

Criopreservación de segmentos traqueales: Efecto del tiempo de congelación sobre la integridad estructural del cartílago

Jaime Villalba-Caloca,* □ Avelina Sotres-Vega,‡ J. Alfredo Santibáñez-Salgado,‡ Matilde Baltazares-Lipp,‡ Miguel Gaxiola-Gaxiola,‡ Hilda Villegas-Castrejón,§ J. Raúl Olmos-Zúñiga,‡ Rogelio Jasso-Victoria,‡ Miriam Mendoza-Santiago,¶ Juan Antonio Morales-Tiburcio,¶ Noé Hernández-García,|| Bruno Herrera-Rodríguez||

Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental, INER;* Departamento de Investigación en Cirugía Experimental, INER;‡ Departamento de Microscopía, INR;§ Becario del PROBEI de la CCINSHAE;¶ Programa de Servicio Social Ciencias Médicas en Cirugía Experimental (INER-UNAM)||

Trabajo recibido: 30-IV-2010; aceptado: 19-VII-2010

RESUMEN. Criopreservación de segmentos traqueales: Efecto del tiempo de congelación sobre la integridad estructural del cartílago. Un problema médico que aún no ha tenido solución son las patologías extensas de la tráquea (> 6 cm), ya que cuando la lesión es muy extensa no es posible llevar a cabo la anastomosis término-terminal. Dentro de éstas se encuentran tumores, obstrucciones postintubación, malacias, fistula traqueoesofágica y otras más. Debido a este tipo de enfermedades varios grupos trabajan con el objetivo de resolver este grave problema. En este trabajo se estudian los cambios histológicos que presenta el cartílago traqueal por efecto de la criopreservación; y en perspectiva, proponer el alotrasplante traqueal. Nuestro objetivo es obtener información en relación con la preservación de tejido traqueal con diferentes tiempos de criopreservación.

Palabras clave: Tráquea, trasplante traqueal, criopreservación.

ABSTRACT. Tracheal segments cryopreservation: Effect of freezing time on the structural integrity of cartilage. Pathological long tracheal segments (> 6 cm) remain an unsolved medical issue, since long lesions are not amenable to perform an end to end anastomosis. Such pathologies include tumors, post-intubation stenosis, malacias, tracheoesophageal fistulae and many others. There are many research groups that are working to solve this challenge, focused on tracheal cryopreservation or tissue-engineered tracheal transplant. In this work, we study the histological changes on the trachea tissue that result from different cryopreservation time, in order to obtain information that could let us perform tracheal transplantation in the near future.

Key words: Trachea, tracheal transplantation, cryopreservation.

INTRODUCCIÓN

La tráquea es una vía de conducción del aire hacia y desde los pulmones integrada por una serie de anillos de cartílago interconectados entre sí que constituyen la estructura de soporte y mantienen la permeabilidad de su luz.¹⁻⁵ Desde el punto de vista histológico, la pared de la tráquea se compone de cuatro capas: 1) la mucosa, formada por epitelio pseudoestratificado ciliado que actúa como una barrera protectora, produce moco, filtra y remueve las partículas a través de los cilios y una lámina propia fibroelástica compuesta de tejido conjuntivo laxo; 2) la submucosa, separada de la mucosa por una membrana elástica integrada por una capa de fibras elásticas entremezcladas con abundantes

fibras colágenas; 3) anillos de cartílago hialino revestidos por pericardio, cuya función es proporcionar estabilidad a la tráquea; y 4) la adventicia, periférica a los anillos de cartílago, formada por tejido conectivo laxo es la cubierta externa de la tráquea, su función es unir a la tráquea con los tejidos adyacentes del cuello y el mediastino¹⁻⁵ (figura 1).

