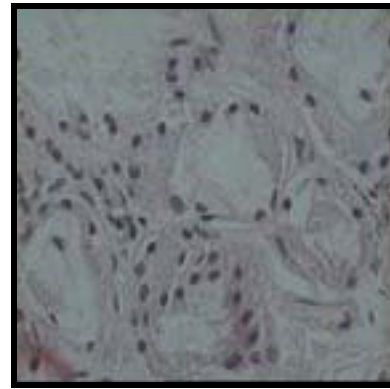


Figura 27. Glándulas (Anillos Control) (40X, H&E)

b) Anillos obtenidos en forma posterior a la preservación (Post-Liofilización y Post-Criopreservación) y en forma previa a la reconstrucción traqueal: En general, la estructura glandular se mantuvo sin alteraciones aparentes por efecto de la liofilización, no así por efecto de la criopreservación. La criopreservación provocó daños en la estructura glandular, las glándulas se observaron dilatadas con alteraciones en la integridad estructural característica (Figura 28 A,B). (Tabla 7).

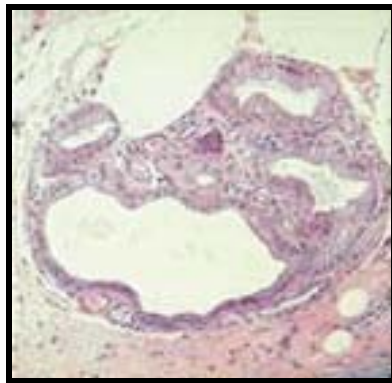


A
Figura 28. Glándulas Post-Liofilización
(40X, H&E)



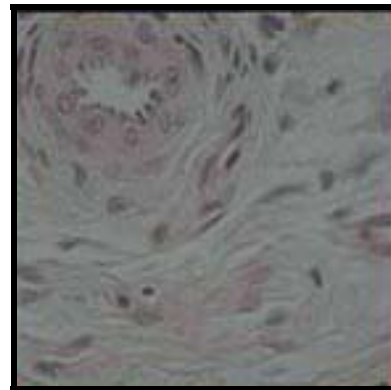
B
Glándulas Post-Criopreservación
(40X, H&E)

c) Anillos de fin de estudio obtenidos en forma posterior a la reconstrucción traqueal (Post-Tx Liofilizados y Post-Tx Criopreservados): En forma posterior a la reconstrucción traqueal, independientemente de que esta se realizara con injertos traqueales liofilizados o criopreservados, las glándulas se observaron con francas alteraciones en la integridad estructural, en general dilatadas con pérdida de las células epiteliales y cambios moderados en la captación de la tinción (Figura 29 A,B). (Tabla 7).



A

Figura 29. Glándulas Fin de Estudio
Aloinjertos Liofilizados
(40X, H&E)



B

Glándulas Fin de Estudio
Aloinjertos Criopreservados
(40X, H&E)

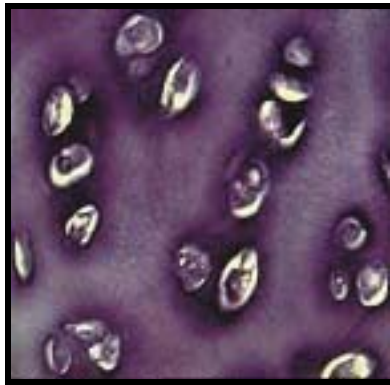
Cartílago:

- a) Anillos Control (Pre-Criopreservación, Pre-Liofilización y Tráquea Nativa del Receptor):** El cartílago se observó normal, sin alteraciones, con condrocitos nucleados, algunas lagunas vacías, mantenimiento de los grupos isógenos y con la matriz extracelular bien delimitada (Figura 30). (Tabla 7).



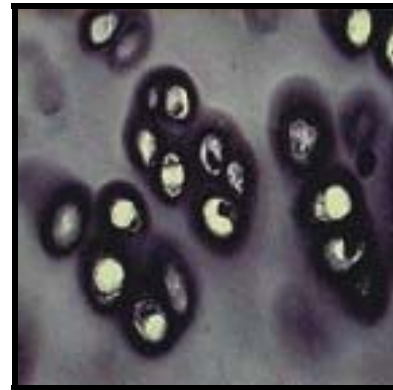
Figura 30. Cartílago (Anillos Control) (40X, H&E)

b) Anillos obtenidos en forma posterior a la preservación (Post-Liofilización y Post-Criopreservación) y en forma previa a la reconstrucción traqueal: En forma posterior a la preservación traqueal, independientemente de que esta se realizara mediante liofilización o criopreservación, a pesar de que el cartílago se apreció con mantenimiento de los grupos isógenos, los condrocitos aunque conservan el núcleo se observaron colapsados. La liofilización y la criopreservación generaron alteraciones en la captación del colorante que resultaron ser más obvias por efecto de la criopreservación en donde se apreció hipotinción general del cartílago con hipertinción de la matriz extracelular (Figura 31 A,B). (Tabla 7).



