

## Efecto del factor de crecimiento del endotelio vascular en la cicatrización traqueal (tráqueoplastia o autotrasplante) en ratas

Ivette Rodríguez Revilla,\* Raúl Olmos Zúñiga,\*\* Rogelio Jasso Victoria,\*\* Antonio Soda Merhy,\* Avelina Sotres Vega,\*\* Matilde Baltazar Lipp,\*\* Jaime Villalba Caloca,\*\* Miguel Gaxiola Gaxiola,\*\* Patricio Santillán Doherty,\*\*\* J Alfredo Santibáñez Salgado\*\*

### Resumen

#### ANTECEDENTES

Los trasplantes de tráquea mayores de 6 cm, por lo general, no tienen una adecuada cicatrización debido a la isquemia del injerto trasplantado. El factor de crecimiento del endotelio vascular induce la angiogénesis y favorece la cicatrización tisular.

#### OBJETIVO

Evaluar los cambios macroscópicos, microscópicos e inmunohistoquímicos en la cicatrización traqueal de tráqueoplastias y autotrasplante, después de la aplicación tópica de factor de crecimiento del endotelio vascular.

#### MATERIAL Y MÉTODO

Se operaron 40 ratas de la siguiente manera: grupo I ( $n = 10$ ), tráqueoplastia tratada con solución salina; grupo II ( $n = 10$ ), tráqueoplastia con factor de crecimiento del endotelio vascular; grupo III ( $n = 10$ ), autotrasplante con solución salina y grupo IV ( $n = 10$ ), autotrasplante con factor de crecimiento del endotelio vascular. Los animales fueron valorados clínicamente durante cuatro semanas y al final del estudio se analizaron las anastomosis macroscópica, microscópica, morfométrica e inmunohistoquímica.

#### RESULTADOS

Macroscópicamente todos los animales mostraron cicatrización; sin embargo, 40 y 10% de los animales del grupo II y IV, respectivamente, tuvieron anormalidades. La morfometría de los grupos II, III y IV mostró estenosis traqueal ( $p < 0.05$  Andeva, Tukey). Desde el punto de vista histológico los grupos II y IV tuvieron fibrosis de moderada a grave y colágena desorganizada. La inmunohistoquímica reveló mayor expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular en el grupo IV ( $p < 0.01$ , Andeva, Tukey, Kruskal-Wallis).

#### CONCLUSIÓN

La aplicación tópica de factor de crecimiento del endotelio vascular en los injertos traqueales trasplantados promueve la angiogénesis y favorece la cicatrización de los mismos, pero induce la formación de estenosis traqueal.

### Abstract

#### BACKGROUND

Tracheal transplants longer than 6 cm are prone to poor healing due to ischemia. The vascular endothelial growth factor (VEGF) induces angiogenesis and favors tissue healing.

#### OBJECTIVE

To evaluate the macroscopic, microscopic and immunohistochemical changes induced in trachea healing after tracheoplasty or autotransplantation treated with topical application of VEGF.

#### MATERIAL AND METHODS

Forty rats were operated on: group I ( $n = 10$ ), tracheoplasty treated with saline solution; group II ( $n = 10$ ), tracheoplasty treated with VEGF; group III ( $n = 10$ ), autotransplantation treated with saline solution and group IV ( $n = 10$ ), autotransplantation treated with VEGF. The animals were clinically evaluated during 4 weeks and at the end of the study the anastomosis was macroscopically, microscopically, morphometrically and immunohistochemically studied.

#### RESULTS

Macroscopically, all the anastomosis healed. Nevertheless, 40% and 10% of groups II and IV, animals presented healing abnormalities. Groups II, III and IV morphometrics showed tracheal stenosis ( $p < 0.05$  Andeva, Tukey). The immunohistochemical study revealed a higher VEGF expression in group IV ( $p < 0.01$ , Andeva, Tukey, Kruskal-Wallis).

#### CONCLUSION

The topical application of VEGF in tracheal autotransplants promotes angiogenesis and favors tracheal healing, but promotes scarring and tracheal stenosis.

**Palabras clave:**

autotrasplante traqueal, traqueoplastia, factor de crecimiento de endotelio vascular, VEGF, angiogénesis, estenosis traqueal.

**Key words:**

tracheal autotransplantation, tracheoplasty, vascular endothelial growth factor, VEGF, angiogenesis, tracheal stenosis.

## Introducción

Las estenosis postintubación, las neoplasias, las traqueomalacias o las lesiones traumáticas de la tráquea tienen como tratamiento de elección la resección y la anastomosis termino-terminal. Sin embargo, cuando la lesión es extensa se requiere una prótesis o un trasplante.<sup>1,2</sup>

Los trasplantes de tráquea causan mayor morbilidad y mortalidad debido a la isquemia del segmento procurado y transplantado, ya que la irrigación de la tráquea está conformada por plexos "laterales", por lo que, cuando se realiza el trasplante traqueal, la viabilidad del injerto se afecta por la falta de aporte sanguíneo.<sup>3</sup>