El cartílago traqueal se encuentra cubierto por una capa de tejido conjuntivo denso denominado pericardio, responsable del aporte sanguíneo y de la eliminación de los restos metabólicos. El cartílago está integrado por células denominadas condrocitos y por el material extracelular que constituye la matriz. La matriz extracelular es un gel formado por macromoléculas de proteoglicanos y glicoproteínas estructurales que rellena el espacio

entre las células y las fibras del tejido conjuntivo. Los condrocitos renuevan las macromoléculas de la matriz del cartílago, sintetizan colágeno principalmente de tipo II, proteoglicanos y condronectina. Las cavidades de la matriz ocupadas por los condrocitos reciben el nombre de "lagunas". Una laguna puede contener uno o más condrocitos. En la periferia del cartílago hialino, los condrocitos presentan una forma alargada con su eje mayor paralelo a la superficie mientras que en la parte central, son más redondeados y se asocian en grupos isógenos. La matriz extracelular se define como "pericelular" (la que delimita una laguna), "territorial" (la que rodea un grupo isógeno) e interterritorial (la que está distribuida entre la matriz territorial)¹⁻⁵ (figura 2).

Existen diferentes alteraciones traqueales relacionadas con la estructura y por ende con la función del cartílago, éstas incluyen principalmente estenosis, tumores y malacias. El tratamiento de elección para este tipo de patología consiste en resecar el segmento traqueal dañado; sin embargo, este procedimiento es

útil, exclusivamente para lesiones traqueales con una longitud máxima de 6 cm, lo que excluye a los pacientes portadores de lesiones extensas (> 6 cm) y en los que es necesario, entonces, tratar de paliar la insuficiencia respiratoria mediante procedimientos recurrentes y no definitivos como traqueostomía, aplicación de rayo láser, dilataciones traqueales o la colocación de diferentes tipos de stents.¹⁻³

Actualmente, no existen estrategias quirúrgicas definitivas para la reparación de lesiones traqueales mayores de 6 cm, a pesar de numerosos intentos realizados con prótesis sintéticas de diferentes materiales (dacrón, silicón, poliuretano, politetrafluoroetileno, propileno y metal), tejidos autólogos (fascia, piel, hueso, periorstio, cartílago, pericondrio, músculo, esófago, pericardio, duramadre, intestino delgado; así como el uso de "colgajos" para favorecer la vascularización), trasplante traqueal, e ingeniería de tejidos (siembra de condrocitos en armazón de polímeros sintéticos biodegradables). Sin embargo, con ninguna de estas alternativas quirúrgicas ha sido posible realizar una reconstrucción funcional (todas ellas generan complicaciones como desvascularización, estenosis, necrosis, dehiscencia, infección, reacciones inmunológicas y la formación de tejido de granulación). Esta problemática exige la búsqueda de una estrategia medico-quirúrgica definitiva para los pacientes portadores de lesiones traqueales mayores de 6 cm de longitud, en los que no existe la posibilidad de realizar una resección, sólo así se resolverá la insuficiencia respiratoria que les provoca y fatales complicaciones funcionales e infecciosas.¹⁻³

Siendo la criopreservación un método que ha demostrado tener utilidad en la protección de los parámetros morfológicos, funcionales y bioquímicos de diferentes células y tejidos, se evalúa actualmente a nivel mundial la reconstrucción experimental de lesiones extensas utilizando segmentos de tráquea

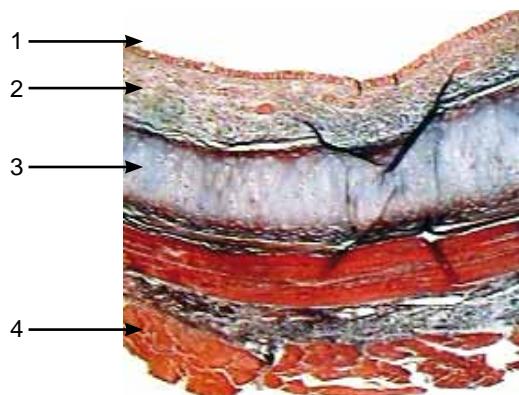


Figura 1. Tráquea (tricrómica de Masson, 10x): 1) mucosa, 2) submucosa, 3) cartílago hialino, 4) adventicia.

