

## 6ª Mesa Redonda: Cirugía traqueal

### TRASPLANTE DE TRÁQUEA. ESTUDIO EXPERIMENTAL

S. Quevedo Losada, D. Pérez Alonso, J. R. Cano García y L. López Rivero.

*Servicio de Cirugía Torácica. Hospital Universitario Insular de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria.*

*squelos@gobiernodecanarias.org*

### INTRODUCCIÓN

El trasplante traqueal es la alternativa teórica ideal para reparación de defectos traqueales que por su tamaño no son susceptibles de la reparación quirúrgica directa<sup>1</sup>. La utilización de sustitutos protésicos asocia frecuentes complicaciones severas<sup>2</sup>.

El trasplante de tráquea en la actualidad se encuentra con la dificultad de la revascularización del segmento trasplantado, ya que por las peculiares características del aporte sanguíneo y del drenaje venoso de la tráquea es imposible realizar una anastomosis vascular convencional (figura 1). Por otra parte, los fenómenos de rechazo influyen de forma negativa, por su acción perniciosa a nivel de la microcirculación<sup>3</sup>.

Este problema motivó que en 1992 iniciáramos un proyecto de investigación orientado a estudiar un método indirecto de vascularización traqueal que paliara el efecto isquémico. Para ello se utilizó la propiedad angiogénica del epiplon mayor cuando se sitúa alrededor de los tejidos con vascularización deficiente<sup>4</sup>. Se

estudiaron diferentes aspectos como: revascularización traqueal con epiplon, cronología de la revascularización, estudio morfométrico de la distribución vascular, criopreservación traqueal, cambios morfológicos secundarios al rechazo y desarrollo de un modelo de bronquiolitis obliterante.

### REVASCULARIZACIÓN TRAQUEAL CON EPIPLON

El modelo experimental elegido para llevar a cabo el estudio fue la rata albina de la cepa "Sprague-Dawley", atendiendo a criterios de uniformidad y a la normativa vigente de investigación en animales de experimentación. Su utilizaron de inicio 175 animales, donantes y receptores, de tamaño y peso similar y practicamos 110 trasplantes heterotópicos traqueales.

La extracción de la tráquea donante se realizó en condiciones de máxima asepsia y tras esternotomía media se procedía a la preparación del implante según cinco diferentes modelos (tabla 1). (figura 2)

Para la búsqueda del modelo experimental idóneo se estudiaron tres factores (mecánicos, consanguinidad y farmacológicos) que a su vez incluían los grupos de trabajo (tabla 2).

Además se incluyeron dos grupo en relación con el tipo de anastomosis practicada (tabla 3).

Para el estudio histológico del implante se diseñó una tabla morfohistológicocuantitativa. Con ella se daba un valor numérico al daño tisular de las diferentes capas de la tráquea. En el epitelio se consideraba la ulceración, en la submucosa la inflamación y en el cartílago la necrosis.

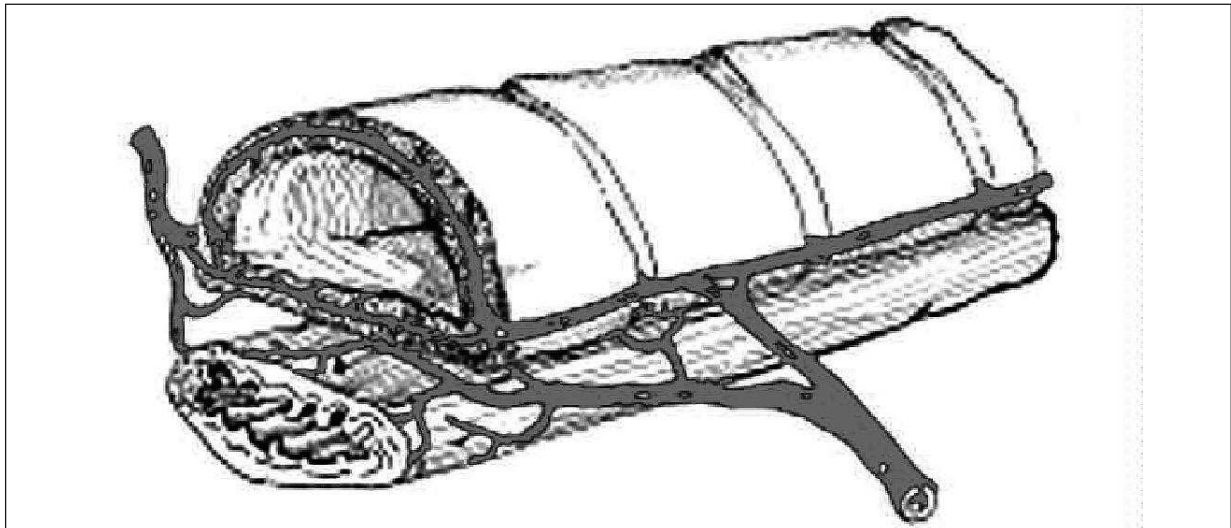


Figura 1. Esquema de la vascularización de un segmento traqueal.



