

# Reemplazo traqueal con aorta bovina criopreservada. Estudio experimental

J. RAÚL OLMOS-ZÚÑIGA\* ✉  
JAIME VILLALBA-CALOCA†  
AVELINA SOTRES-VEGA\*  
MIGUEL GAXIOLA-GAXIOLA§  
ALFREDO SANTIBÁÑEZ-SALGADO\*  
MATILDE BALTAZARES-LIPP\*  
MANUEL BAÑUELOS-MORENO\*  
CLAUDIA HERNÁNDEZ JIMÉNEZ\*  
ROGELIO JASSO-VICTORIA\*

\* Departamento de Investigación en Cirugía Experimental, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

† Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental, INER.

§ Departamento de Investigación en Morfología, (INER).

Trabajo recibido: 09-XII-2009; aceptado: 18-II-2010

Conflicto de intereses: ninguno

171

## RESUMEN

**Antecedentes:** El reemplazo traqueal es un reto para el cirujano de tórax. Se han utilizado materiales sintéticos y biológicos sin buenos resultados, por lo que es necesario buscar la prótesis ideal, sintética o biológica, que restablezca la continuidad de la tráquea.

**Palabras clave:** Reemplazo traqueal, alotrasplante traqueal, xenotrasplante traqueal, aorta bovina criopreservada.

**Key words:** Tracheal replacement, tracheal allotransplantation, tracheal xenotransplantation, cryopreserved bovine aorta.

**Objetivo:** Evaluar la integración y los cambios macroscópicos y microscópicos de un injerto de aorta bovina criopreservada usada para reemplazar un segmento de tráquea cervical en perros.

**Material y métodos:** Se operaron 12 perros: los del grupo I ( $n = 6$ ) se sometieron a alotrasplante de 8 anillos traqueales y los del grupo II ( $n = 6$ ) a xenotrasplante traqueal con injerto de aorta bovina criopreservada. Los animales del grupo I recibieron triple inmunosupresión (azatioprina, metilprednisolona, ciclosporina). Se evaluaron clínica, radiológica y traqueoscópicamente por 4 semanas. Al final del estudio los injertos trasplantados se evaluaron macroscópicamente y microscópicamente.

**Resultados:** Ningún animal concluyó su tiempo de estudio. Traqueoscópica y macroscópicamente todos

## ABSTRACT

**Background:** Tracheal replacement remains a challenge for thoracic surgeons. Synthetic and biological substitutes have been used without satisfactory results, and therefore it is necessary to find the ideal prosthesis, synthetic or biological, to reestablish tracheal continuity.

**Objective:** To assess the integration and macroscopic and microscopic changes of cryopreserved bovine aorta used to replace a segment of cervical trachea in dogs.

**Material and methods:** Twelve dogs were operated: In group I ( $n = 6$ ) dogs were submitted to an 8-rings tracheal allotransplantation, and in group II ( $n = 6$ ) dogs received tracheal xenotransplantation with cryopreserved bovine aorta. Animals from group I received triple immunosuppressive therapy (azathioprine, methylprednisolone, cyclosporine). Clinical, radiological and tracheoscopic evaluations were accomplished during 4 weeks. At the end of the study, macroscopic and microscopic evaluations were done on the transplanted grafts.

**Results:** None of the animals completed the study period. Tracheoscopy and macroscopic evaluation showed necrosis and fistulae formation in all grafts. Microscopically they had necrosis, inflammation, vas-

los injertos desarrollaron fístulas y necrosis. Microscópicamente mostraron necrosis, inflamación, vasculitis, hemorragia y destrucción del cartílago. Los injertos de aorta presentaron necrosis generalizada.

**Conclusión:** Con lo observado en este estudio se puede concluir que no es viable utilizar xenoinjertos de aorta bovina criopreservada para la sustitución de segmentos traqueales, debido a que se necrosan y fistulizan por la falta de aporte sanguíneo o por rechazo. Se tienen que realizar más estudios modificando la técnica de criopreservación y descongelación del injerto, así como la aplicación de inmunosupresión en los animales receptores del xenoinjerto.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades traqueales, tanto de etiología traumática, cicatricial, neoplásica, congénita o idiopática, cuya sintomatología principal viene determinada por la estenosis de la luz traqueal y obstrucción del flujo aéreo, requieren de la resección y reanastomosis del segmento traqueal afectado patológico.<sup>1,2</sup> Sin embargo, en ocasiones la lesión traqueal es tan extensa que no es posible practicar anastomosis término-terminal y se tiene que recurrir a la implantación de una prótesis o a la realización de trasplante.<sup>3,4</sup>

Con respecto al trasplante traqueal se ha dificultado por tres causas: la preservación, inmunosupresión y revascularización de injerto, esta última porque al llevar a cabo el trasplante se suprime el aporte sanguíneo, y dado que la tráquea no posee una circulación sistémica ni local (ya que está dada por plexos), su proceso de cicatrización se altera.<sup>5,6</sup>

Los intentos para desarrollar prótesis traqueales a lo largo de este siglo han sido numerosos y se han utilizado materiales como el titanio, polietileno, silicón, marlex, vidrio y teflón, pero ninguno de ellos ha demostrado ser el ideal, debido a que permiten el escape de aire, no son lo suficientemente rígidos y se colapsan, no favorecen la movilización adecuada de las secreciones y favorecen complicaciones, como infecciones, formación de tejido de granulación y la obstrucción del tubo protésico.<sup>7</sup>

Actualmente, con el desarrollo de nuevas técnicas de preservación de órganos y con la in-

culitis, hemorrhage and cartilage destruction. Aorta grafts developed total necrosis.