A

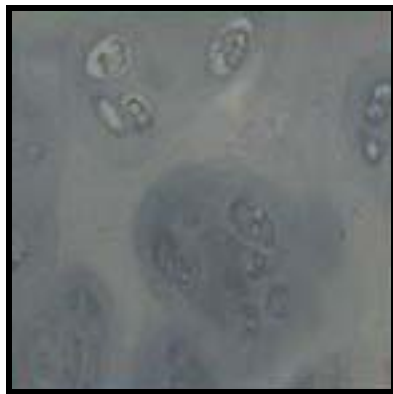
Figura 31. Cartílago Post-Liofilización
(40X, H&E)



B

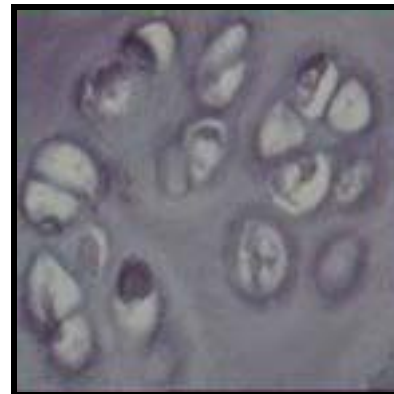
Cartílago Post-Criopreservación
(40X, H&E)

c) Anillos de fin de estudio obtenidos en forma posterior a la reconstrucción traqueal (Post-Tx Liofilizados y Post-Tx Criopreservados): En forma posterior a la reconstrucción traqueal con aloinjertos de tráquea liofilizada o criopreservada, en general se observó degeneración del cartílago con francas alteraciones en la integridad estructural de los condrocitos y en la captación del colorante, sin embargo, estas alteraciones fueron más agudas cuando se utilizaron los aloinjertos liofilizados en comparación con los criopreservados (Figura 32 A,B). (Tabla 7).



A

Figura 32. Cartílago Fin de Estudio Aloinjertos Liofilizados(40X, H&E)



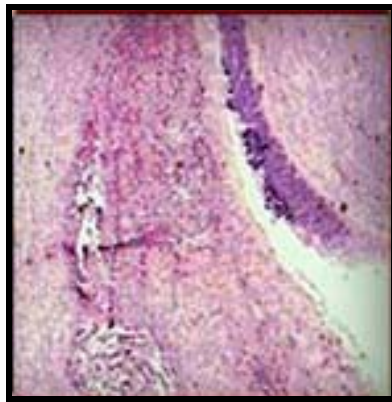
B

Cartílago Fin de Estudio Aloinjertos Criopreservados(40X, H&E)

Hallazgos generales aunados al mantenimiento de la integridad estructural del epitelio, de las glándulas y del cartílago traqueal por efecto de la liofilización y de la criopreservación: A la evaluación histológica por microscopía de luz, a) Los injertos traqueales liofilizados presentaron retracción del tejido conectivo por efecto de la liofilización, b) En forma posterior a la reconstrucción con aloinjertos traqueales liofilizados o criopreservados, en general en todos los grupos de estudio se presentó aunque en diferentes grados: inflamación, congestión, hemorragia, necrosis, áreas focales de calcificación y depósitos de colágena con degeneración del cartílago, sin embargo, estos hallazgos fueron más pronunciados cuando se

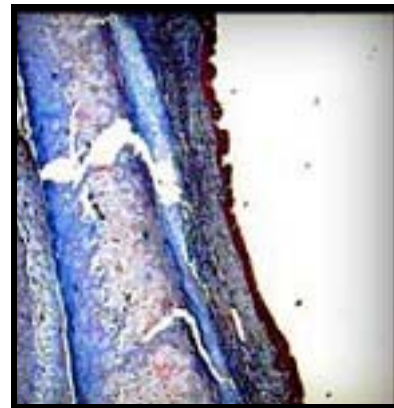
utilizaron aloinjertos liofilizados independientemente de la terapia inmunosupresora o de la aplicación del VEGF en comparación con la utilización de aloinjertos criopreservados y fueron menos evidentes cuando se utilizaron aloinjertos criopreservados sin la administración de una terapia inmunosupresora y sin la aplicación del VEGF (Grupo IV), c) Los aloinjertos traqueales criopreservados de los animales del grupo IV mostraron regeneración del epitelio con integridad del músculo liso y de las fibras de colágena además de un desarrollo importante de vasos de neoformación.

Fin de Estudio: Hallazgos Histológicos por Microscopía de Luz: Inflamación, congestión, hemorragia, fibrosis y necrosis principalmente en la lámina propia, alteración en las glándulas, áreas focales de calcificación y depósito de colágena. Regeneración del epitelio con destrucción y/o degeneración del cartílago (Figura 33 A,B). (Tabla 8).



A

Figura 33. Fin de Estudio
Aloinjertos Liofilizados
(40X, H&E)



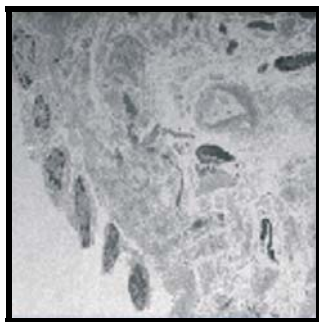
B

Fin de Estudio
Aloinjertos Criopreservados
(40X, H&E)

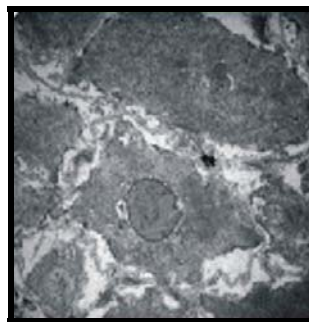
6.6. Evaluación histológica por Microscopía Electrónica

En general, con excepción de los anillos control (Pre-Criopreservación, Pre-Liofilización y Tráquea Nativa del Receptor), los hallazgos encontrados por microscopía electrónica revelaron: pérdida parcial o total del epitelio ciliado, destrucción del cartílago en donde se observaron lagunas con los condrocitos totalmente colapsados, sin núcleo, sin organelos y con pérdida parcial de la matriz extracelular (Figura 34-37). (Tabla 8).