Figura 2. Detalle del injerto traqueal antes de la extracción.

Tabla 1. Modelos de preparación del implante traqueal utilizados en el estudio.

- A) Implante heterotópico de segmento traqueal en cavidad abdominal con epiplon.
- B) Modelo A con tracción cenital sobre implante.
- C) Modelo B con drenaje en la luz traqueal
- D) Modelo C con implante de dos hemitráqueas anastomosadas termino-terminal
- E) Modelo D con anastomosis telescopada.

Tabla 3. Grupos de trabajo según el tipo de anastomosis realizada.

- Grupo X (n=10). Anastomosis termino-terminal. Modelo D de implante.
- Grupo XI (n=10). Anastomosis telescopada. Modelo E de implante.

Tabla 2. Grupos de trabajo según factores mecánicos, consanguinidad y farmacológicos.

**Factores mecánicos**

- Grupo I (n = 10). Colapso traqueal. Modelo A de implante.
- Grupo II (n =10). Tracción cenital: Modelo B de implante.
- Grupo III (n =10). Tracción y drenaje: Modelo C de implante.

**Factores de consanguinidad**

- Grupo IV(n =10): Entre donante y receptor no existía relación de hermandad.
- Grupo V(n =10): Entre donante y receptor si existía relación de hermandad.

**Factores farmacológicos**

- Grupo VI (n =10). Antibioterapia.
- Grupo VII (n =10). Esteroides.
- Grupo VIII (n=10). Antibioterapia y esteroides.
- Grupo IX (n =10). Antibioterapia e inmunosupresores.

Para el estudio estadístico se usaron técnicas de distribución libre o “no paramétricas” (Kruskal-Wallis). El análisis de resultados concluyó que el modelo de revascularización traqueal con epiplon era idóneo ya que histológicamente no existía diferencia entre el implante tratado con antibioterapia e inmunosupresión y el grupo control<sup>5,6</sup>.

En el estudio de la anastomosis consideramos que el elemento clave en la cicatrización de la vía aérea, es la revascularización de la misma y no tanto el tipo de anastomosis utilizada<sup>6</sup>.

### CRONOLOGÍA DE LA REVASCULARIZACIÓN TRAQUEAL CON EPIPLON

Con la finalidad de conocer de manera cronológica el fenómeno de la revascularización traqueal diseñamos el siguiente estudio.

Con el modelo experimental validado de revascularización tráquea con epiplon, se utilizaron 110 animales, practicándose 50 trasplantes divididos en los siguientes grupos; 0 = Grupo control, I= dos días de postoperatorio, Grupo II, III, IV y V con cuatro, seis, ocho y catorce días de postoperatorio, respectivamente. Para la extracción e implante, el estudio histológico y la valoración estadística, se usaron las técnicas ya señaladas.

Podemos concluir que las lesiones iniciales que se producen durante la revascularización traqueal con epiplon son la ulceración del epitelio y la inflamación de la submucosa, sin evidenciar alteración en el cartílago. El epitelio demuestra lesiones a partir del segundo día que disminuyen progresivamente hasta alcanzar su aspecto normal al octavo día. La submucosa se mantiene intacta hasta el cuarto día en el que aparecen fenómenos inflamatorios que alcanzan su máxima intensidad

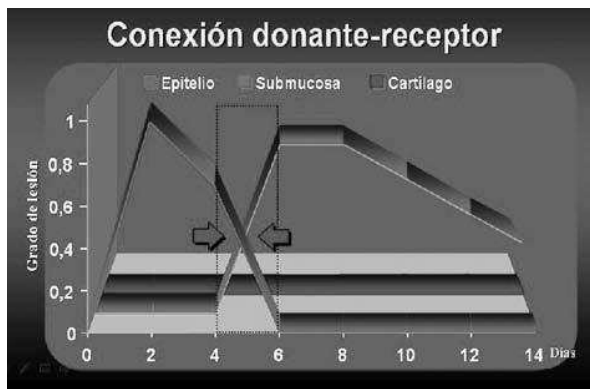


Figura 3. Conexión vascular donante-receptor.