**Conclusion:** Results from this work indicate that xenografts of cryopreserved bovine aorta are not useful for tracheal segments replacement, since ischemia or graft rejection lead to necrosis and fistulae formation. More research has to be done by modifying cryopreservation and thawing processes, as well as the application of immunosuppressive therapy in the xenograft-receiving animal.

geniería de tejidos se ha investigado el uso de varias técnicas, entre las que sobresale la *criopreservación*, método que permite mantener las características morfológicas de diferentes tejidos, disminuyen la antigenicidad y rara vez se infectan, mantiene viables los fibroblastos con lo cual teóricamente estos injertos pueden tener potencial de crecimiento. Esta técnica de preservación ha sido utilizada principalmente para la elaboración de bioprótesis para cirugía cardiovascular.<sup>8-10</sup>

Con base en lo anterior y considerando que los injertos vasculares criopreservados se mantienen viables y no se rechazan, se puede pensar que el criopreservar aortas bovinas permitirá obtener una prótesis traqueal que se integre bien a los tejidos del huésped, no permita el escape de aire por las anastomosis, sea lo suficientemente rígida para evitar que se colapse y permita el paso de aire hacia los pulmones.

## Objetivo

Evaluar en un modelo experimental canino, la integración, cambios traqueoscópicos, macroscópicos y microscópicos de un segmento de aorta bovina criopreservada después de ser trasplantada en la tráquea.

## Obtención de la aorta bovina

Las aortas bovinas se obtuvieron de bovinos entre 2-3 años de edad (rastro de Temamatla, Estado de México) [debido a que en esta edad hay menos acumulación de grasa y formación de

calcificaciones], sin importar sexo, ni raza, recién sometidos a eutanasia con una pistola de perno cautivo de penetración, los cuales no presentaban ninguna enfermedad o residuos, o trazas de sustancias farmacológicamente activas en sus tejidos, como lo establece la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995 para el *Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres*.<sup>11</sup> Inmediatamente después se realizó limpieza manual para retirar el exceso de grasa y el vaso se sumergió en solución de NaCl al 0.9% a 4 °C para su transporte al laboratorio, donde mediante disección se retiró la grasa y tejido conectivo restante.

### Criopreservación de la aorta

Inmediatamente después de la procuración, las aortas se enjuagaron con una solución con glucosa al 50% (solución DX-50, PISA, Guadalajara, Jal., México) adicionada con 5,000 U de heparina (inhepar, PISA, Guadalajara, Jal., México), 1 g de estreptomina (sulfastrep, PISA, Guadalajara, Jal, México) y 1'000,000 UI de penicilina por cada litro de solución y se colocaron dentro de un criotubo que contenía medio F12-K (GIBCO, 217-00-075) adicionado con 10% de dimetil sulfóxido (SIGMA, D2650), 20% de suero bovino fetal (GIBCO, 16000-044), 20% de una solución de ácido hialurónico al 0.1% (FLUKA, 53730) y una solución antibiótica-antimicótica (SIGMA, A5955). Acto seguido los criotubos se introdujeron en una hielera para disminuir la temperatura de congelación de manera gradual (-1 °C/min), posteriormente se metieron en un congelador durante 48 h, a -70 °C y finalmente se sumergieron en nitrógeno líquido a -196 °C para su criopreservación y allí se mantuvieron durante 15 días. Transcurrido este tiempo fueron descongeladas y utilizadas como injertos.<sup>12</sup>

### Animales de experimentación

Se utilizaron 12 perros mestizos con un peso entre 15 y 25 kg, que se manejaron de acuerdo con las reglas de la Norma Oficial Mexicana para el Uso de Animales de Laboratorio<sup>13</sup> y la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* de Estados Unidos.<sup>14</sup>

### Grupos de estudio

Los animales fueron divididos en dos grupos de estudio:

*Grupo I* ( $n = 6$ ): alotrasplante de 8 anillos de tráquea cervical (AT).

*Grupo II* ( $n = 6$ ): resección de un segmento de 8 anillos traqueales cervicales y colocación de xenoinjerto de aorta bovina criopreservada (ABC) de las mismas dimensiones.

### Técnicas quirúrgicas

#### Anestesia

Los animales fueron anestesiados con 0.1 mg/kg de hidrocloruro de xilacina (rompun, Bayer, Leverkusen, Alemania) y 6 mg/kg de propofol (diprivan, Astra Zeneca, Edo. México, México) vía intravenosa (iv) e inmediatamente después se les aplicó 28 mg/kg iv de dipirona (alnex, Pisa, Hidalgo, México) como analgésico.<sup>15,16</sup> Una vez anestesiados se colocaron sobre la mesa de cirugía en posición decúbito dorsal, se intubaron con una sonda orotraqueal (endotracheal tube, Rush, Kamunting, Malasia) y la anestesia se mantuvo con isoflurano al 1.5% (dorin, Halocarbon, Augusta, USA). Al momento de estar realizando las anastomosis se introdujo otra cánula en la porción baja de la tráquea para mantener la ventilación y anestesia de los animales.

#### Obtención del segmento traqueal del donador

En el grupo I los animales actuaron simultáneamente como donadores y receptores. Para la obtención del segmento traqueal a trasplantar se realizó una incisión media en la región cervical ventral, se disecó el tejido celular subcutáneo, platisma y planos musculares hasta llegar a la tráquea. Ésta se disecó en toda su circunferencia y se le reseco un segmento de 10 anillos, los cuales se sumergieron en solución salina fisiológica y se procedió a trasplantarlos. Antes de realizar el trasplante se tomaron 2 anillos traqueales para su utilización como control en la evaluación microscópica.