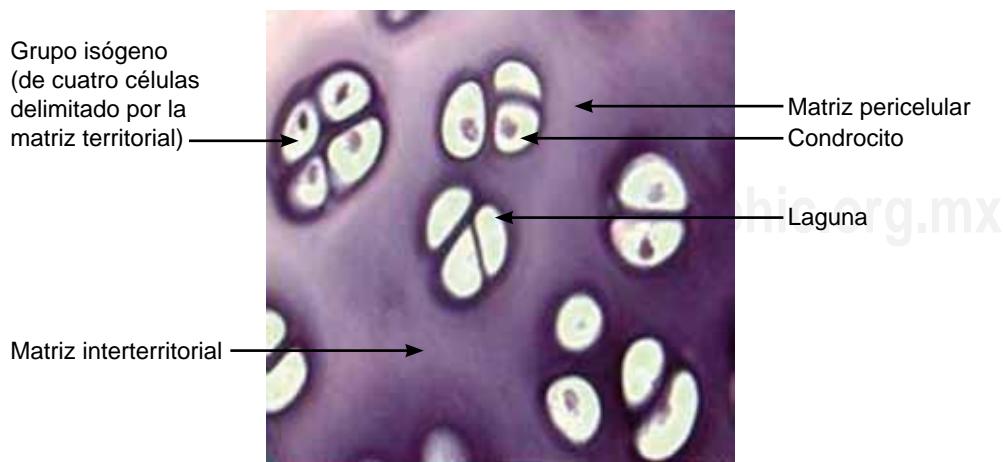


Figura 2. Cartílago traqueal.

criopreservados. En estos diseños, se crea una lesión mediante la resección de un segmento traqueal de varios anillos. Este defecto se sustituye por segmento traqueal criopreservado de la misma longitud. Los resultados reportados acerca del efecto que ejerce la criopreservación sobre el cartílago son contradictorios limitando la aplicación clínica del procedimiento. Es probable que la contradicción entre los resultados derive de las diferentes condiciones experimentales en que se realiza la criopreservación de los segmentos traqueales, entre éstas la solución, la temperatura y el tiempo de congelación.^{1,2}

La criopreservación consiste básicamente en sumergir el biomaterial que se desea preservar dentro de una solución adicionada con un agente crioprotector capaz de disminuir el daño osmótico y mantenerlo almacenado bajo temperaturas extremas de congelación, tal como con el uso de nitrógeno líquido (-196°C). Los diseños de criopreservación para segmentos traqueales cubren básicamente el mismo procedimiento empleando: a) como solución de congelación, medios de cultivo celular como RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) y TC-199 (Tissue Culture) complementados con suero bovino fetal (SBF) y dimetilsulfóxido (DMSO), b) un proceso de congelación programada en el que la temperatura disminuye de manera gradual regularmente entre (-1 y -5°C/minuto) hasta alcanzar un rango que habitualmente fluctúa entre (-80 y -100°C) y c) el almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido (fase de vapor: -196°C) durante períodos prolongados de tiempo.^{1,3}

Con respecto al tiempo de criopreservación, el período de almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido reportado es muy amplio, varía entre 7 y 730 días, al respecto algunos autores refieren que los períodos prolongados de criopreservación favorecen el deterioro del cartílago,⁶⁻⁹ mientras que otros indican que la viabilidad del cartílago no muestra diferencias importantes cuando se incrementa el tiempo de criopreservación.^{8,9} El objetivo de este trabajo radicó en evaluar el efecto que ejerce el tiempo de criopreservación sobre la integridad estructural del cartílago traqueal.^{10,11}

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se procuraron las tráqueas de dos perros mestizos con un peso corporal entre 15 a 30 kg, de cualquier sexo, con edad variable, no relacionados entre sí y de "fin de estudio" (utilizados previamente en protocolos de investigación quirúrgica no relacionados con cirugía traqueal).