Epitelio (6200X)



A
Figura 34 Control

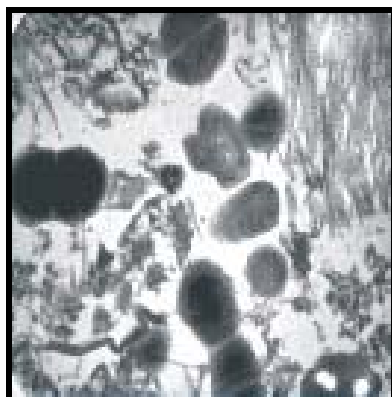


B
Post-Liofilización

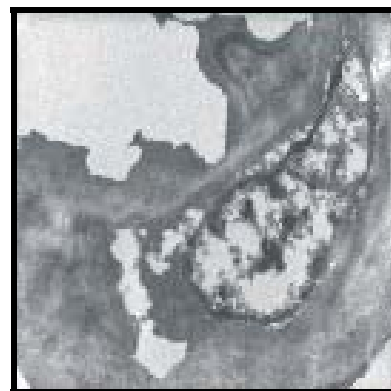


C
Post-Criopreservación

Epitelio (6200X)



A
Figura 35. Fin de Estudio
Aloinjertos Liofilizados



B
Fin de Estudio
Aloinjertos Criopreservados

Cartílago (6200X)



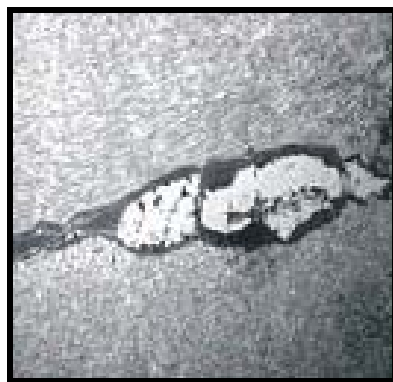
A
Figura 36. Control



B
Post-Liofilización



C
Post-Criopreservación



A
Figura 37. Fin de Estudio
Aloinjertos Liofilizados



B
Fin de Estudio
Aloinjertos Criopreservados

Tabla 7. Hallazgos Histológicos: Mantenimiento de la estructura traqueal por efecto de la preservación

| Sin alteraciones | Epitelio* | Glándulas | Cartílago | Lámina propia |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|---------------|
| Pre- Preservación | | | | |
| Criopreservación | 18/18 | 18/18 | 18/18 | 18/18 |
| Liofilización | 18/18 | 18/18 | 18/18 | 18/18 |
| Post- preservación | | | | |
| Criopreservación | 18/18 | 0/18** | 18/18*** | 18/18 |
| Liofilización | 18/18 | 18/18 | 18/18*** | 0/18**** |

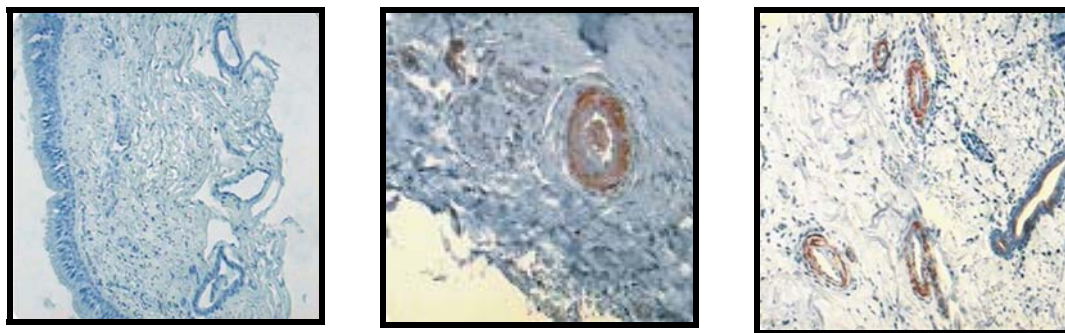
* Epitelio conservado sin importar el desprendimiento del mismo: En todos los anillos traqueales, el epitelio se observó conservado, con cilios independientemente de que se presentaron zonas con desprendimiento parcial o total del epitelio que se atribuyen por la manipulación de las muestras para su procesamiento. ** La criopreservación y la liofilización provocan sin importar el grado, pérdida del mantenimiento de la estructura traqueal. *** Condrocitos colapsados por efecto de la liofilización y alteraciones en la captación del colorante al realizar la tinción por efecto de la criopreservación. ****Retracción del tejido conectivo en la lámina propia.