## Trasplante y colocación del injerto

En los dos grupos los injertos traqueales fueron realizados de la misma manera. El segmento traqueal que se resecó se obtuvo de la misma forma que el injerto traqueal de los donadores, aunque únicamente se resecaron 8 anillos traqueales (de éstos se usaron 2 anillos para control histológico), sustituidos con el aloinjerto traqueal o con la ABC, que fueron anastomosados con puntos separados de material de sutura absorbible de polidioxanona 4-0 (PDS, Ethicon, New Jersey, USA), iniciándose con la anastomosis proximal y concluyendo con la distal. Finalizado el trasplante se continuó con el cierre convencional. Se dejó que los animales se recuperaran de la anestesia y se trasladaron a un cuarto de recuperación en donde se les aplicó dipirona (28 mg/kg) como analgésico iv y se les administró antibioticoterapia a base de enrofloxacin (baytril, Bayer) a dosis de 5 mg/kg IM durante siete días.<sup>15,16</sup>

Previo a la colocación de los injertos de ABC, se descongelaron en sus criotubos dentro de un baño María a 37 °C por 10 min y después enjuagados con solución salina también a 37 °C. Además, se les tomaron muestras para histología y cultivo microbiológico en agar sangre y agar papa para el aislamiento de bacterias y hongos, respectivamente.

## Inmunosupresión

Los animales del grupo I, un día antes recibieron inmunosupresión a base de 2 mg/kg/día de azatioprina (imuran, Glaxo Smith Kline, Londres, Inglaterra), 2 mg/kg/día de metilprednisolona (meticorten, Schering-Plough, México, D.F.) más 15 mg/kg/día de ciclosporina A (sandimmun Neoral, Novartis, Basle, Switzerland) y ésta se mantuvo hasta el final del estudio.<sup>17,18</sup>

## Evaluación

### Clínica

Se realizó evaluación clínica diaria durante la primera semana posoperatoria y cada tercer día por el tiempo restante del estudio. Se evaluó la presencia de estridor, infección y sangrado de la

herida quirúrgica, así como la presencia de disnea de acuerdo a una escala modificada a la utilizada por la Medical Research Council,<sup>19</sup> la cual se basa en la severidad de ésta: 0 = sin disnea después de correr; 1 = disnea después de correr; y 2 = disnea en reposo.

### Radiográfica

Se tomaron placas de rayos X laterales de cuello previo e inmediatamente después de la cirugía diariamente durante la primera semana poscirugía, y cada tercer día hasta que finalizó el estudio para evaluar radiográficamente la continuidad del injerto trasplantado.

### Traqueoscópica

Los procedimientos se realizaron con los animales bajo anestesia general en los mismos tiempos que los estudios radiológicos para valorar la cicatrización, dehiscencia, infección, formación de fístulas, estenosis o necrosis del injerto. Todas las traqueoscopías fueron videograbadas y se compararon con las controles. La estenosis se evaluó de acuerdo con la escala descrita por Cotton.<sup>20</sup>

### Macroscópica

Finalizado el estudio, los animales se sometieron a eutanasia con sobredosis de pentobarbital sódico (anestesal, Pfizer, Toluca, México)<sup>16</sup> y se realizó evaluación macroscópica y microscópica.

Macroscópicamente se revisó, tanto extraluminal como intraluminalmente el estado de los injertos trasplantados, anastomosis, cicatrización, presencia de dehiscencia, fístulas, infección, rechazo y necrosis.

### Microscópica

Para la evaluación microscópica se tomaron muestras de los injertos y se fijaron en formaldehído al 10%, se incluyeron en parafina, se cortaron a 4µ y se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson para evaluarles por microscopia de luz la cicatrización, presencia de inflamación o fibrosis, rechazo y vasos de neofor-

mación. Todas las muestras se compararon con los controles tomados antes del trasplante.

### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el programa SPSS 13 para Windows (SPSS INC, Chicago IL, USA), utilizando t Student y ANDEVA de una vía para observar las diferencias significativas de las medias de cada grupo.<sup>21</sup> Todos los valores de  $p < 0.05$  se consideraron como significativos.

## RESULTADOS

Todos los animales sobrevivieron al procedimiento quirúrgico, pero no al tiempo de estudio establecido. En el grupo de AT (grupo I) el promedio de sobrevida fue de  $7.3 \pm 1.8$  días, mientras que en el que se colocó el xenoinjerto de ABC (grupo II) fue de  $12.5 \pm 3.7$  días. Al comparar la sobrevida dentro de cada grupo no se observó diferencia significativa; sin embargo, al compararla entre grupos, la mostrada por el grupo II fue superior a la del grupo I ( $p < 0.05$  t Student,  $p < 0.01$  ANDEVA).

### Hallazgos microbiológicos

En el 100% de las muestras estudiadas los cultivos microbiológicos fueron negativos después de 15 días de incubación.

### Hallazgos clínicos

Clínicamente todos los animales del grupo I (100%) y 4 del grupo II (66.6%), mostraron estridor al tercer día posterior al trasplante. Al quinto día presentaron disnea grado 1, la cual evolucionó a grado 2 entre el sexto y séptimo día poscirugía. Mientras que en los animales del grupo II que sobrevivieron 15 y 19 días mostraron disnea grado 1 al día 12 y 15, evolucionando al grado 2 al día 17 y 18, respectivamente. Al comparar el tiempo de manifestación de disnea entre grupos, no fue significativamente diferente ( $p = 0.16$  t Student,  $p = 0.14$  ANDEVA).