En experimentos se ha observado que los trasplantes traqueales de segmentos de 4 a 5 cm de longitud no sufren complicaciones, a diferencia del trasplante de injertos mayores de 6 cm, en los que la longitud dificulta que los plexos laterales establezcan la revascularización del segmento traqueal transplantado, lo que produce daño del epitelio traqueal, defectos en la cicatrización, dehiscencia o necrosis del injerto y, en consecuencia, falla primaria del injerto.<sup>4-9</sup>

Para promover la revascularización del injerto traqueal donador mayor a 6 cm, evitar la necrosis y estimular la cicatrización, se han realizado diferentes modelos experimentales, como combinar el trasplante traqueal con omentopexia, pero esta técnica no ha funcionado debido a que sólo se revascularizan las líneas de sutura distal y proximal, pero no en la porción media del injerto.<sup>10</sup> También se ha evaluado

la revascularización directa del injerto traqueal con arterias tiroideas y se ha observado que los vasos anastomosados se obstruyen y el injerto se necrosa.<sup>5,8,11,12</sup>

Otros estudios mencionan que la adición de reguladores de la cicatrización, como el factor de crecimiento de fibroblastos en la zona de las anastomosis, tiene buenos resultados debido a que éstos son potentes promotores de la angiogénesis y su aplicación incrementa la revascularización del injerto.<sup>3,12,13</sup>

El factor de crecimiento de endotelio vascular es una glucoproteína secretada por las células endoteliales durante la hipoxia y la isquemia,<sup>14-17</sup> y es uno de los reguladores más potentes de la angiogénesis en condiciones fisiológicas y patológicas, además de ser un inductor de la permeabilidad vascular y promotor de la cicatrización tisular. Su acción es ejercida a través de su unión a receptores tipo tirosincinasa, y la célula endotelial es su principal célula diana.<sup>16,18,19</sup>

Con base en lo anterior puede suponerse que aplicar factor de crecimiento de endotelio vascular en las áreas de anastomosis de una traqueoplastia o autotrasplante traqueal estimulará la angiogénesis, mejorará la revascularización y la cicatrización traqueal.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios macroscópicos, microscópicos e inmunohistoquímicos producidos en la cicatriz de la anastomosis de traqueoplastias o autotrasplante de seis anillos de tráquea cervical en ratas, después de la aplicación tópica de factor de crecimiento de endotelio vascular.

\* Departamento de Otorrinolaringología.

\*\* Departamento de Cirugía Experimental.

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

\*\*\* Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

**Correspondencia:** Dra. Ivette Rodríguez Revilla. Cerrada de San Juan Bosco 70, colonia Huipulco, CP 14370, México, DF. Correo electrónico: ivis812@yahoo.com.mx

Recibido: noviembre, 2008. Aceptado: enero, 2009.

Este artículo debe citarse como: Rodríguez RI, Olmos ZR, Jasso VR, Soda MA y col. Efecto del factor de crecimiento del endotelio vascular en la cicatrización traqueal (traqueoplastia o autotrasplante) en ratas. An Orl Mex 2009;54(2):55-62.

## Material y método

Se utilizaron 40 ratas Winstar, sanas, sin considerar sexo ni edad, con peso aproximado de 250-300 gramos. Se siguieron las Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana<sup>20</sup> y la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.<sup>21</sup> Estos animales se sometieron a sección de la tráquea cervical a nivel del tercer anillo y anastomosis térmico-terminal del segmento seccionado (traqueoplastia) o a autotrasplante de seis anillos de tráquea cervical. En todos los casos se aplicó solución salina fisiológica o factor de crecimiento de endotelio vascular en las anastomosis, dependiendo del grupo de estudio en el que se incluyeron.

### Grupos de estudio

Los animales se dividieron en cuatro grupos de estudio:

Grupo I (n = 10): traqueoplastia cervical con aplicación tópica de solución salina fisiológica.

Grupo II (n = 10): traqueoplastia cervical con aplicación tópica de factor de crecimiento de endotelio vascular.

Grupo III (n = 10): autotrasplante de seis anillos traqueales cervicales con inmersión del segmento a trasplantar en solución salina fisiológica durante cinco minutos y aplicación tópica de la misma en las anastomosis.

Grupo IV (n = 10): autotrasplante de seis anillos traqueales con inmersión del segmento a trasplantar en el factor de crecimiento de endotelio vascular durante cinco minutos y aplicación tópica del mismo en los sitios de las anastomosis.

### Técnica quirúrgica

Las técnicas quirúrgicas de la traqueoplastia y del trasplante se realizaron con microcirugía a través del microscopio (OPMI 19-FC Carl Zeiss, Faserbeleuchtung, West Germany).

Los animales recibieron anestesia general con 0.5 mg de sulfato de atropina vía IM y pentobarbital sódico (Anestesal, Pfizer) a dosis de 30 mg/kg vía IP.<sup>22</sup> Posteriormente se colocaron sobre la mesa de cirugía en decúbito dorsal.

A través de una incisión longitudinal en la región anterior del cuello, se dividió por planos hasta llegar a la tráquea, que se seccionó en toda su circunferencia.