Tabla 8. Hallazgos Histológicos: Fin de Estudio

| | GRUPO I | GRUPO II | GRUPO III | GRUPO IV | GRUPO V | GRUPO VI |
|---|---------|----------|-----------|----------|---------|----------|
| Sin muestra (lisis) | 5/6 | 5/6 | 6/6 | 0/6 | 3/6 | 4/6 |
| Necrosis (áreas focales) | 0/1 | 0/1 | | 3/6 | 3/3 | 2/2 |
| Necrosis (en todas las estructuras y bacterias) | 1/1 | 1/1 | | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| Inflamación (aguda y crónica en todas las áreas predominante en lámina propia) | 1/1 | 1/1 | | 6/6 | 3/3 | 2/2 |
| Cambios degenerativos en el cartílago con calcificaciones focales | 1/1 | 1/1 | | 2/6 | 3/3 | 2/2 |
| Hemorragia y Edema en lámina propia | 1/1 | 1/1 | | 1/6 | 3/3 | 2/2 |
| Depósito de colágena | | | | 5/6 | 1/3 | 1 / 2 |

6.7. Evaluación angiogénica

En el grupo control no se utilizó VEGF (A), en el grupo de injerto de tráquea liofilizada presentó menor número de vasos y el tejido se observa poco conservado primordialmente el epitelio (B). Asimismo, observamos que en el grupo de injerto traqueal criopreservado de fin de estudio se cuantificó el mayor número de vasos de novo-formación en un tejido estructuralmente conservado (C) (Figura 38 A,B,C).

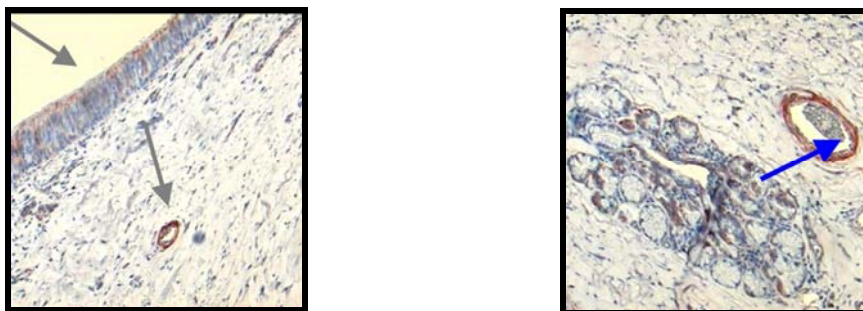


A
Figura 38. Control negativo

B
Injerto de tráquea liofilizada

C
Injerto traqueal
criopreservado
Fin de estudio. Vasos

La mayor detección de VEGF por inmunohistoquímica se encontró en los aloinjertos traqueales criopreservados post-reconstrucción sugiriendo mayor actividad de angiogénesis que correlaciona con una vascularización más significativa en el tejido (Figura 39 A,B)



A
Figura 39. Injerto traqueal criopreservado
Fin de estudio
Epitelio conservado. (40X)

B
Injerto traqueal criopreservado
Fin de estudio
Glándulas conservadas. (40X)

Al comparar el número de vasos sanguíneos en las muestras de tráqueas antes de la preservación y post-preservación, así como antes de que fueran utilizadas para su reconstrucción no fue diferente dentro de cada grupo y entre grupos. ($p=NS$ ANDEVA y TUKEY) No obstante, al comparar al final del estudio la cantidad de vasos sanguíneos formados en todos los grupos de estudios fue significativamente menor en relación a los observados en los injertos antes de la reconstrucción ($p<0.001$, ANDEVA y TUKEY).

Finalmente al comparar la cantidad de vasos sanguíneos formados al final del estudio se observó que los animales del grupo IV desarrollaron mayor cantidad de éstos, en comparación con los grupos I, II, III, V y VI ($p<0.01$) (Tabla 9).

Tabla 9. Número total de vasos: Pre-preservación, pre y postrasplante

| Determinación Inmunohistoquímica (VEGF) | | | |
|--|----------------------|--------|-------------|
| Grupo de Estudio | Pre-Liofilización | Pre-Tx | Post-Tx |
| I (n=6) | 4 | 0 | 28 (n=1)* |
| II (n=6) | 4 | 0 | 0 (n=1)* • |
| III (n=6) | 4 | 0 | 0 (n=1)* • |
| | | | |
| Grupo de Estudio | Pre-Criopreservación | Pre-Tx | Post-Tx |
| IV (n=6) | 12 | 1 | 195 (n=6)** |
| V (n=6) | 0 | 0 | 0 (n=2)* • |
| VI (n=6) | 14 | 0 | 31 (n=3)* |

• Sin muestras completas por lisis o necrosis.

** ANDEVA+Tukey: $p<0.05$

7. DISCUSIÓN

En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias asisten a consulta pacientes con patología traqueal en un número aproximado de 100 enfermos por año. La gran mayoría se trata de estenosis post-intubación y además neoplasias y malacias.

En el mayor número de casos el tratamiento consistió en resección de la estenosis o de la neoformación con anastomosis término-terminal y en algunos otros pacientes la dilatación de la estenosis con broncoscopio rígido o con la colocación de stent.

Sin embargo, en un grupo de pacientes no es posible, por la extensión de la estenosis o de la neoformación, realizar anastomosis término-terminal. Esto ha originado que se investigue la factibilidad, de trasplante de tráquea o la aplicación de diferentes tipos de prótesis.

Este estudio examina la evolución clínica, radiológica, endoscópica, macroscópica, microscópica (de luz y electrónica) y angiogénica de los injertos traqueales liofilizados y/o criopreservados con aplicación de factor de crecimiento del endotelio vascular, inmunosupresores, ya sea, juntos o separados estos dos últimos.

Clínicamente se consideraron dos signos: disnea y estridor. Tanto uno como el otro se deben a trastornos de la ventilación, es decir, a obstrucción de la vía de conducción del aire de gran calibre, causada por inflamación, formación de tejido de granulación, necrosis o dehiscencia. En todos los grupos, después de la primera semana, se presentaron estos signos, excepto en dos sujetos de estudio del grupo IV, en los que no se observó esta signología durante el estudio.