Todos los animales se sometieron a eutanasia el día que presentaron disnea grado 2, siguiendo

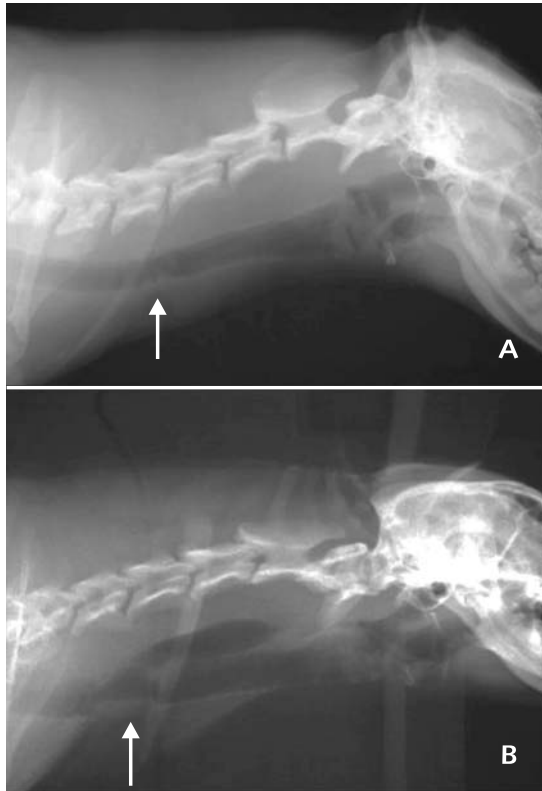
do las reglas de cuidado humanitario de los animales establecido en la Norma Oficial Mexicana para el Uso de Animales de Laboratorio<sup>13</sup> y la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* de Estados Unidos.<sup>14</sup>

En 5 animales del grupo I (83.3%) y 4 del grupo II (66.6%), entre el quinto y séptimo día postrasplante mostraron enfisema subcutáneo y acumulación de exudado purulento en la herida quirúrgica, así como halitosis severa, con excepción del animal del grupo I (16.6%) que sobrevivió más tiempo y mostró este cuadro clínico a los ocho días posteriores al procedimiento quirúrgico, mientras que los perros del grupo II que sobrevivieron 15 y 19 días presentaron estos signos al día 13 y 17. Al comparar entre grupos el tiempo de presentación de estos signos, estos hallazgos tampoco revelaron diferencia significativa ( $p = 0.27$  t Student,  $p = 0.54$  ANDEVA).

### Hallazgos radiográficos

En todos los grupos de estudio las placas de rayos X laterales de cuello tomadas inmediatamente después del procedimiento quirúrgico, mostraron continuidad y permeabilidad del segmento traqueal trasplantado (Figura 1A). En el grupo I, al tercer día posterior a la cirugía en todos los animales (100%) se observó disminución de la luz traqueal, a excepción del animal que sobrevivió 10 días, el cual mostró esta disminución al sexto día poscirugía. También 5 perros de este grupo (83.3%), presentaron pérdida de la continuidad de la tráquea y enfisema subcutáneo en la región cervical entre el día 5 y 7 posterior al trasplante. El animal con más sobrevida (10 días) mostró pérdida de la continuidad del injerto al día 10. En el grupo II, 4 animales (66.6%) presentaron disminución de la luz traqueal al día 6 poscirugía y pérdida de la continuidad de la tráquea, así como enfisema subcutáneo en la región cervical al día 10 posterior al procedimiento quirúrgico (Figura 1B). Los otros dos animales mostraron disminución de la luz traqueal al día 12 y 18, respectivamente y pérdida de la continuidad del injerto con enfisema subcutáneo al día 15 y 18, sin embargo, esto no fue significativo ( $p = 0.20$  t Student,  $p = 0.50$  ANDEVA).





**Figura 1.** A) placa radiográfica lateral de cuello en la que se observa el injerto traqueal (flecha) inmediatamente después de la cirugía; B) muestra la disminución de la luz del injerto traqueal al quinto día poscirugía en un animal del grupo II.

### Hallazgos traqueoscópicos

En los dos grupos, inmediatamente después del procedimiento quirúrgico las anastomosis traqueales se observaron permeables en su totalidad y sin anomalías (Figuras 2A y 2C). Al tercer día poscirugía, el 100% de los injertos trasplantados en el grupo I se observaron isquémicos y al cuarto día mostraron inflamación severa en ambas anastomosis. En 5 animales de este grupo (83.3%) entre el día 5 y 7 postrasplante, se observó la presencia de exudado purulento y formación de fístulas en la porción membranosa de la tráquea a la mitad del injerto trasplantado (Figura 2B). En el animal del grupo I con mayor sobrevivencia, estos hallazgos se observaron al día 10 poscirugía.

En el grupo II, al tercer día poscirugía, 2 animales (33.3%) presentaron los bordes de ambas anastomosis necróticos, además, uno de estos perros mostró pérdida importante de la luz traqueal por colapso del injerto, mientras que en el otro se presentó al día 7. Los otros 4 animales de este grupo (66.66%) al día 7 poscirugía, presentaron disminución de la luz traqueal con los bordes de la anastomosis hiperémicos. Al día 10 posterior al procedimiento quirúrgico, dos de estos animales mostraron oscurecimiento (aparente necrosis) en toda la luz del injerto, así como la presencia de fístulas en la porción media del mismo. Los otros dos perros de este grupo que sobrevivieron más tiempo presentaron disminución de la luz traqueal al día 13 y 17, respectivamente y pérdida de la continuidad del mismo al día 15 y 18 poscirugía (Figura 2D).

Con respecto al porcentaje de disminución de la luz traqueal en ambos grupos fue mayor al 50%. Aunque, al comparar dentro de cada grupo y entre grupos no se observó ninguna diferencia significativa ( $p = 0.27$  t Student,  $p = 0.54$  ANDEVA).