En los animales en los que se llevó a cabo la traqueoplastia se seccionó a nivel del tercer anillo y se resecó el cuarto, que se utilizó como anillo control para el estudio histológico. En los animales del grupo I se aplicó de forma tópica 1 mL de solución de cloruro de sodio al 0.9% (Pisa) en los extremos proximal y distal de la tráquea seccionada; en los del grupo II se aplicaron 5 µg de factor de crecimiento de endotelio vascular (Human VEGF standard part 890220, RD Systems, Minneapolis, EUA), contenidos en 1 mL de solución salina fisiológica. Finalmente se realizó anastomosis térmico-terminal

con material no absorbible de 7 ceros (Prolene, Ethicon, New Jersey, EUA) y surgete continuo, se verificó que no existieran fugas y se cerró por planos.

En los grupos de autotrasplante se seccionaron segmentos de siete anillos traqueales, del tercero al décimo (el cuarto anillo se utilizó para control histológico), los anillos resecados se sumergieron durante cinco minutos en solución salina fisiológica (grupo III) y en 5 µg/mL de factor de crecimiento de endotelio vascular (grupo IV). Despues se aplicó, respectivamente, en forma tópica cada solución en la tráquea y se realizó la anastomosis del autoinjerto, con el mismo material y técnica de sutura de los grupos I y II; concluidas las anastomosis se llevó a cabo el cierre convencional. La dosis de factor de crecimiento de endotelio vascular aplicada en este estudio es la utilizada en otros ensayos de cicatrización traqueal en conejos.<sup>14</sup>

En el posoperatorio a todos los animales se les aplicó como analgésico flunixin meglumina IM (Finadyne Schering Plough, México) a dosis de 2 mg/kg, durante siete días, y se colocaron en sus cajas de recuperación hasta finalizar el estudio.<sup>22</sup>

Los animales que mostraron signos de dolor agudo o crónico como consecuencia del procedimiento quirúrgico y que no disminuyó con medicamentos recibieron sobredosis anestésica (Anestesal, Pfizer, México).<sup>20,21</sup>

### Evaluación

Todos los animales se analizaron durante cuatro semanas de la siguiente manera:

#### Clínica

Se evaluó diariamente si sufrían enfisema subcutáneo, disnea o dolor.

#### Macroscópica

A las cuatro semanas de la cirugía todas las ratas recibieron sobredosis anestésica, se les evaluó mediante observación directa la integración y cicatrización intraluminal y extraluminal de las anastomosis traqueales, además de la existencia de estenosis, dehiscencia o necrosis.

#### Análisis morfométrico de la luz traqueal (grado de estenosis traqueal)

Grado de estenosis. Las tráqueas se extrajeron y se fijaron en formaldehído durante 24 horas, después se colocaron sobre una escala de referencia graduada en milímetros y se realizó el análisis morfométrico con el programa para digitalización de imágenes con software IMAGE (Pro plus 4.0, EUA) para obtener el área de la luz traqueal en mm<sup>2</sup>. Se trazó la circunferencia interna de los anillos proximal y distal a las anastomosis traqueales en las traqueoplastias y en los autotrasplantes, así como las de la porción media del injerto. Se

obtuvo el porcentaje de luz traqueal de cada animal mostrado al final del estudio y se compararon. Los porcentajes siguen la escala propuesta por Freitag y col.<sup>23</sup> grado 1 = 0-25%, estenosis; grado 2 = 26-50%; grado 3 = 51-75% y grado 4 = 76-luz no detectable.

### **Microscópica**

Para la evaluación microscópica se tomaron muestras de las anastomosis de los grupos I y II y de todo el injerto traqueal en los grupos III y IV, las cuales se fijaron en formaldehído al 10% durante 24 horas; se incluyeron en parafina y se les realizaron cortes de 4 micras que se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson y se evaluó la existencia de vasos de neoformación, inflamación, necrosis, cambios epiteliales y la formación de tejido de granulación y de fibras de colágeno.

### **Evaluación inmunohistoquímica de la angiogénesis**

En este estudio se cuantificó *in situ* la cantidad de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) producido por los vasos de neoformación en los sitios de las anastomosis de los cuatro grupos de estudio y en la porción media del injerto autotrasplantado. Se utilizó un anticuerpo monoclonal (anti-VEGF 20 µg/mL antibody R&D systems catalog number: AF564), el sistema estreptavidina-biotina-peroxidasa y tinción con aminoetilcarbazol y contratinación con hematoxilina.

La expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular se evaluó a través de su presencia o ausencia en la submucosa de los anillos traqueales. En cada uno de los grupos de estudio se obtuvo un porcentaje al dividir el número de anillos positivos para el VEGF entre el número total de anillos analizados.

Para el análisis histológico e inmunohistoquímico se realizó un estudio doble ciego.

### **Ánalisis estadístico**

El análisis estadístico del grado de estenosis, vasos de neoformación, células inflamatorias, hipertrofia epitelial, fibrosis y cuantificación *in situ* del factor de crecimiento de endotelio vascular en las anastomosis se realizó con las pruebas de Andeva, Tukey y Kruskal Wallis. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos.

## **Resultados**

### **Hallazgos clínicos**

Todos los animales sobrevivieron al procedimiento quirúrgico y 37 al tiempo de estudio con una evolución clínica satisfactoria. Los otros tres animales, de los cuales dos (20%) fueron del grupo II y uno (10%) del grupo IV, tuvieron que sacrificarse el día 21 de la cirugía debido a disnea grave.