Los animales se mantuvieron en condiciones habitua-

les de bioterio y se manejaron con base en los lineamientos establecidos en las Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999¹² y en la Guide for Care and Use of Laboratory Animals, USA.¹³

Técnica quirúrgica

Los perros se prepararon con 24 horas de ayuno para sólidos y con 12 horas de ayuno para líquidos, la anestesia se indujo por vía intravenosa con hidrocloruro de xilacina (0.1 mg/kg, rompum, Bayer) mezclado con propofol (6 mg/kg, díprivan, Astra Zeneca) y se mantuvo con isofluorano al 2% durante todo el proceso quirúrgico.

Los animales se colocaron sobre la mesa de cirugía en posición decúbito dorsal, se intubaron con sonda orotraqueal y se conectaron a un ventilador (Harvard Apparatus) con un vaporizador (Isotec 3 Ohmeda), manteniendo una frecuencia respiratoria de 20 respiraciones/min, un volumen corriente de 15 mL/kg y una FiO₂ del 100%. Se realizó tricotomía, asepsia y antisepsia de la zona toraco-cervical que se delimitó con campos quirúrgicos. Se practicó una incisión ventral media, con límite craneal en la región de la mandíbula y con límite caudal en la región supraesternal. Se diseccionó el tejido subcutáneo hasta llegar a la tráquea que se disecó en toda su circunferencia y se resecó en toda su longitud, utilizando las técnicas quirúrgicas convencionales. Inmediatamente después y sobre una charola de mayo apoyada sobre una cámara de hielo se realizó una disección fina de la tráquea.

Obtención de los segmentos traqueales

Concluida la disección fina de la tráquea, con ayuda de un bisturí se resecó el cartílago cricoides que fue eliminado del estudio. El resto de la tráquea se cortó en tres segmentos de seis anillos que fueron lavados durante tres minutos en una solución glucosada fría (glucosa al 50% (Solución DX-50, PISA) adicionada con 20 mL de una solución de manitol al 20% (manitol al 20%, PISA), 5,000U de heparina (inhepar, PISA), 1g de estreptomicina (sulfastrep, PISA), 1000,000U de penicilina (PISA) y 0.1 mL de una solución antibiótica-antimicótica (SIGMA, A5955) por cada litro de solución y mantenida en hielo, con recambio de la solución cada minuto. En forma inmediata posterior al lavado de los segmentos traqueales, éstos fueron sumergidos en medio RPMI-1640 (SIGMA, R8758) adicionado con 10% de dimetilsulfóxido (SIGMA, D2650), 20% de suero bovino fetal (GIBCO, 16000-044) y 0.1 mL de una solución

antibiótica-antimicótica (SIGMA, A5955) por cada litro de solución para su congelación a (-70°C) durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de congelación, los segmentos traqueales fueron divididos al azar en los diferentes grupos de estudio que fueron establecidos con base en el tiempo de criopreservación (tiempo de almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido).

Grupos de estudio

De cada tráquea procurada, se obtuvieron 3 segmentos de 6 anillos que fueron asignados al azar en seis grupos de estudio.

Grupo control (sin criopreservación)

Grupo 1: El segmento traqueal no fue sometido a ningún tipo de criopreservación, únicamente se enjuagó en la solución glucosada (n = 6 anillos de cartílago).