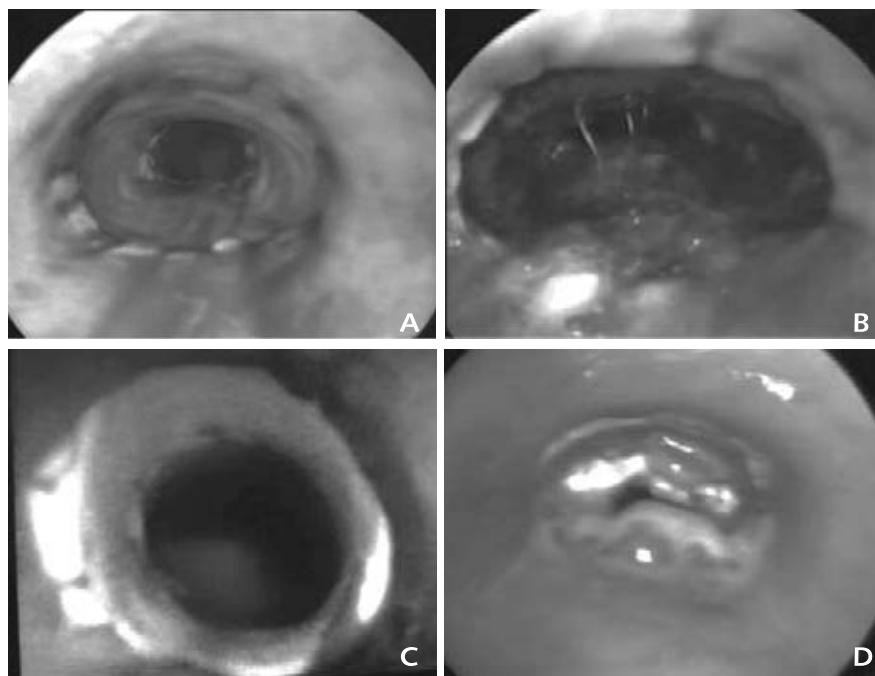
### Hallazgos macroscópicos

En los dos grupos de estudio, el 100% de los animales al final de él mostraron presencia de exudado purulento en el sitio en el que se había colocado el tejido trasplantado, además de la formación de fístulas, necrosis del injerto (Figura 3) y desprendimiento del mismo de sus sitios de anastomosis.

### Evaluación microscópica

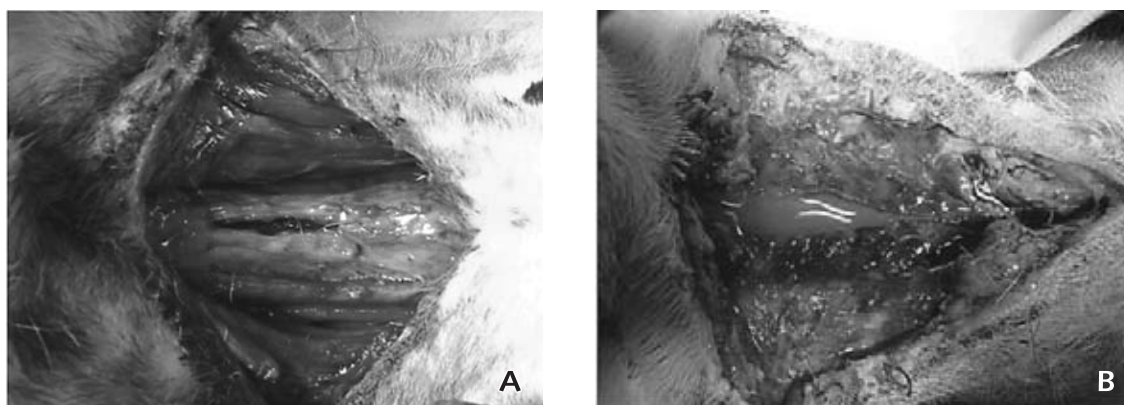
En el estudio histológico de las aortas criopreservadas se observó que sólo el 66.6% (4 arterias) de éstas, después de ser descongeladas mostraron su arquitectura normal y las 2 arterias restantes (33.33%) presentaron zonas de pérdida de la continuidad del endotelio.

Al final del estudio la microscopía de luz, en el 100% de las muestras en el sitio de las anastomosis de ambos grupos reveló la presencia de necrosis en todas la capas de la tráquea, inflamación a base de neutrófilos y linfocitos, vasculitis, hemorragia, mientras que en los injertos de aorta se apreció necrosis total (Figura 4).



**Figura 2.** Traqueoscopia de un animal del grupo I en la que se observa: **A)** injerto completamente permeable inmediatamente postrasplante; **B)** injerto isquémico y con disminución de la luz al final del estudio; **C)** aorta bovina criopreservada del grupo II, inmediatamente después de la cirugía; y **D)** necrosis y pérdida del tono muscular del injerto al final del estudio.