### **Hallazgos macroscópicos**

Ningún animal tuvo necrosis o dehiscencia de la anastomosis. Todas las ratas del grupo I (traqueoplastia con solución salina fisiológica) y del grupo III (autotrasplante con solución salina fisiológica) desarrollaron moderada cantidad de tejido fibroso de consistencia laxa sobre la adventicia traqueal y cicatrización adecuada de las anastomosis. La mucosa también se apreció bien cicatrizada.

El 100% de los animales del grupo II (traqueoplastia con factor de crecimiento de endotelio vascular, VEGF) y 90% del grupo IV (autotransplante con VEGF) desarrollaron moderada cantidad de tejido fibroso de consistencia laxa alrededor de la tráquea. Además, 60 y 90% de los casos del grupo II y IV, respectivamente, mostraron cicatrización adecuada de la adventicia y de la mucosa, pero 40% de las ratas del grupo II y 10% del grupo IV mostraron la tráquea en forma de “reloj de arena” en el sitio de la anastomosis, con la mucosa completamente fibrosada (figura 1).

### **Hallazgos morfométricos de la luz traqueal (grado de estenosis traqueal)**

Al final del estudio se observó que la luz traqueal disminuyó significativamente en todas las anastomosis de los cuatro grupos de estudio ( $p < 0.01$  Andeva, Tukey), en comparación con sus anillos controles. Al comparar dentro de cada grupo, no hubo diferencia significativa ( $p = \text{NS}$  Andeva, Tukey, figura 2).

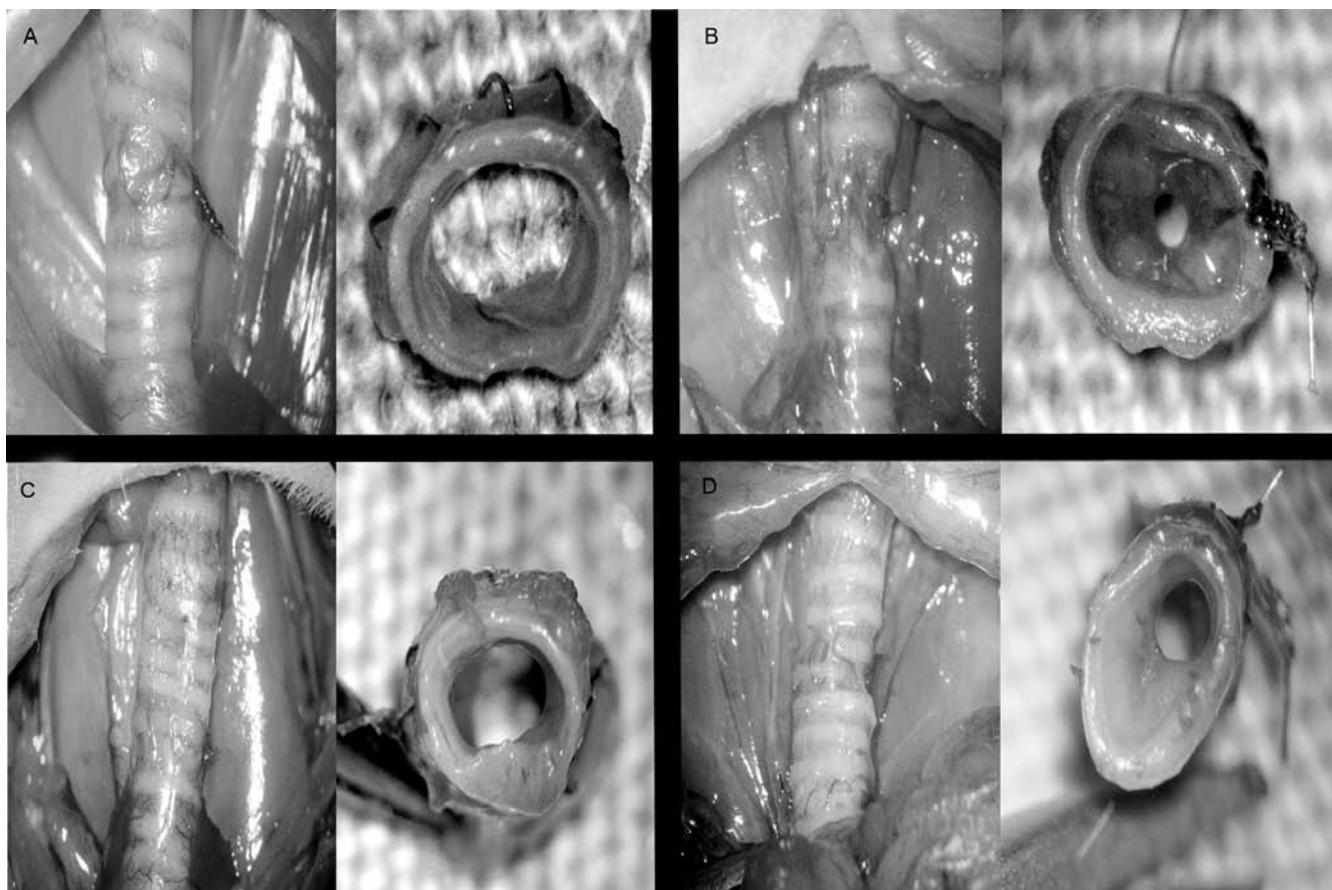
Al comparar entre grupos se observó que las anastomosis de los grupos II, III y IV mostraron estenosis traqueal de grado 2 a 3, que fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$  Andeva, Tukey) en comparación con el grupo I y las porciones medias de los injertos trasplantados ( $p < 0.05$  Andeva, Tukey, figuras 1 y 2).