Grupos 2 al 6 (con criopreservación)

En los grupos de estudio 2 al 6, los segmentos traqueales fueron sumergidos en medio RPMI, congelados a -70°C durante 24 horas y transferidos al tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento a -196°C durante:

* Grupo de estudio	Tiempo de criopreservación (días)
2	15
3	21 a 50
4	51 a 100
5	101 a 150
6	151 a 200

* n = 6 anillos de cartílago/grupo de estudio

Concluidos los tiempos de criopreservación, los segmentos traqueales de los grupos de estudio 2 al 6 fueron descongelados colocando el crioval en un baño María mantenido a una temperatura de 37°C, enjuagados durante 3 minutos en medio RPMI-1640 (SIGMA, R8758) adicionado con 20% de suero bovino fetal (GIBCO, 16000-044) mantenido a 37°C y cortados en anillos. Todos los grupos de estudio se integraron con seis anillos traqueales.

Evaluación microscópica de los anillos traqueales

Para realizar la evaluación histológica del cartílago, los segmentos traqueales fueron sumergidos en una solución formol al 10% durante 24 horas para su fijación, en

el caso del grupo control, en forma inmediata posterior a la procuración de la tráquea y en los grupos 2 al 6, una vez que los segmentos traqueales fueron descongelados al concluir el tiempo de criopreservación. Los segmentos traqueales se retiraron de la solución de formol y con ayuda de bisturí fueron cortados en anillos que se procesaron para su inclusión en bloques de parafina, obtención de cortes de 4 µm de grosor y tinción con hematoxilina-eosina.

El efecto del tiempo de criopreservación sobre la evaluación histológica del cartílago incluyó un registro de las alteraciones en la tinción de las matrices pericelular, territorial e interterritorial con respecto a la tinción basófila del cartílago traqueal control (sin criopreservación) utilizando un microscopio óptico y aumento 10x.

RESULTADOS

Ninguno de los 6 anillos traqueales de los grupos de estudio 1 (control) y 2 (15 días de criopreservación) presentaron alteraciones en la tinción de las matrices pericelular, territorial e interterritorial del cartílago (sin alteraciones). Con respecto a la tinción basófila del cartílago del grupo control (sin criopreservación), en el resto de los grupos de estudio (3, 4, 5 y 6), las alteraciones en el cartílago por efecto del tiempo de criopreservación involucran: a) la matriz territorial cuando el tiempo de almacenamiento de los segmentos traqueales varió entre 21 y 50 días (grupo 3, alteraciones "mínimas") y b) las matrices territorial e interterritorial cuando el tiempo de almacenamiento de los segmentos traqueales varió entre 51 y 200 días (grupos de estudio 4, 5 y 6, alteraciones "severas").

En los 6 anillos traqueales del grupo 3 (21 a 50 días de criopreservación), la matriz territorial del cartílago se caracterizó únicamente por hipertinción (coloración morado intenso vs. coloración basófila del cartílago del grupo control), contrariamente a lo observado en los grupos de estudio 4, 5 y 6 en los que en todos los anillos traqueales presentaron un engrosamiento de la matriz territorial del cartílago con pérdida del límite característico entre los grupos isógenos, esta matriz, se distingue de color blanco después de un período de criopreservación comprendido entre 51 y 200 días que afecta también la tinción de las matrices pericelular e interterritorial que se observan claramente hiperteñidas (coloración morado intenso vs. coloración basófila del cartílago del grupo control). El 33.33% de los anillos (n = 12/36) traqueales no presentaron alteraciones en la tinción de las matrices del cartílago y correspondieron a los grupos de estudio 1 y 2, el 16.7% de los anillos traqueales (n = 6/36) presentaron alteraciones "mínimas" y correspondieron al grupo 3, mientras que el 50%

(n = 18/36) de los anillos traqueales con alteraciones "severas" en la tinción del cartílago correspondieron a los grupos de estudio 4, 5 y 6. Estas alteraciones fueron estadísticamente significativas entre los grupos de estudio (Ji cuadrada, Kruskal-Wallis: $p < 0.001$) y presentaron una correlación significativa (Spearman: $r = 0.926$, $p < 0.01$) (figura 3).