177



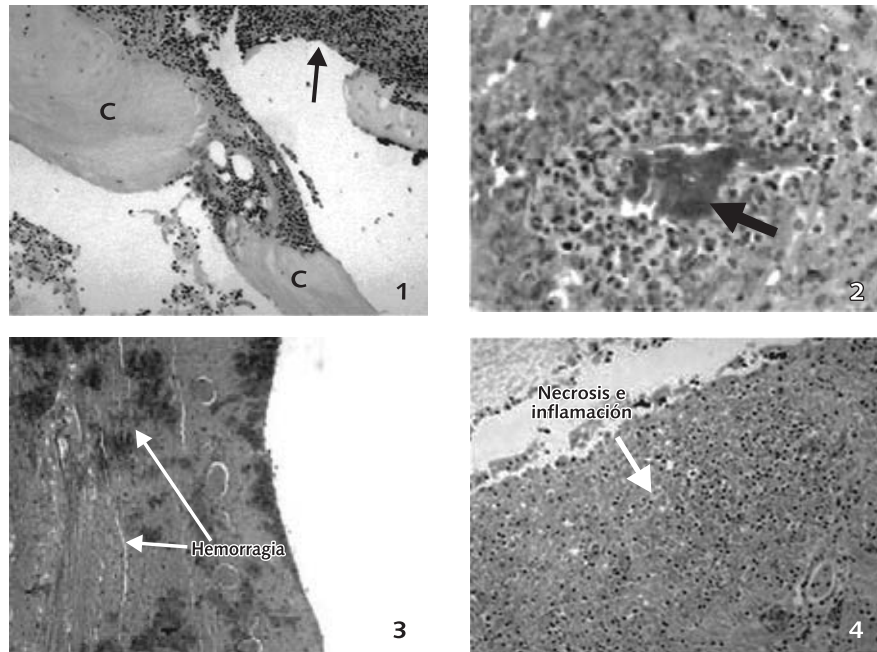
**Figura 3.** Necrosis del injerto traqueal en el grupo I (A) y en el grupo II (B).

## DISCUSIÓN

La mayoría de las lesiones traqueales pueden ser tratadas mediante resección y reconstrucción del segmento traqueal con una anastomosis término-

terminal, pero cuando estas lesiones son muy extensas se tiene que recurrir a la colocación de una prótesis traqueal o un trasplante.<sup>4,22</sup>

La criopreservación es una técnica de preservación de tejidos que se ha aplicado principal-



**Figura 4.** Fotomicrografía que muestra **1)** cartilago destruido y sin condrocitos con abundantes neutrófilos (flecha) (H-e, 10x); **2)** vaso central (flecha) con infiltrado linfocitario, necrosis y hemorragia (H-e, 40x) en un animal del grupo I; **3)** hemorragia de las capas traqueales (H-e, 10x); y **4)** inflamación y necrosis en todas la capas de la tráquea (H-e, 10x) en el grupo II.

mente para la preservación de vasos sanguíneos y ha demostrado que disminuye la antigenicidad, mantienen la integridad y arquitectura de los tejidos y permite que los injertos preservados con estas técnicas se integren bien a los tejidos del huésped.<sup>8,23</sup>

En este trabajo se realizó un estudio experimental en perros a los que se les realizó trasplante traqueal cervical de 8 anillos traqueales (aproximadamente 8 cm de longitud) y a otros se les colocó un xenoinjerto de ABC con el fin de evaluar si la preservación de este tejido permite obtener un injerto que mantenga permeable la luz traqueal y favorezca el paso de aire hacia las vías respiratorias bajas cuando la tráquea presente patología que no pueda ser resuelta con tratamiento médico o traqueoplastia.

En la literatura se ha descrito la utilización de segmentos autólogos de aorta, así como aloinjertos de la misma (tanto frescos como criopreservados) para reemplazar a la tráquea,<sup>24-26</sup> pero no existen reportes en los que se hayan utiliza-

do xenoinjertos de ABC como sustituto traqueal. En este estudio decidimos utilizarlas porque el uso de segmentos autólogos de aorta requiere someter al mismo paciente a dos procedimientos quirúrgicos: uno para la remoción de segmento aórtico, y otro para la colocación del injerto en la tráquea.<sup>27</sup> Además, se utilizaron xenoinjertos (ABC) porque en ocasiones en nuestro medio y por la falta de cultura para la donación de órganos no hay disponibles aloinjertos; asimismo, se decidió utilizar la técnica de criopreservación pues ha demostrado que al preservar aloinjertos con esta técnica, aparte de mantener la integridad de los tejidos, tiene baja antigenicidad y rara vez se infectan,<sup>8,24-26</sup> lo cual sería muy útil en pacientes con cáncer, en quienes se disminuiría la presentación de infecciones y el retraso en la cicatrización del injerto trasplantado producido por la aplicación de inmunosupresores.

Los cultivos microbiológicos de los injertos criopreservados después de 15 días y antes de que fueran utilizados como injertos de tráquea,



fueron negativos debido a que la adición de antibióticos y la temperatura a la que se almacenaron (-196 °C) impidieron el desarrollo de microorganismos en los injertos. Estos hallazgos coinciden con lo descrito por los bancos de tejidos de diferentes países, quienes mencionan que no se presentan infecciones en los injertos, así como después de colocarlos en diferentes tejidos gracias a la adición de antibióticos durante la preparación de los injertos valvulares.<sup>28-30</sup>

La pérdida de la arquitectura histológica (integridad del endotelio) en dos de las aortas criopreservadas fue ocasionada probablemente porque se produjo daño mecánico durante la procuración, el procesamiento de las arterias para su criopreservación, descongelación o durante la colocación del injerto, lo que provocó cambios degenerativos en la pared arterial y correlaciona; además, con lo observado por Herrero,<sup>28</sup> Pegg<sup>31</sup> y Veiga,<sup>32</sup> que ya utilizaban de forma clínica vasos sanguíneos de alta presión criopreservados y mencionando que descongelar de manera pausada los injertos evita la formación de cristales de hielo, que son los encargados de producir las fracturas de las paredes del vaso. Otros autores<sup>33</sup> que estudiaron la viabilidad de las células del epitelio traqueal y cartílago traqueal después de utilizar diferentes tiempos de criopreservación y descongelamiento del injerto, observaron que los descongelamientos lentos (30 min) mantienen en buen estado la arquitectura del injerto, porque permiten una descongelación homogénea del mismo debido a que el descongelamiento de la solución de criopreservación se inicia desde afuera hacia la luz y probablemente esto fue lo que ocurrió en este estudio, se utilizó un descongelamiento rápido (10 min).