### **Hallazgos microscópicos**

Todas las anastomosis de los grupos I y III, 60% del grupo II y 80% del grupo IV tuvieron buena cicatrización, caracterizada por formación de delgadas fibras de colágeno organizadas de forma unidireccional y en cantidad moderada (figura 3A). Sin embargo, 40% de los animales del grupo II tuvo fibrosis moderada con fibras de colágeno totalmente desorganizadas y 20% del grupo IV padeció fibrosis grave.

La arquitectura del epitelio de las anastomosis se observó sin alteraciones en 40% de los casos del grupo I y 50% del grupo III. En la mitad de los animales de los grupos I y III, así como en 100 y 90% de los grupos II y IV, respectivamente, el epitelio se mostró adelgazado y con cilios aplastados. En un caso (10%) del grupo I y en otro del IV evolucionó a hiperplasia epitelial (figura 3B). En todos los casos del grupo II hubo separación del epitelio y pericondrio.

Con respecto a la inflamación, 40 y 100% de los animales del grupo I y III, respectivamente, mostraron infiltrado



**Figura 1.** Cicatrización de la adventicia y de la luz traqueal al final del estudio en los animales con traqueoplastia (A y B) y autotrasplante traqueal tratados con factor de crecimiento de endotelio vascular (C y D).

inflamatorio linfocitario leve en la lámina propia y en 100% de los grupos II y IV el infiltrado fue grave. Además, un animal (10%) del grupo I y 3 (30%) del grupo IV mostraron neutrófilos en el epitelio. Asimismo, dos animales (20%) del grupo II y IV, así como uno (10%) del grupo III tenían células gigantes a cuerpo extraño en el perímetro de las suturas (figura 3C).

**Angiogénesis.** En todos los grupos hubo formación de nuevos vasos sanguíneos, en comparación con los anillos controles, pero se observó mayor número en los grupos tratados con factor de crecimiento de endotelio vascular (II y IV, figura 3D).

Al comparar los hallazgos histológicos dentro de cada grupo y entre grupos, la fibrosis, arquitectura del epitelio, presencia de neutrófilos y de células gigantes a cuerpo extraño no mostraron cambios estadísticamente significativos ( $p = \text{NS}$  Andeva, Tukey, Kruskal Wallis). Sin embargo, el hallazgo de infiltrado linfocitario grave y la neoformación de vasos sanguíneos en los grupos II y IV mostraron una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los grupos I y II ( $p < 0.001$  Andeva, Tukey, Kruskal Wallis).

#### Hallazgos inmunohistoquímicos

En los cuatro grupos de estudio y en la porción media del injerto autotrasplantado se observó que hubo producción de factor de crecimiento de endotelio vascular; sin embargo, en el grupo IV la expresión de éste fue significativamente mayor que en los otros tres grupos de estudio ( $p < 0.01$ , Andeva, Tukey, Kruskal Wallis, figura 4).

#### Discusión

A pesar del uso de múltiples técnicas quirúrgicas desarrolladas desde el siglo pasado, la reparación de defectos traqueales mayores a 6 cm representa un problema sin resolver, ya que frecuentemente evoluciona hacia fibrosis y estenosis. Desafortunadamente, en varias ocasiones la extensión de la afección no permite realizar anastomosis término-terminal, por lo que se tiene que recurrir al trasplante.<sup>2,4,23,24</sup>

El trasplante traqueal es la técnica quirúrgica ideal para la reparación de lesiones extensas, pero no se tiene el éxito deseado porque la mayor parte de las veces el injerto se necrosa o estenosa por alteraciones derivadas de la isquemia.<sup>3,5,10</sup>

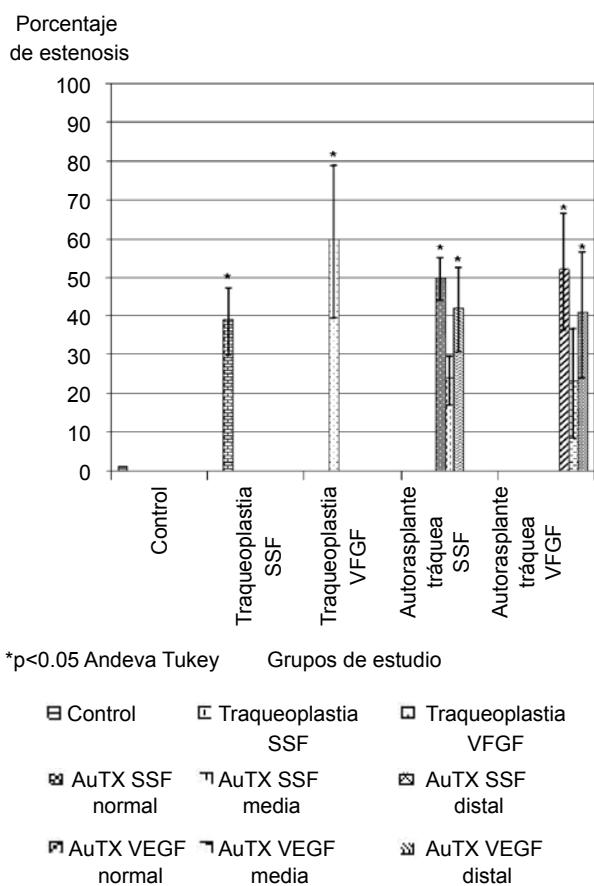


Figura 2. Grado de estenosis en los cuatro grupos al final del estudio.