Desde el punto de vista radiográfico, se juzgaron tres imágenes: estenosis, enfisema subcutáneo y continuidad de los bordes traqueales.

De los seis grupos, sólo dos sujetos del grupo cuatro no presentaron estenosis ni enfisema subcutáneo y la continuidad de los bordes traqueales persistió.

Los datos broncoscópicos correlacionan tanto con la signología observada, como con las imágenes radiográficas. Endoscópicamente, en general, se vio, inflamación, isquemia, desprendimiento de cartílago, estenosis, necrosis, dehiscencia, tejido de granulación y a nivel de algunas anastomosis buena cicatrización. Es de apuntar que donde se observaba necrosis era en la porción media del injerto.

La signología y las imágenes radiográficas y endoscópicas se presentaron a la segunda semana post-trasplante. Prácticamente la evolución post-trasplante durante la primera semana fue satisfactoria.

Nuevamente, los dos animales del grupo IV, con buena evolución clínica y radiográfica, endoscópicamente mantuvieron el calibre de la tráquea, hasta el fin del estudio.

Se ha observado en este estudio, como en otros, que a la semana post-trasplante hay formación de tejido de granulación y necrosis.⁴

Lenot²⁵ reportó en un estudio en cerdos con trasplante de tráqueas liofilizadas una sobrevivencia de 19.5 ± 7.8 días, y el estudio anatomopatológico mostró necrosis tisular y fuga aérea en el sitio de la anastomosis.⁶⁶

La observación macroscópica, de las piezas quirúrgicas, mostraron, estenosis, dehiscencia, desprendimiento de anillos traqueales, secreción purulenta, necrosis, fibrosis, tejido de granulación, salvo los dos animales del grupo cuatro, que presentaban tejido fibroso a nivel de las anastomosis, pero con permeabilidad del 90%.

Se realizó evaluación histológica por microscopía de luz en los siguientes momentos:

Pre-criopreservación, pre-liofilización y tráquea nativa del receptor.- en la gran mayoría se observó en los diferentes cortes que no había alteraciones importantes.

En los cortes histológicos post-liofilización y post-criopreservación se observó parcialmente desprendimiento del epitelio en ambos métodos, pero menos alteraciones en el material criopreservado.

En los cortes histológicos post-tratamiento, en los liofilizados como en los criopreservados había grandes zonas con pérdida total del epitelio. Es de notar que en los injertos liofilizados había una franca alteración en la captación de la tinción.

En cuanto a las glándulas del epitelio tanto en los injertos liofilizados como en los criopreservados se encontró alteraciones estructurales.

En relación al cartílago post-preservación los condrocitos conservaban el núcleo pero se visualizaban colapsados.

En el post-tratamiento se encontraron alteraciones muy importantes de condrocitos, siendo más importantes en los injertos liofilizados, se ha descrito

en diferentes artículos las características histológicas antes y después de tráqueas criopreservadas transplantadas.^{67,21}

Los hallazgos de microscopía electrónica revelaron pérdida parcial del epitelio ciliado y destrucción del cartílago.⁶⁸

La evaluación angiogénica por medio de inmunohistoquímica (número total de vasos) mostró que dos animales del grupo IV presentaron un aumento importante en el número de vasos.

Después de examinar toda esta información y datos bibliográficos, en estos resultados inciden varios factores. Como es conocido, el complejo principal de histocompatibilidad (CPH) se descubrió cuando se realizaban experimentos de rechazo en injertos de piel.

La función del CPH es presentar el antígeno a las células T. Las células T reconocen moléculas ajenas por lo que origina todo el proceso de rechazo, que en nuestros grupos de estudio se confirmó a pesar del tratamiento inmunológico.

El tratamiento inmunológico utilizado produce disminución en la síntesis de linfocitos, pero desafortunadamente la ciclosporina provoca vasculopatía y si a esto se agrega que interfiere en la angiogénesis, siendo muy necesaria para el injerto, es otra razón poderosa para inferir que los hallazgos encontrados tanto en broncoscopía, como en anatomía patológica sean debido a que la ciclosporina produce vasculopatía y además que frena la función angiogénica como lo describe Rafiee.⁶⁹ Este autor en cultivo de células endoteliales microvasculares del intestino humano ha demostrado que la ciclosporina afecta in vitro cuatro factores de la angiogénesis: ensamblaje de fibras, migración, proliferación y formación de tubo.

Actualmente se investiga con intensidad sobre angiogénesis en cáncer, los investigadores tratan de inhibir la angiogénesis para evitar las metástasis. En cambio otros, estudian como incrementar la formación de vasos en los múltiples padecimientos en que el punto cardinal es la isquemia.

En nuestro estudio sobran datos en que la degradación del injerto es debido a la falta de circulación sanguínea.

La conjugación de isquemia y de los factores de rechazo explican los resultados obtenidos en los diferentes grupos.

Se debe señalar que en un sujeto de investigación criopreservado, y como se ha demostrado, este método disminuye la antigenicidad y el aumento en el número de vasos causado por el factor del crecimiento del endotelio vascular (dos animales del grupo IV) fue en donde se obtuvieron los mejores resultados.

Diferentes artículos hablan del tiempo ideal de criopreservación de tejidos para ser trasplantados y además, utilizar otro tipo de inhibidor de la calcineurina para mejorar los resultados del reemplazo de la tráquea.