Con respecto a la evolución clínica observada en este trabajo, el estridor y disnea que presentaron todos los animales entre los 3 y 15 días poscirugía, se puede pensar que fue ocasionado por la inflamación que produjo el injerto traqueal, así como la pérdida del tono muscular de la aorta injertada que provocó su colapso, lo que impidió el paso libre de aire hacia los pulmones, lo que coincide con lo descrito por Azorin *et al*<sup>34</sup> quienes de forma clínica colocaron un injerto de aorta autóloga y observaron que el paciente presentaba dificultad respiratoria a los 40 días posterior-

es al trasplante. Sin embargo, los resultados de este estudio no correlacionan con los observados por Martinod *et al*,<sup>29,35</sup> quienes no percibieron estas complicaciones al utilizar de forma experimental auto y aloinjertos frescos de aorta para el reemplazo traqueal, ya que para evitar el colapso del injerto aórtico colocaron un stent de silicón como soporte. En nuestro estudio no se utilizaron stents dentro de la luz de la ABC, porque se quería evaluar si se conservaba la consistencia firme del xenoinjerto y se mantenía permeable la vía aérea como lo describió Anoosh *et al*, al realizar reemplazos traqueales con aortas autógenas,<sup>26</sup> además de que estos stents favorecen complicaciones, como infecciones, formación de tejido de granulación con la consecuente obstrucción del injerto,<sup>7</sup> migración del mismo, erosión vascular y lesiones granulomatosas.<sup>25</sup>

La disminución de la luz traqueal, así como la pérdida de la continuidad del injerto observada radiográfica y traqueoscópicamente en ambos grupos de estudio fue originada porque la falta de aporte sanguíneo provocó necrosis de los injertos y que perdieran la consistencia de su estructura cartilaginosa y muscular.<sup>34-36</sup>

Al correlacionar los hallazgos traqueoscópicos y macroscópicos se confirmó que la necrosis y formación de fístula en los dos grupos de estudio fue por la falta de un aporte vascular como lo describió Salassa *et al*<sup>36</sup> quienes mencionan que cuando se lleva a cabo un trasplante traqueal, la microcirculación de las anastomosis, suministrada por las arterias longitudinales laterales y transversas anteriores intercartilaginosas no es suficiente para mantener el aporte sanguíneo, y las paredes traqueales se vuelven vulnerables al daño isquémico y están predispuestas a sufrir de dehiscencia, fístulas o necrosis del injerto.

Microscópicamente la presencia de necrosis, pérdida del epitelio, inflamación a base de linfocitos, vasculitis, hemorragia y destrucción del cartílago en la tráquea reafirmó la falta de aporte sanguíneo a los injertos y coincide con lo reportado por otros autores que mencionan que la isquemia provoca pérdida de la arquitectura del tejido y una reacción inflamatoria severa.<sup>4,27</sup> Sin embargo, por la presencia del infiltrado linfocitario y dado que en el grupo II no se administró terapia inmunosupresora, posiblemente aparte de

la isquemia se presentó un rechazo agudo del injerto como lo describe López *et ál.*<sup>37</sup>

## CONCLUSIÓN

Con lo observado en el desarrollo de este estudio se puede concluir que no es viable utilizar injertos de ABC para la sustitución de segmentos traqueales, debido a que se necrosan y fistulizan por la falta de aporte sanguíneo o por rechazo, por lo que se tienen que realizar más estudios modificando la técnica de criopreservación y descongelación del injerto, así como con la aplicación de inmunosupresión en los animales que se les coloque el xenoinjerto.