Entre el 4º y 6º día se establece la conexión vascular donante-receptor.

al sexto día, iniciando su recuperación a partir de entonces de manera progresiva. El cartílago no manifestó cambios durante todo el periodo (figura 3).

Por lo tanto, tras un periodo inicial de isquemia de la tráquea trasplantada, en el que se producen lesiones epiteliales, se comienza a revascularizar el órgano de forma incipiente a partir de las 48 horas postoperatorias. A partir de entonces, aumenta de forma progresiva la vascularización del órgano, lo que se evidencia por las lesiones de regeneración epitelial y de inflamación de la submucosa, alcanzando un nivel adecuado al sexto día de la intervención. Estos hallazgos nos permiten afirmar que la conexión completa entre los sistemas vasculares de la tráquea del receptor y la del donante se establece entre el cuarto y sexto día<sup>7</sup>.

### ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA DISTRIBUCIÓN VASCULAR DE LA SUBMUCOSA TRAQUEAL CON MÉTODOS MORFOMÉTRICOS

En lo que respecta a la isquemia que presenta la tráquea trasplantada, se han realizado muchos estudios a nivel experimental. Sabemos que el epiplon es capaz de revascularizar segmentos traqueales trasplantados en la cavidad abdominal. Los resultados mejoran si al implante le aplicamos tracción cenital, drenaje de su luz y se le administra tratamiento con fármacos inmunosupresores y profilaxis antibiótica. Conocíamos también la cronología de dicha revascularización y los cambios secuenciales debidos al rechazo.

Sin embargo, no conocíamos el porcentaje de revascularización traqueal que se consigue con el uso del epiplon, ni la distribución vascular en la submucosa de la tráquea trasplantada al no existir un “mapa” vascular de una tráquea normal.

De forma experimental se puede conocer la revascularización de una tráquea isquémica, o de un segmento de ella, implantada. Los métodos empleados hasta la fecha son indirectos. En ellos se analiza la viabilidad estructural de la misma en diferentes periodos de tiempo, para ver la evolución en la recuperación de los tejidos y/o los fenómenos de isquemia, necrosis y rechazo. Sin embargo, pese a la utilidad demostrada, estos estudios no consiguen analizar los fenómenos de angiogénesis, y si éstos suponen la recuperación del grado de vascularización que presenta el órgano en condiciones normales, careciendo, por tanto, de objetividad. Para calcular el grado de revascularización sería preciso diseñar un método que nos permitiera conocer, de forma directa, cuál es la cantidad de neovasos que, en un órgano con las peculiarida-

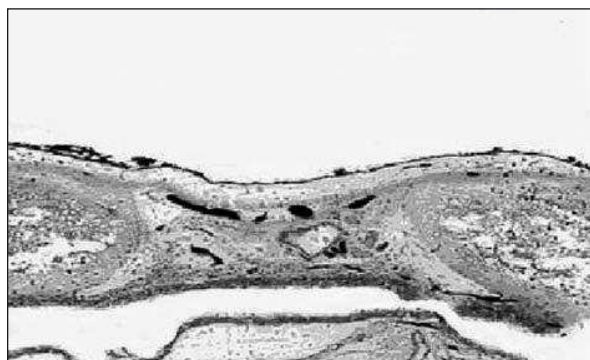


Figura 4. Vasos sanguíneos tintados en el espacio traqueal intercartilaginoso.

des vasculares de la tráquea, tienen lugar cuando es trasplantada y revascularizada. El método ideal sería aquél que, una vez puesto de manifiesto con técnicas de tinción el patrón de vascularización, nos permitiera obtener un valor cuantitativo porcentual que poder comparar con la normalidad.

Nuestra finalidad era determinar la distribución vascular, expresada en porcentaje, de la submucosa traqueal normal.

Se utilizaron treinta animales a los que se les practicó la extracción traqueal tras realizar técnicas de tinción intravascular con tinta china (figura 4). El método de estudio morfométrico se basó en la captación digital de imágenes ( $n = 887$ ) de cortes histológicos mediante una videocámara acoplada a un microscopio óptico asistidos por una computadora, mediante el uso de un programa informático de cálculo, de diseño propio.

El porcentaje de distribución vascular traqueal medio en nuestro modelo fue del  $22,1 \pm 20,2\%$ <sup>8</sup>.

#### ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL TRASPLANTE DE TRÁQUEA CRIOPRESERVADA

A nivel experimental se han realizado con éxito trasplantes traqueales heterotópicos en abdomen aprovechando la gran capacidad angiogénica del omento. Se desconoce si estas técnicas revascularizadoras son eficaces sobre tejidos previamente criopreservados<sup>9</sup>.<sup>10</sup>. El motivo del estudio fue determinar la eficacia de la hipotermia profunda en preservar la integridad de segmentos traqueales para su uso diferido y analizar la capacidad revascularizadora del omento aplicada a grandes segmentos de vía aérea criopreservada.