Desde hace varias décadas se ha investigado cómo resolver traqueopatías, principalmente cáncer de este órgano.

En un artículo de revisión Grillo,⁴ dice que se han realizado múltiples esfuerzos para la sustitución exitosa de la tráquea.

Belsey⁷⁰ describe los requerimientos para poder reemplazar la tráquea: que sea lateralmente rígida y longitudinalmente flexible y que en la superficie

tenga epitelio respiratorio ciliado aunque, éste último no es esencial. Asimismo el conducto debe ser impermeable, que se integre a tejidos adyacentes y que no ocurra tejido de granulación, infección o erosión. También que no haya necesidad de inmunosupresión porque la principal razón de la sustitución será el cáncer.

Jackson⁷¹ agrega que el injerto debe ser no tóxico, no carcinogénico, no inmunogénico.

Grillo describe los diferentes métodos que se han realizado desde hace varios años:

1. Experimentos de materiales extraños con muchas modificaciones técnicas para evitar complicaciones.
2. Implantación de tejidos no viables.
3. Adaptación y transferencia de tejidos autógenos con y sin materiales extraños como parches o tubos.
4. Ingeniería de tejidos.
5. Trasplante de injertos con y sin inmunosupresión.

Analiza los reportes de todos estos procedimientos, y desafortunadamente en un alto porcentaje los resultados no han sido satisfactorios y concluye que en relación a la irrigación sanguínea del injerto se han esclarecido que la vascularización es muy importante, que la criopreservación es un método que disminuye la antigenicidad y que en este procedimiento se pueden evitar los inmunosupresores.

Al final del artículo menciona que las limitaciones de este tratamiento y la solución para lesiones extensas de la tráquea (estenosis y neoplasias), es remota.

Vale la pena añadir de que si solamente el proceso de rechazo puede ser manejado, está justificado el injerto traqueal. Realizar este procedimiento es para mejorar la calidad de vida y no para salvar la vida.

Los resultados en conjunto de esta investigación concuerdan con determinados estudios,^{25,4} por lo que en un futuro se investigará la viabilidad del injerto en diferentes tiempos de criopreservación.

8. CONCLUSIONES

Utilizando un modelo experimental canino de reconstrucción traqueal de 10 anillos, los injertos criopreservados mostraron mayor utilidad y funcionalidad que los injertos liofilizados. Los animales en los que se realizó el implante con injertos criopreservados, sin la administración de tratamiento inmunosupresor y sin la aplicación del VEGF mostraron mayor tiempo de sobrevivencia, continuidad y permeabilidad del aloinjerto traqueal.

9. SUGERENCIAS PARA TRABAJO FUTURO

El problema de las traqueopatías es relevante dado que implica insuficiencia respiratoria que provoca disnea. La disnea depende, en estos casos, del grado de obstrucción que sufre la tráquea, y es de la sintomatología clínica uno de los más angustiosos, con sensación de muerte.

Esta patología ha originado que desde hace muchos años se estudie y se investigue la mejor manera de resolver esta “sed de aire”.

En este protocolo de estudio, existe el soporte para continuar la investigación sobre tráqueas criopreservadas, ya que en esta relación de casos, así como también a nivel de la literatura internacional los mejores resultados se han obtenido con este método de preservación.

Por estas razones se profundizará en esta técnica para: 1) tiempo ideal de preservación, 2) antigenicidad y 3) criopreservación e inmunosupresores en relación al trasplante de tráquea.

Por las condiciones del tejido traqueal, llegará el momento en que sea posible contar con banco de tráqueas.

10. REFERENCIAS

1. Dellmann H. D. Histología veterinaria. Sistema respiratorio. ed. Acribia S. A. Zaragoza, España. 1993: 159-176.
2. Netter F. H. Colección Ciba de Ilustraciones Sobre Anatomía y Embriología, Fisiología, Anatomía Patológica, Síntomas Clínicos y Tratamiento de Enfermedades Tomo VII Sistema Respiratorio. Barcelona España: Salvat Editores, S. A.1984.
3. Robert F. Schmidt. Human Physiology, Second, Completely Revised Edition Springer-Verlag 1990.
4. Grillo HC, Tracheal Replacement: A Critical Review. *Ann Thorac Surg* 2002; 73:1995-2004.
5. Plopper C. G., Mariassy A. T. and Lollini L. O.: Structure as revealed by airway dissection: A comparison of mammalian lungs. *Am Rev Respir Dis.* 1983; 128: S4-S7.
6. Salassa JR, Bruce BS, Pearson W, Spencer Payne W. Gross and Microscopical Blood Supply of Trachea. *Ann Thorac Surg* 1997;24(2);100-107.
7. Junqueira LC, Carneiro J. Histología básica. 5ta ed. Masson S.A. Barcelona, España 2001: 331-348.
8. Jackson TL, Lefkin P, Tuttle W, et. al. An experimental study in bronchial anastomosis *J Thorac Surg* 1949; 19:630-42.
9. Frost EA. Tracing the tracheostomy. *Ann Otol* 1976; 85:618-24
10. Mulliken JB, Grillo HC. The limits of tracheal resection with primary anastomosis: further anatomical studies in man. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1968;55:418-21.
11. Grillo HC. The development of tracheal surgery: an historical review. I. Techniques of tracheal surgery. *Ann Thorac Surg* 2003;75:610-9.
12. Pacheco CR, Rivero O, Porter JK. Experimental reconstructive surgery of trachea. *J Thorac Surg* 1954; 27:554-64.
13. Stephens Jr KE, Wood DE. Bronchoscopic management of central airway obstruction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;119:289-96.
14. Cooper JD, Pearson FG, Patterson GA, et al. Use of silicone stents in the management of airway problems. *Ann Thorac Surg* 1989;47:371-8.
15. Wallace MJ, Charnsangavej C, Ogawa K, et al. Tracheobronchial tree : expandable metallic stents used in experimental and clinical applications. *Radiology* 1986;158:309-12.
16. Daniel RA Jr. The regeneration of defects of the trachea and bronchi. An experimental study. *J Thorac Surg* 1948;17:335-49.
17. Taffel M. The repair of tracheal and bronchial defects with free fascia grafts. *Surgery* 1940;8:56-71
18. Daniel RA Jr. Taliaferro RM, Schaffarzick WR. Experimental studies on the repair of wounds and defects of the trachea and bronchi. *Dis Chest* 1950;17:426-41.
19. Neville WE, Bolanowski PJP, soltanzadeh H. Homograft replacement of