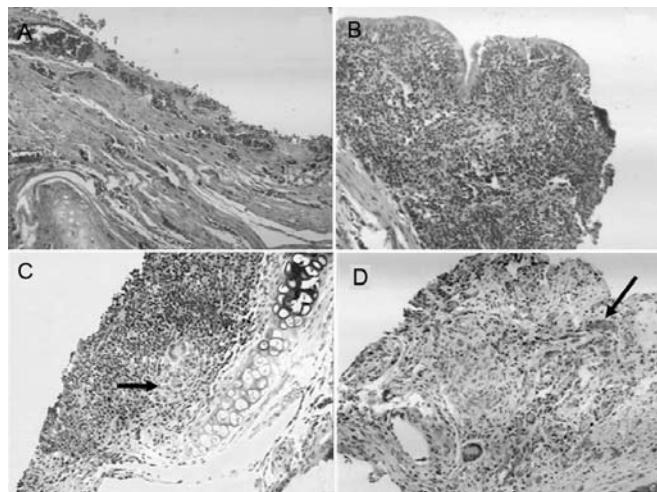


Figura 3. Fotomicrografía que muestra A) pérdida parcial del epitelio, lámina propia con hemorragia y congestión aguda y depósito de colágeno (Masson 10x); B) epitelio hiperplásico e infiltrado inflamatorio linfocitario agudo (H-E 10x); C) célula gigante a cuerpo extraño (flecha), ausencia de epitelio (Masson 10x); D) vasos sanguíneos de neoformación (Masson 10x).

La revascularización del injerto traqueal se inicia en el sitio de la anastomosis y se distribuye de forma centrípeta

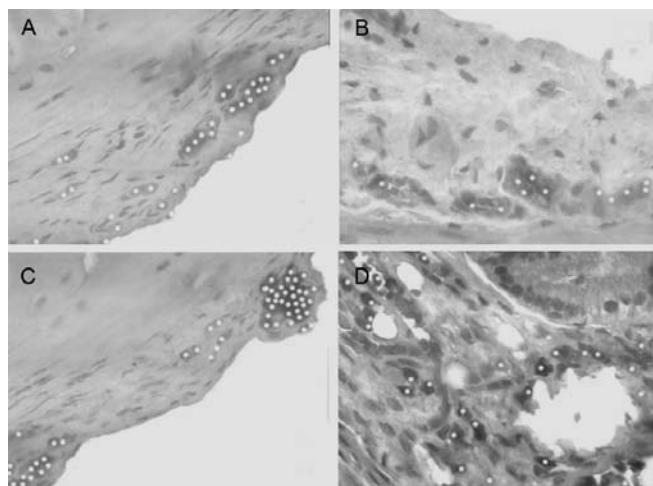


Figura 4. Microfotografía en la que se observa la expresión positiva del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) por inmunohistoquímica (puntos blancos) en la submucosa traqueal de los animales tratados con solución salina fisiológica (A, 10X y B, 40X) y con VEGF (C, 10X y D, 40X).

a todas las regiones de la tráquea; no obstante, en algunas ocasiones la pared anterior de la tráquea sufre daño isquémico, porque los vasos sanguíneos que la nutren se encuentran distales a las arterias intercartilaginosas transversas anteriores y no alcanzan a neoformarse.<sup>2,9</sup>

Para tratar de solucionar este problema se han realizado diferentes trabajos experimentales con poco éxito,<sup>4,9</sup> aunque algunos autores han descrito el uso de factores de crecimiento con buenos resultados debido a que éstos modulan la reparación tisular, promueven la proliferación celular y la quimiotaxis de células inflamatorias.<sup>17,25</sup> Entre estos factores de crecimiento el factor de endotelio vascular (VEGF) tiene un papel importante en la angiogénesis (promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes) y el aumento de la permeabilidad vascular si hay isquemia e hipoxia para disminuir el daño tisular.<sup>26,27</sup> En este trabajo se realizó la aplicación tópica de VEGF en las anastomosis de traqueoplastias o autotrasplantes de seis anillos traqueales en ratas con el propósito de incrementar el proceso natural de formación de vasos sanguíneos colaterales en los sitios seccionados, con el fin de mejorar su cicatrización y evitar las complicaciones secundarias a la isquemia del injerto. Los hallazgos clínicos y macroscópicos observados en este estudio mostraron una adecuada cicatrización de la porción externa de la tráquea (adventicia) en todos los grupos de estudio, lo que coincide con lo descrito por otros autores.<sup>3,14</sup> Sin embargo, cuando se aplicó tópicamente el VEGF (principalmente en los grupos de traqueoplastia), el sitio de las anastomosis sufrió contracción de los bordes de la tráquea y estenosis por fibrosis, lo que condujo a una formación de "reloj de arena" en la anastomosis de la tráquea y, por tanto, obstrucción de la

vía aérea. Estos hallazgos coinciden con lo descrito por Torres y col.<sup>28</sup> y Grillo<sup>2</sup> que estudiaron la cicatrización traqueal en los diferentes procedimientos quirúrgicos, pero no coinciden con los resultados descritos por Olmos<sup>3</sup> y Dodge<sup>14</sup> que han trabajado con factores de crecimiento en cirugía y trasplante traqueal.