Se realizaron, cuarenta alotrasplantes traqueales heterotópicos en abdomen con omentoplastia: treinta de ellos con injertos criopreservados (dos, ocho o veinticuatro semanas), y diez con injertos frescos. La técnica

de criopreservación fue el enfriamiento ultrarrápido en ausencia de criopreservantes, seguido de almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  en congelador mecánico. Tras la fase de implante abdominal, se perfundió con tinta china y se extrajo para su estudio histológico, atendiendo a la estructura macro y microscópica y a la existencia de neovascularización. El estudio estadístico se realizó mediante el programa informático SPSS para el entorno Windows.

Se apreciaron lesiones microscópicas en todos los grupos de criopreservación y trasplante, consistentes en pérdida del epitelio respiratorio normal y necrosis condral con una intensidad mayor cuanto más prolongado fue el tiempo de almacenamiento en hipotermia. Se detectó neovascularización en todos los grupos.

La criopreservación rápida sin aditivos citoprotectores es un método eficaz de preservación de la vía aérea, aunque produce lesiones subletales. Ésta no constituye obstáculo para una revascularización adecuada<sup>11, 12, 13</sup>.

#### CAMBIOS MORFOLÓGICOS SECUNDARIOS AL RECHAZO. DESARROLLO DE UN MODELO DE BRONQUIOLITIS OBLITERANTE

Los avances de la técnica quirúrgica, de la preservación del órgano y del manejo postoperatorio han permitido una supervivencia aceptable y una buena función pulmonar, si bien el rechazo crónico en su forma más frecuente: la bronquiolitis obliterante, condiciona de forma negativa la evolución de un porcentaje significativo de los pacientes trasplantados de pulmón, no disponiéndose en la actualidad de un régimen inmunosupresor efectivo en su prevención y tratamiento. El objetivo fundamental en el manejo del rechazo en el trasplante de órganos, es determinar la importancia de los mecanismos implicados en el mismo para dirigir un tratamiento específico. La respuesta observada durante el rechazo está influenciada por las características del órgano trasplantado, por el estado inmune del huésped y por el tiempo que el injerto ha estado presente<sup>14, 15, 16, 17</sup>.

El propósito de este trabajo fue estudiar los cambios morfológicos secundarios al rechazo en la vía aérea trasplantada, de acuerdo a un protocolo experimental validado de trasplante heterotópico de vía aérea revascularizada con epiplón mayor<sup>3</sup>, para crear un modelo en el que poder valorar los efectos de los fármacos inmunosupresores.

Empleamos 100 animales, 50 donantes Sprague-Dawley y 50 receptores Wistar (donante y receptor de distintas cepas), de tamaño similar con valores medios de 250 g de peso, y practicamos 50 alotrasplan-



tes heterotópicos traqueales. Utilizamos 10 animales Sprague-Dawley como grupo control.

Con el objeto de determinar la cronología de los fenómenos secundarios al rechazo, se establecieron 5 grupos en función al tiempo transcurrido desde el implante hasta su extracción y posterior valoración histológica

La estructura de la vía aérea presentó modificaciones de forma progresiva. A nivel macroscópico la estructura traqueal se mantiene hasta el día 30, donde se manifiestan los signos de obliteración de la luz. A nivel microscópico el epitelio desaparece el día 30, la submucosa se sustituye por tejido fibrovascular denso el día 90 y el cartílago desaparece el día 14. La adventicia presenta intensa fibrosis el día 30 y recupera la normalidad el día 90. La luz traqueal se oblitera a partir del día 30.

Al utilizar nuestro modelo validado de revascularización, la conexión entre donante y receptor se establece entre el día 4 y 6 postimplante, por lo que el factor isquemia tuvo una escasa repercusión en el desarrollo de lesiones por rechazo crónico<sup>7</sup>.

Aceptado en la literatura científica que los criterios que definen la bronquitis obliterante son la ausencia de epitelio, la presencia de infiltrado fibrovascular submucoso y la obliteración de la luz de la vía aérea, en nuestro estudio, quedó establecida en el día 30 tras el implante<sup>18, 19, 20</sup>.

Por lo tanto, obtuvimos un modelo adecuado en el que ensayar distintas alternativas terapéuticas inmunosupresoras, orientadas a paliar el efecto del rechazo crónico sobre la vía aérea trasplantada.