## REFERENCIAS

1. Cueto LGA. *Problemática que plantea la reconstrucción traqueal tras una resección extensa*. Neumosur 1993;5:3-4.
2. Grillo HC. *Benign and malignant diseases of the trachea*. In: Shields TW, editor. *General thoracic surgery*. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1989.p.667-679.
3. Yokomise H, Inui K, Wada H, Ueda M, Hitomi S. *Tracheal transplantation in dogs for future clinical application*. Transplant Proc 1996;28:1763-1764.
4. Olmos-Zúñiga JR, Eguiza-Rubí V, Jasso-Victoria R, *et ál.* *Trasplante experimental de tráquea cervical combinado con la aplicación de factor de crecimiento de fibroblastos*. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2006;19:172-179.
5. Salmeron J, Gannon PJ, Blackwell KE, Shaari CM, Urken ML. *Tracheal transplantation: superior and inferior thyroid artery perfusion territory*. Laryngoscope 1998;108:849-853.
6. Dodge-khatami A, Backer CL, Holinger LD, Mavroudis C, Cook KE, Grawfort SE. *Healing of a free tracheal autograft is enhanced by topical vascular endothelial growth factor in an experimental rabbit model*. J Thorac Cardiovasc Surg 2001;122:554-561.
7. Olmos-Zúñiga JR, Ávila-Chávez A, Jasso-Victoria R, *et ál.* *Cambios macroscópicos, microscópicos y morfométricos del autotrasplante traqueal dividido y omentopexia en perros*. Rev Vet Mex 2005;36:189-204.
8. Ohkado A, Hachida M, Hoshi H, *et ál.* *Problems in preservation of allogenic heart valves and vessels*. Transplant Proc 1999;31:2047-2048.
9. Molina JE, Edwards J, Bianco R, *et ál.* *Growth of fresh-frozen pulmonary allograft conduit in growing lambs*. Circulation 1989;80(3 Pt 1):1183-1190.
10. Kirklin JK, Smith D, Novick W, *et ál.* *Long-term function of cryopreserved aortic homografts. Aten-year study*. J Thorac Cardiovasc Surg 1993;106:154-166.
11. *Especificaciones técnicas para el sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres*. Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995. Diario Oficial de la Federación, 16 julio, 1996. Estados Unidos Mexicanos.
12. Heras RY. *Evaluación de la utilidad y funcionalidad de la reconstrucción de la arteria pulmonar de perros, con aloinjertos de arteria pulmonar criopreservada* (tesis de Maestría en Ciencias). México, D.F: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM; 2008.
13. *Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio*. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Diario Oficial de la Federación 6 dic., 1999. Estados Unidos Mexicanos.
14. 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, D.F; 2002.
15. Insel P. Analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios y fármacos antigotosos. En: Goodman A, editor. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. México: McGraw-Hill; 1996.p.661-705.
16. Academy of Surgical Research. *Course of animal anesthesia and models*. Memories of the Course of Animal Anesthesia and Models of the 12th Annual Meeting and 1st International Conference of the Academy of Surgical Research, October 1996. Muenster, Germany: Academy of Surgical Research; 1996.
17. Davies OG, Edmiston JM, McCorkle HJ. *The repair of experimental tracheal defects with fresh and preserved homologous tracheal grafts*. J Thorac Surg 1952;23:367-376.
18. Santillan-Doherty P, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, *et ál.* *Pulmonary perfusion during lung transplant rejection and experimental pneumonia*. Transplantation 1992;53:533-535.
19. *Surveillance for respiratory hazards in the occupational setting (American Thoracic Society)*. Am Rev Respir Dis 1982;126:952-956.
20. Meyer CM 3rd, O'Connor DM, Cotton RT. *Proposed grading system for subglottic stenosis based on endotracheal tube sizes*. Ann Otol Rhinol Laryngol 1994;103(4 Pt 1):319-323.
21. Tena A. *Análisis de los datos*. En: Hernández R, Fernández C, Baptista P, editores. *Metodología de la investigación*. 3ra ed. México, D.F: McGraw-Hill/Interamericana; 2003.p.492-692.
22. Grillo HC. *Trachea replacement: a critical review*. Ann Thorac Surg 2002;73:1995-2004.
23. Faggioli G, Ricotta JV. *Cryopreserved vein homograft for arterial reconstruction*. Eur J Vasc Surg 1994;8:661-669.
24. Makris D, Holder-Espinasse M, Wurtz A, *et ál.* *Tracheal replacement with cryopreserved allogenic aorta*. Chest 2010;137:60-67.
25. Seguin A, Radu D, Holder-Espinase M, *et ál.* *Tracheal replacement with cryopreserved decellularized, or glutaraldehyde-treated aortic allografts*. Ann Thorac Surg 2009;87:861-867.
26. Anoosh F, Hodjati H, Dehghani S, Tanideh N, Kumar PV. *Tracheal replacement by autogenous aorta*. J Cardiothorac Surg 2009;4:23.

27. Martinod E, Seguin A, Holder-Espinasse M, et ál. *Tracheal regeneration following tracheal replacement with an allogenic aorta*. Ann Thorac Surg. 2005;79: 942-948.
28. Rábago G, Ruiz ML, Ubilla M, et ál. *Trasplante de homoinjertos valvulares cardíacos y vasculares*. An Sist Sanit Navar 2006;29 Supl 2:153-161.
29. Zhou W, Lin PH, Bush RL, et ál. *A. In situ reconstruction with cryopreserved arterial allografts for management of mycotic aneurysms or aortic prosthetic grafts infections: a multi-institutional experience*. Tex Heart Inst J 2006;33:14-18.
30. Rey LR. *Basic aspects and future trends in the freeze-drying of pharmaceuticals*. Dev Biol Stand 1992;74:3-8.
31. Pegg DE, Wusteman MC, Boylan S. *Fractures in cryopreserved elastic arteries*. Cryobiology 1997;34:183-192.
32. Veiga-Barreiro A, Rendal-Vázquez ME, Matheu-Capó G, et ál. *Cambios histopatológicos en arterias humanas sometidas a procesos de isquemia fría y criopreservación*. Angiología 2004;56:97-105.
33. Sotres-Vega A, Baltazares-Lipp M, Villalba-Caloca J, et ál. *Tracheal cryopreservation: caspase-3 immunoreactivity in tracheal epithelium and mixed glands*. Braz J Med Biol Res 2009;42:1156-1162.
34. Azorin JF, Bertin F, Martinod E, Laskar M. *Tracheal replacement with and aortic autograft*. Eur J Cardiothorac Surg 2006;29:261-263.
35. Martinod E, Seguin A, Pfeuty K, et ál. *Long-term evaluation of the replacement of the trachea with and autologous aortic graft*. Ann Thorac Surg 2003;75: 1572-1578.
36. Salassa JR, Pearson BW, Payne WS. *Gross and microscopical blood supply of the trachea*. Ann Thorac Surg 1977;24:100-107.
37. López A, Chávez C, Granados J. *Función biológica del complejo principal de histocompatibilidad*. Rev Invest Clin 2005;57:132-141.

✉ **Correspondencia:**

MC. J. Raúl Olmos-Zúñiga,  
Departamento de Investigación en  
Cirugía Experimental. Instituto  
Nacional de Enfermedades  
Respiratorias Ismael Cosío Villegas.  
Calzada de Tlalpan 4502, colonia  
Sección XVI. México, D.F., 14080  
Teléfono (52)(55) 54 8717 00,  
extensión 180;  
fax: (52)(55) 54 87 17 06  
Correo electrónico:  
raolzu@yahoo.com