La gran disminución de la luz traqueal, observada mediante el estudio macroscópico y morfométrico en los grupos a los que se aplicó factor de crecimiento de endotelio vascular, probablemente se produjo porque la cantidad de factor de crecimiento que se retiene en el tejido traqueal provocó estimulación excesiva de la angiogénesis, hiperpermeabilidad vascular y mala cicatrización. Los hallazgos observados en este estudio coinciden con los descritos por Pokharel<sup>29</sup> y Walner,<sup>17,25</sup> quienes evaluaron la presencia de factores de crecimiento en estenosis laringotraqueales.

Los resultados encontrados durante la realización de esta investigación son diferentes a los relatados por Dodge y colaboradores,<sup>14</sup> quienes llevaron a cabo un estudio en conejos, en los que aplicaron tópicamente factor de crecimiento de endotelio vascular en un segmento elíptico de la pared anterior de seis anillos traqueales y no en toda la circunferencia traqueal, es probable que por eso no observaron estenosis. Puede inferirse que esa disminución de la luz traqueal fue provocada porque el aumento de la permeabilidad vascular mediado por el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) promueve la liberación de células inflamatorias y otros factores de crecimiento al sitio de daño.<sup>30</sup> Desde el punto de vista histológico, a diferencia de lo descrito por otros autores,<sup>20</sup> en nuestro estudio las anastomosis de los grupos a los que se les aplicó el VEGF mostraron aumento marcado en la vascularidad así como un infiltrado inflamatorio crónico severo, el cual posiblemente fue provocado por el VEGF que promueve una sobreregulación de varias moléculas de adhesión celular del endotelio, quimioatracción de monocitos y macrófagos que favorecen el infiltrado leucocitario y porque, además, incrementa la permeabilidad de vasos linfáticos (que en condiciones fisiológicas están colapsados) que facilitan el transporte linfático hacia la matriz extracelular, retraso en el alivio del edema y de la inflamación.<sup>30,31</sup> En relación con las células gigantes a cuerpo extraño en la zona de las suturas, puede pensarse que esto fue ocasionado por una respuesta de inflamación crónica granulomatosa, en la cual el polipropileno con el que se llevó a cabo la sutura de las anastomosis traqueales actuó como irritante y, como no es digerible, provocó la fusión de los macrófagos que lo dirigieron y por eso formaron las células gigantes a cuerpo extraño. Estos hallazgos coinciden con lo descrito por Peacock, quien estudió el control de la cicatrización y formación de cicatrices en pacientes quirúrgicos.<sup>32</sup> En el análisis inmunohistoquímico, en

todos los grupos de estudio se manifestó el VEGF, y fue más significativo en los grupos que se aplicó este factor, lo cual es similar a lo observado en el estudio realizado por Dodge,<sup>14</sup> que lo utilizó en tráqueas; y a lo descrito por Galiano, quien aplicó el mismo factor de crecimiento en heridas de pacientes diabéticos.<sup>27</sup> Con respecto a la expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular en los grupos que recibieron solución salina fisiológica, coincide con lo descrito por otros autores que mencionan que la producción de VEGF es normal en el proceso de reparación de cualquier herida, ya que existe una respuesta angiogénica para facilitar una adecuada cicatrización, así como la neoformación de vasos sanguíneos principalmente alrededor de las líneas de sutura.<sup>30,33,34</sup>

Se concluye que la aplicación tópica durante cinco minutos de factor de crecimiento de endotelio vascular en la tráquea e injertos traqueales transplantados promueve la neoformación de vasos sanguíneos y evita la necrosis de los mismos. Sin embargo, al parecer, estimula la inflamación crónica, así como la expresión de otros mediadores químicos que promueven la formación de cicatrices fibróticas, las cuales ocluyen la luz traqueal, por lo que deben realizarse otros estudios para determinar la dosis y el tiempo ideal de aplicación del factor de crecimiento de endotelio vascular, así como investigar qué mediadores químicos son liberados por estímulo de este factor para identificar cuáles de ellos influyeron en la producción de estenosis observada en este estudio.