DISCUSIÓN

Bajo las condiciones experimentales establecidas en este trabajo, la criopreservación de segmentos traqueales sumergidos en medio RPMI y congelados 24 horas a -70°C en forma previa al almacenamiento en nitrógeno líquido (fase de vapor -196°C) durante períodos de tiempo que variaron entre 15 y 200 días y con respecto a la tinción basófila del cartílago del grupo control en el que los segmentos traqueales no fueron sometidos a criopreservación, encontramos que:

- Los segmentos traqueales almacenados en nitrógeno líquido durante 15 días no muestran alteraciones en la integridad y tinción de las matrices pericelular, territorial e interterritorial del cartílago. A partir del día 21, es cuando ocurren cambios evidentes en la tinción de las matrices del cartílago;
- Después de un período de tiempo que varía entre 21 y 50 días, las alteraciones comprometen únicamente la matriz territorial;
- Después de un período de tiempo que varía entre 51 y 200 días, las alteraciones en la tinción del cartílago comprometen las tres matrices. Las matrices pericelular e interterritorial se tiñen de morado intenso (hipertinción), mientras que la matriz territorial se observa de color blanco;
- El daño ocasionado en las matrices pericelular, territorial e interterritorial de cartílago parece estar ocasionado por el tiempo de almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido.

La hematoxilina actúa como un colorante básico con densidad de carga positiva que se asocia a iones con carga aniónica (sulfatos, fosfatos y carboxilos) contenidos en la cromatina, en los nucléolos y en el caso del cartílago, específicamente en el cartílago, en los glucosaminoglicanos sulfatados, que forman parte de los proteoglicanos además de grupos hialurónicos y condroitín sulfato, entonces, las alteraciones observadas en la tinción del cartílago criopreservado parecen indicar una exposición aumentada (hipertinción) o disminuida (tinción tenue) de los grupos sulfato, fosfato y carboxilo característicos de los componentes responsables de la consistencia del cartílago (proteoglicanos,