## CONCLUSIÓN

En base a nuestro estudio experimental podemos concluir que es posible un trasplante de vía aérea, incluso si ha sido preservada en frío, siempre y cuando se aporte vascularización de forma adecuada y se minimicen los efectos nocivos del rechazo. Por otra parte, esta línea de investigación ha servido para la validación de un modelo experimental, en el que estudiar la evolución y beneficios de técnicas revascularizadoras, la criopreservación de vía aérea, y la eficacia de terapias inmunosupresoras en el trasplante, con el objetivo de mejorar el tratamiento de patologías complejas de la tráquea y bronquios.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Grillo HC, Dignan EF, Miura T. Extensive resection and reconstruction of mediastinal trachea without prosthesis or graft: An anatomical study in man. *J.Thorac Cardiovasc.Surg*; 48:741-749, 1964.
2. Pearson FG, Henderson RD, Gross AE, Ginsberg RJ, Stone RM. The reconstruction of circumferential tracheal defects with a porous prosthesis. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg*; 55:605-616,1968.
3. Lenot B., Macchiarini P, Dulmet ER., Weiss M., Darveville P., Tracheal Allograft Replacement. An unsuccessful Method. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 7(12)P648-655,1993.
4. Morrison R. Remarks on some functions of the omentum. *Br. Med. J.* 1906;1:76-79.
5. López-Rivero L, Quevedo S, Freixenet J, et. al. Experimental tracheal revascularization with omentum. *Eur J. Cardio-Thorac Surg* ;7:540-542,1993.
6. Santiago Quevedo Losada. Estudio experimental de la revascularización traqueal con epiplon. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 1992.
7. José Ceballos Esparragón. Estudio experimental de la cronología de la revascularización con epiplon de la tráquea trasplantada. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 1996.
8. Ángel Osorio Acosta. Estudio experimental sobre la distribución vascular de la submucosa traqueal con métodos morfométricos. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 2001.
9. De Loecker R, Fuller BJ, Gruwez J, et al. The effect of cryopreservation on membrana integrity, membrana transport, and proteine síntesis in rat hepatocytes. *Cryobiology.* 1990 Apr; 27 (2):143-52.
10. Wu WT, Lyu SR, Hsieh WH. Cryopreservation and biophysical properties of articularcartilage chondrocytes. *Cryobiology.* 2005 Dec;51 (3):330-8.
11. David Pérez Alonso. Estudio experimental del trasplante de tráquea criopreservada. Tesis Doctoral. Universidad de las palmas de Gran Canaria. 2007.
12. Pérez D, Cano JR, Quevedo S, et al. Effects of deep hypothermic preservation on posttransplant viability of tracheal grafts.<transplant Proc. 2010 Oct; 42(8):3244-6.
13. José Ramón Cano García, David Pérez Alonso, Santiago Quevedo Losada, Enrique Rodríguez. Trasplante de tráquea criopreservada. Estudio Experimental. Actualizaciones en trasplantes 2010. Edit Hospital Universitario Virgen del Rocío. Itsbn-13:978-84-692-9455-0.
14. Ross DJ, Jordan SC, Nathan SD, et al. Delayed development of obliterative bronchiolitis syndrome with OKT3 after unilateral lung transplantation. *Chest* 1996; 109:870-3.

15. Hasegawa T, Iacono A, Uousem SA, et al. The significance of bronchus-associated lymphoid tissue in human lung transplantation: is there any association with acute and chronic rejection?. *Transplantation* 1999;67(3):381-5.
16. Yousem SA, Dauber JA, Keenan R, et al. Does histologic acute rejection in lung allografts predict the development of bronchiolitis obliterans?. *Transplantation* 1991; 5282:306-9.
17. Estudio experimental de alotrasplante de vía aérea. Desarrollo de un modelo de bronquiolitis obliterante. José Ramón Cano García, David Pérez Alonso, Jaime Vilar, Santiago Quevedo Losada, P. Herráez-Thomas, Luis López Rivero. *Actualizaciones en trasplantes 2010*. Edit Hospital Universitario Virgen del Rocío. ISBN-13:978-84-692-9455-0.
18. María Dolores Batista Ramos. Estudio experimental de los cambios morfológicos secundarios al rechazo en la vía aérea trasplantada. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 2000.
19. Jaime Vilar Alejo. Estudio Experimental de alotrasplantes de vía aérea. Desarrollo de un modelo de bronquiolitis obliterante. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 2005.
20. Ramirez AM, Takagawa S, Sekosan M, et al. Smad 3 deficiency ameliorates experimental obliterative bronchiolitis in a heterotopic tracheal transplantation model. *Am J Pathol*. 2004; 165(4):1223-32.