## Referencias

1. Soda MA, Delgado A, Morales J. Manejo quirúrgico de las estenosis traqueales. *Gac Med Mex* 1994;130:386-9.
2. Grillo H. Development of tracheal surgery: A historical review. Part 1: Techniques of tracheal surgery. *Ann Thorac Surg* 2003;75:610-9.
3. Olmos JR, Eguiza V, Jasso R, Sotres A, et al. Trasplante experimental de tráquea cervical combinado con la aplicación de factor de crecimiento de fibroblastos. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2006;19:172-9.
4. Genden E, Gannon P, Smith S, Keck N, et al. Microvascular transfer of long tracheal autograft segments in the canine model. *Laryngoscope* 2002;112:439-44.
5. Salmeron J, Gannon PJ, Blackwell KE, et al. Tracheal transplantation: superior and inferior thyroid artery perfusion territory. *Laryngoscope* 1998;108:849-53.
6. Delaere PR, Liu Z, Feenstra L. Tracheal autograft revascularization and transplantation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:1130-6.
7. Rose KG, Sesterhenn K, Wustrow F. Tracheal allotransplantation in man. *Lancet* 1979;1:433-6.
8. Deleare P, Liu ZY, Hermans R, Sciot R, Feenstra L. Experimental tracheal allograft revascularization and transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:728-37.
9. Camara S, Verissimo F, Mamede M, Llorach M. Time

- necessary for neovascularization of a tracheal segment by the sternohyoid muscle. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;125:201-4.
10. Park YS, Lee DY, Paik HC, Bae KM, Cho SH. The role of omentopexy in tracheal transplantation in dogs. *Yonsei Med J* 1996;37:118-24.
  11. Lenot B, Macchiarini P, Darteville P. Tracheal transplantation: An experimental technique with revascularisation and venous drainage. *Transplant Proc* 1995;27:1684-5.
  12. Albes J, Klenzer T, Kotzerke J, et al. Improvement of tracheal autograft revascularization by means of fibroblast growth factor. *Ann Thorac Surg* 1994;57:444-9.
  13. Gospodawicz D, Neufeld G, Schweigerer L. Fibroblast growth factor: structural and biologic properties. *J Cell Physiol* 1987;5(Suppl.):15-26.
  14. Dodge-Khatami A, Backer C, Holinger L, Mavroudis C, et al. Healing of a free tracheal autograft is enhanced by topical vascular endothelial growth factor in a rabbit model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:554-61.
  15. Knox A.J, Corbett L, Stocks J, Holland E, et al. Human airway smooth muscle cells secrete vascular endothelial growth factor: up-regulation by bradykinin via a protein kinase C and prostanoid-dependent mechanism. *Faseb J* 2001;15:2480-8.
  16. Koyama S, Sato E, Tsukadaira A, Haniuda M, et al. Vascular endothelial growth factor mRNA and protein expression in airway epithelial cell lines *in vitro*. *Eur Respir J* 2002;20:1449-56.
  17. Walner LD, Heffelfinger SC, Stern Y, Abrams MJ, et al. Potential role of growth factors and extracellular matrix in wound healing after laryngotracheal reconstruction. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122:363-6.
  18. Restucci B, Papparella S, Maiolino P, De Vico G. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 2002;39:488-93.
  19. Corral C, Siddiqui A, Wu L, Farrel C, et al. Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing. *Arch Surgery* 1999;134:200-5.
  20. 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.
  21. National Institutes of Health USA. Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health USA. Edición Mexicana Auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. México, DF, 2002.
  22. Academy of Surgical Research. Course of animal anesthesia and models. Memories of the Course of Animal Anesthesia and Models of the 12<sup>th</sup> Annual Meeting and 1<sup>st</sup> International Conference of the Academy of Surgical Research; October 1996: Muenster, Germany. Academy of Surgical Research, 1996.
  23. Freitag L, Ernst A, Unger M, Kovitz K, Marquette CH. A proposed classification system of central airway stenosis. *Eur Respir J* 2007;30:7-12.
  24. Lenot B, Macchiarini P, Dulmet E, Weiss M, Darteville P. Tracheal allograft replacement. An unsuccessful method. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993;7:648-52.
  25. Walner D, Cotton R, Willging P, Bover K, Toriumi D. Model for evaluating the effect of growth factors on the larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;120:78-83.
  26. Ozerdem U, Stallcup WB. Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. *Angiogenesis* 2003;6:241-9.
  27. Galiano R, Tepper O, Pelo C, Bhatt K, et al. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol* 2004;164:1935-47.
  28. Torres T, Santillán P, Salazar M, Villalba J, et al. Resección y doble anastomosis traqueal (Estudio experimental). *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1991;4:9-14.
  29. Pokharel R, Maeda K, Yamamoto T, Noguchi K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in exuberant tracheal granulation tissue in children. *J Pathol* 1998;188:82-86.
  30. Lazaraous D, Shou M, Scheinowitz M, Hodge E, et al. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the response to injury. *Circulation* 1996;94:1074-82.
  31. Kunstfeld R, Hirakawa S, Honig K, Schacht T, et al. Induction of cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions in VEGF-A transgenic mice results in chronic skin inflammation associated with persistent lymphatic hyperplasia. *Blood* 2004;104:1048-57.
  32. Peacock EE. Control of wound healing and scar formation in surgical patients. *Arch Surg* 1981;116:1325-9.
  33. Nissen N, Polverini P, Koch A, Volin M, et al. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 1998;152:1445-52.
  34. Sotres A, Jasso R, Villalba J, Olmos JR, et al. Cryopreserved tracheal grafts: A review of the literature. *J Invest Surg* 2006;19:125-35.