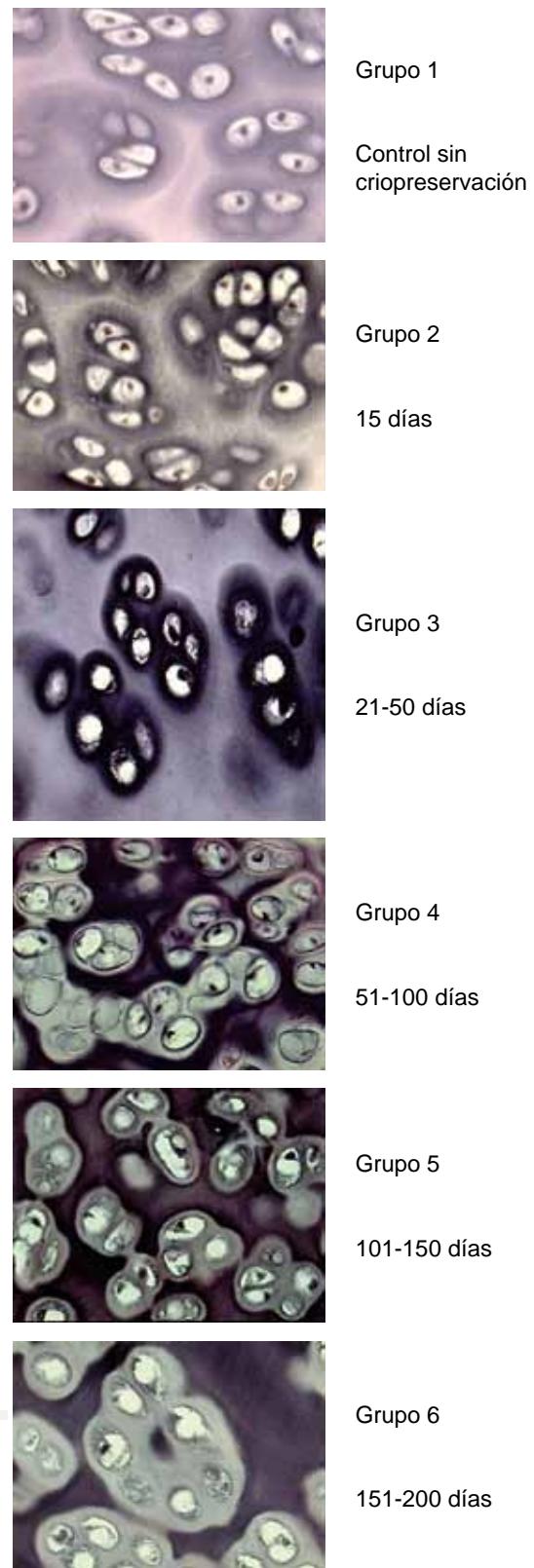


Figura 3. Efecto del tiempo de criopreservación sobre la integridad estructural del cartílago traqueal (tinción H-E, 10X).

glucosaminoglucanos, ácido hialurónico y colágena tipo II) capaces de remodelar la matriz extracelular del cartílago.²

Está reportado que el daño tisular por efecto de la congelación se clasifica como “indirecto” cuando se presenta como consecuencia de un período prolongado de criopreservación y que las alteraciones en el cartílago ocasionadas por efecto de la criopreservación, están relacionadas con las complicaciones postoperatorias. En forma posterior a la criopreservación y previa a la reconstrucción, los segmentos traqueales criopreservados muestran aparentemente la estructura normal característica con mantenimiento de la vía aérea permeable y sin traqueomalacia. Asimismo, después de la reconstrucción puede presentarse contracción del tejido cartilaginoso,¹⁴ dislocación de los anillos traqueales,¹⁵ calcificación del cartílago traqueal,¹⁶ pérdida de las propiedades elásticas y estructurales de las paredes del cartílago,¹⁷ destrucción de los anillos traqueales o absorción del cartílago^{17,18} y, como consecuencia, obstrucción de la vía aérea con falla respiratoria aguda acompañada de estenosis y/o traqueomalacia.^{1-3,19,20}

Con base en los resultados obtenidos, concluimos que bajo las condiciones experimentales de criopreservación para segmentos traqueales establecidas en este proyecto: a) el tiempo óptimo de congelación a -196°C es de 15 días; b) períodos comprendidos de criopreservación entre 20 y 50 días provocan cambios degenerativos en las matrices del cartílago que son más evidentes entre 51 y 200 días de almacenamiento en nitrógeno líquido; c) el efecto de la criopreservación sobre el mantenimiento integral del cartílago traqueal se reflejará en la utilidad y funcionalidad del segmento traqueal utilizado en una reconstrucción; y d) las discrepancias observadas en la tinción del cartílago criopreservado específicas para glucosaminoglucanos (proteoglicanos, ácido hialurónico, sulfatos de condroitina) responsables de la consistencia del cartílago, sugieren la ocurrencia de cambios bioquímicos y degenerativos en la matriz del cartílago probablemente asociados y/o atribuibles a la interacción de estos compuestos con el resto de los componentes de la matriz responsables de la consistencia del tejido cartilaginoso.

REFERENCIAS

1. Villalba CJ. Respuesta tisular del aloinjerto traqueal liofilizado y criopreservado combinado con terapia de inmunosupresión y aplicación tópica del factor de crecimiento del endotelio vascular [tesis doctoral]. México, D.F.: Escuela Superior de Medicina, IPN; 2007.
2. Sotres VA. Evaluación de las alteraciones macroscópicas, microscópicas y en la expresión de caspasa-3 en el tejido

traqueal criopreservado por efecto de la solución, de la temperatura y del tiempo de congelación [tesis doctoral]. México, D.F.: UAM-X; 2010.