- the trachea using immunosuppression. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1976;72:596-601.
20. Messineo A, Filler RM, Bahoric B, et al. Successful tracheal autotransplantation with a vascularized omental flap. *J. Pediatr Surg* 1991; 26:1296-300
 21. Deschamps C, Trastek VE, Ferguson JL, et al. Cryopreservation of canine trachea: functional and histological changes. *Ann Thorac Surg* 1989;47:208-12
 22. Tojo T, Kitamura S, Gojo S, et al. Epithelial regeneration and preservation of tracheal cartilage after tracheal replacement with cryopreserved allograft in the rat. *J. Thorac Surg Cardiovasc Surg* 1998;116-624-7.
 23. Walles T, Giere B, Hofmann M, Schanz J, Hofmann F, Mertsching H, Macchiarini P. Experimental generation of a tissue-engineered functional and vascularized trachea. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;128:900-6.
 24. Oficina de Bioestadística. Departamento de Archivo Clínico del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
 25. Lenot B, Macchiarini P, Dulmet E, Weiss M, Darteville P. Tracheal allograft replacement. An unsuccessful method. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1993;7(12):648-52.
 26. Macchiarini P, Mazmania GM, Montpréville VT, Dulmet EM, Chapelier AR, Darteville PG. Maximal preservation time of tracheal allografts. *Ann Thorac Surg* 1995;60:1597-1604.
 27. Yokomise H, Inui K, Wada H, Ueda M, Hitomi S. Tracheal transplantation in dogs for future clinical application. *Transplant Proc* 1996; 28(3):1763-1764.
 28. Yokomise H, Inui K, Wada H, Ueda M, Hitomi S. Reliable Long-Term cryopreservation of trachea for tissue banks. *Transplantat Proc* 1996;28(2):1119-1120.
 29. Knoop C, Haverich A, Fischer S. Immunosuppressive therapy after human lung transplantation. En Boe J. Estenne M, Weder W. *Lung Transplantation. European Respiratory Monograph* 2003. Vol. 8, (26): 105-129.
 30. Calne RY, White DJ, Thiru S. Et al. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet* 1979; ii: 1033-1036.
 31. Kahan BD, Dunn J, Fitts C, et. Al. Reduced inter- and intra-subject variability in cyclosporine pharmacokinetics in renal transplant recipients treated with a micro-emulsion formulation in conjunction with fasting low-fat meals, or high-fat meals. *Transplantation* 1995;59:505-511.
 32. Hutchinson I. Trasplante y rechazo. En Roitt I, Brostoff J, Male D. *Inmunología, España, Harcourt; 1998, p 353-366.*
 33. International Society for Heart and Lung Transplantation. ISHLT Data 2002. www.isHLT.org.

34. Briffa N, Morris RE. New immunosuppressive regimens in lung transplantation. *Eur Respir J* 1997;10:2630-2637.
35. Morton JM, Kear LM, Williamson S, Potter JM. Trough levels are inadequate for monitoring tacrolimus pharmacokinetics in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21: Suppl.1, 144.
36. Shennib H, Mercado M, Nguyen D, et al. Successful treatment of steroid-resistant double-lung allograft rejection with orthoclone OKT3. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:224-226
37. Schachar NS, McGann LE. Investigations of Low-Temperature Storage of Articular Cartilage for Transplantation. *Clin Orthop Rel Res* 1986; 208:146-150
38. Snowman, John W. Downstream Processes: Equipment and Techniques. Pages 315-3511, 1988 Alan R. Liss Inc.
39. Tsuruta T, Ishimoto Y, Masuoka T. Effects of glycerol on Intracellular Ice Formation and Dehydration of Onion Epidermis. *Ann N Y Acad Sci* 1998 (11);858:217-26.
40. Tomita Y, Yoshikawa M, Zhang QW, Uchida T, Nakashima Y, Sueishi K, Nomoto K, Yasui H. Immune and Non-immune Factors in Cryopreserved Tissues. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22 (5):560-567.
41. Oei FBS, Stegmann APA, Vaessen LMB, Marquet RL, Weimar W, Bogers AJJ. Immunological Aspects of Fresh and Cryopreserved Aortic Valve Transplantation in Rats. *Ann Thorac Surg* 2001;71:S379-84.
42. Fahy GM. The Study of Life and Death at Low Temperatures. www.21cm.com/articles/cryobiology.
43. Tanasawa I. Things we do not know about cryopreservation of Biological Organs. *Ann N Y Acad Sci* 1998;11;858:227-3. 227-234.
44. Kuznetsov AV, Kunz WS, Saks V, Usson Y, Mazat JP, Letellier T, Gellerich FN, Margreiter R. Cryopreservation of mitochondria and mitochondrial function in cardiac and skeletal muscle fibers. *Analytical Biochemistry* 319 (2003) 296-303.
45. Storey K. Biochemistry of natural freeze tolerance in animals: molecular adaptations and applications to cryopreservation. *Biochem Cell Biol* 1990; 68:687-698.
46. Ishida A, Murray J, Saito Y, Kanthou C, Benzakour O, Shibuya M, Wijelath ES. Expresión of Vascular Endotelial Growth Factor Receptors in Smooth Muscle Cells . *J of Cellular Physiology* 2001;188:359-368.
47. Sato Y. Molecular mechanism of angiogenesis. Transcription factors and their therapeutic relevance. *Pharmacology & Therapeutics* 2000; 87:51-60.
48. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999; 77(7):527-43.
49. Klagsbrun M, Dluz S. Smooth muscle cell and endothelial cell growth factors. *Trends Cardiovasc Med* 1993;3:213-17. Review.
50. Ozerdem U, Stallcup WB. Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. *Angiogenesis* 2003; 6(3):241-249.

51. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación de los Estados Unidos Mexicanos. AFÍA 6 dic. de 1999.
52. Wingefeld C, Egli RJ, Hempfing A, Ganz R, Leunig M. Cryopreservation of osteochondral allografts: dimethyl sulfoxide promotes angiogenesis and immune tolerance in mice. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 2002;84A(8):1420-1429.
53. Baust JM, Vogel MJ, Buskirk RV, Baust JG. A molecular basis of cryopreservation failure and its modulation to improve cell survival. *Transplantation* 2001;10:561-571.
54. Storey KB: Biochemistry of natural freeze tolerance in animals: molecular adaptations and applications to cryopreservation. *Biochem Cell Biol* 1990; 68:687-698.
55. Tojo T, Niwaya K, Sawabata N, Nezu K, Kawachi K, Kitamura S. Tracheal allogenic immunoresponse is reduced by criopreservation: canine experiment. *Transplant Proc* 1996;28(3):1814-1815.
56. Tojo T, Niwaya K, Sawabata N, Kushibe K, Nezu K, Taniguchi S, Kitamura S. Tracheal replacement with cryopreserved tracheal allograft: experiment in dogs. *Ann Thorac Surg* 1998; 66:209-13.
57. Distar JM. 1992. *Biological Electron Microscopy. Theory, Techniques and Troubleshooting*. Plenum. New York. 359 pp.
58. Hayat MA (ed). 1993. *Stains and Cytochemical methods*. Plenum. New York. 455 pp.
59. Hayat MA (ed). 1974-1978. *Principles and Techniques Electron Microscopy*. 6 Vols. Van Nostrand Reinhold, New York. 298 pp.
60. González SR. 1993 *Técnicas de Microscopía Electrónica en Biología*. Aguilar. Madrid. España. 455 pp.
61. Restucci B, Papparella S, Maiolino P and De Vico G. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol*. 2002, 39: 488-493.
62. Su-Ming H, Raine L, Fanger H. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A Comparison between ABC and Unlabeled Antibody (PAP) Procedures. *J Histochemistry and Cytochemistry* 1981, 29 (4): 577-580.
63. Baumgartner I. Intramuscular vascular endothelial growth factor gene therapy: fact or fiction. *The American Journal of Medicine* 2003;114:156-157.
64. American Thoracic Society. Task Group on Screening for Respiratory Disease in Occupational Settings. *Am Rev Respir Dis*. 1982, 126:952-56.
65. Cotton RT, Connor DM, Myer CM: Proposed Grading System for subglottic stenosis based on endotracheal tube sizes. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994;108:319-323.

66. Shirakusa T, Ueda H, Saido T. The experimental allotransplantation of trachea in canine. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*. 1990 Apr; 91(4):524-528. (Resumen)
67. Mabrut JY, Adham M, Bourgeot JP, eljaafari A, DelaRoche E, Ducerf C, Baulieux J, Rigal D. Mechanical and histological characteristics of human trachea before and after cryopreservation: an opportunity for tracheal tissue banking. *Transplant Proc* 2001; 33:609-611.
68. Zagalo C, Grande NR, Dos Santos JM, Monteiro E, Brito J, Aguas AP. Tracheal Transplantation: Cytological Changes Studied by Scanning and Transmisi3n Electron Microscopy in the Rabbit. *Laryngoscope* 111: April 2001, 657-662.
69. Rafiee P, Heidemann J, Ogawa H, Johnson NA, Fisher PJ, Li MS, Otterson MF, Johnson CP, Binion DG. Cyclosporin A differentially inhibits multiple steps in VEGF induced angiogenesis in human microvascular endothelial cells through altered intracellular signaling. *Cell Communication and Signaling* 2004, 2:3
70. Belsey R. Resection and reconstitution of the intrathoracic trachea. *Br J Surg* 1950; 38:200-5.
71. Jackson TL, O'Brien EJ, Tuttle W, Meyer J. The experimental use of homogenous tracheal transplants in the restoration of continuity of the tracheobronchial tree. *J Thorac Surg* 1950;20:598-612.