3. Sotres-Vega A, Villalba-Caloca J, Jasso-Victoria R, et ál. Cryopreserved tracheal grafts: a review of the literature. *J Invest Surg* 2006;19:129-135.
4. Guyton CA, Hall EJ. Tratado de fisiología médica. 10 ed. México: McGraw-Hill-Interamericana; 2005.p.534-536.
5. Junqueira LC, Carneiro J. Histología básica. Texto y Atlas. Barcelona, España: Masson; 2001; 83-348.
6. Nakanishi R, Umesue M, Hashimoto M, Muranaka H, Hachida M, Yasumoto K. Limit of warm ischemia time before cryopreservation in rat tracheal isografts. *Ann Thorac Surg* 2000;70:1800-1804.
7. Hashimoto M, Nakanishi R, Umesue M, Muranaka H, Hachida M, Yasumoto K. Feasibility of cryopreserved tracheal xenotransplants with the use of short-course immunosuppression. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;121:241-248.
8. Inutsuka K, Kawahara K, Takachi T, Okabayashi K, Shiraishi T, Shirakusa T. Reconstruction of trachea and carina with immediate or cryopreserved allografts in dogs. *Ann Thorac Surg* 1996;62:1480-1484.
9. Nakanishi R, Hashimoto M, Muranaka H, Umesue M, Kohno H, Yasumoto K. Maximal period of cryopreservation with the Bicell biofreezing vessel for rat tracheal isografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;117:1071-1076.
10. Kushibe K, Nezu K, Nishizaki K, Takahama M, Taniguchi S. Tracheal allotransplantation maintaining cartilage viability with long-term cryopreserved allografts. *Ann Thorac Surg* 2001;71:1666-1669.
11. Kushibe K, Tojo T, Sakaguchi H, et ál. Assessment of cartilage viability in the cryopreserved tracheal allograft by measurement of Na(2)(35)SO(4) Incorporation. *Transplant Proc* 2000;32:1655-1656.
12. Diario Oficial de la Federación. Especificaciones técnicas para la producción cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Diciembre 6. Estados Unidos Mexicanos: Diario Oficial de la Federación; 1999.
13. Guide for Care and Use of Laboratory Animals. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health; 1985.
14. Murakawa T, Nakajima J, Motomura N, Murakami A, Takamoto S. Successful allotransplantation of cryopreserved tracheal grafts with preservation of the pars membranacea in nonhuman primates. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123:153-160.
15. Nakanishi R, Onitsuka T, Shigematsu Y, Hashimoto M, Muranaka H, Yasumoto K. The immunomodulatory effect of cryopreservation in rat tracheal allotransplantation. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:890-898.
16. Tanaka H, Maeda K, Okita Y. Transplantation of the cryopreserved tracheal allograft in growing rabbits. *J Pediatr Surg* 2003;38:1707-1711.
17. Lenot B, Macchiarini P, Dulmet E, Weiss M, Darteville P. Tracheal allograft replacement. An unsuccessful method. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993;7:648-652.

18. Mukaida T, Shimizu N, Aoe M, Andou A, Date H. Tracheal allotransplantation after varying terms of cryopreservation. *Transplant Proc* 1998;30:3397-4000.
19. Zhao H, Hua TC, Zhou YZ, Wang QF, Yang Y, Bao LL. Cryopreservation and transplantation of dog trachea. *Ann NY Acad Sci* 1998;858:270-275.
20. Kumon BC, Shiraishi T, Makihata S, Kawahara K, Shirakusa T. Cartilaginous injury limits cryopreservation of tracheal isograft. *Respirology* 2000;5:105-110.

✉ Correspondencia:

Dr. Jaime Villalba-Caloca,
Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental.
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Ismael Cosío Villegas. Calzada de
Tlalpan 4502, colonia Sección XVI.
México, D.F., 14080
Correo electrónico: jaimevc@iner.gob.mx

*Los autores declaran no tener
conflicto de intereses*