



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

RECONSTRUCCIÓN DE ARTERIA PULMONAR EN PERROS
CON ALOINJERTOS DE ARTERIA PULMONAR LIOFILIZADA O
TRATADA CON GLUTARALDEHIDO Y ÁCIDO GLUTÁMICO.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta

NÉSTOR EMMANUEL DÍAZ MARTÍNEZ

Tutor:

MC. Juan Raúl Olmos Zúñiga

Comité tutorial:

Dr. Rogelio Jasso Victoria

Dr. Patricio Santillán Doherty

México, D. F.

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	V
I.- INTRODUCCIÓN.	1
1.- Anatomía y fisiología del sistema circulatorio	1
1.1.- Arterias.	1
1.2.- Arteriolas.	3
1.3.- Capilares.	5
1.4.- Venas.	5
1.5.- Irrigación e inervación de los vasos sanguíneos.	5
2.- Circulaciones.	6
2.1.- Circulación sistémica, mayor, periférica o general.	6
2.2.- Circulación menor o pulmonar.	6
3.- Trastornos y tratamiento de la arteria pulmonar.	7
II.- JUSTIFICACIÓN.	10
III.- HIPÓTESIS.	11
IV.- OBJETIVOS.	
1.- Objetivo general.	11
2.- Objetivos específicos.	11
V.- MATERIAL Y MÉTODOS.	
1.- Animales de experimentación.	12
1.1.- Criterios de inclusión.	12
1.2.- Criterios de exclusión.	12
1.3.- Criterios de eliminación.	12
2.- Recursos.	13
3.- Obtención de las arterias pulmonares.	13
3.1.- Liofilización de los injertos vasculares arteriales.	16
3.2.- Preparación de la arteria pulmonar con glutaraldehído.	16

4.- Grupos de estudio.	19
5.- Anestesia.	19
6.- Técnicas quirúrgica receptor.	19
7.- Sello de agua.	25
8.- Evaluación.	
8.1.- Clínica.	25
8.2.- Hemodinámica y Gasométrica.	26
8.3. Radiológica.	27
8.4. Angiográficamente.	27
8.5.- Macroscópica.	37
8.6 Microscópica.	31
VI.- RESULTADOS.	
1.- Control microbiológico de las arterias pulmonares	31
2.- Hallazgos clínicos.	31
3.- Hallazgos radiológicos.	32
4.- Hallazgos hemodinámicas y gasométricos.	33
5.- Hallazgos angiográficos.	36
6.- Hallazgos macroscópicos.	39
7.- Hallazgos microscópicos.	39
VII.- DISCUSIÓN.	42
VIII.- CONCLUSIONES.	46
IX.- LITERATURA CITADA.	48
SUPLEMENTO 1	47

RECONSTRUCCIÓN DE ARTERIA PULMONAR EN PERROS CON ALOINJERTOS DE ARTERIA PULMONAR LIOFILIZADA O TRATADA CON GLUTARALDEHIDO Y ACIDO GLURTAMICO.

Con el fin de obtener una prótesis que sirva como reemplazo de arteria pulmonar, 24 perros sanos de entre 15 y 18 kilogramos, fueron utilizados, para evaluar la utilidad, cambios en la función cardiopulmonar, angiográficos, macroscópicos y microscópicos, producidos en la arteria pulmonar después de ser reconstruida con aloinjertos de arteria pulmonar liofilizada ó tratada con glutaraldehído y ácido glutámico. Los animales fueron divididos en cuatro grupos de estudio: Grupo 1 (n=6) Se realizó medición de parámetros hemodinámicos y gasométricos; Grupo II (n=6) Se efectuó resección y reanastomosis de la arteria pulmonar; Grupo III (n=6) Se realizó resección de la arteria pulmonar y esta se reconstruyo con un aloinjerto de arteria pulmonar liofilizado; Grupo IV (n=6) Se resecó la arteria pulmonar y se reemplazó con un aloinjerto de esta, tratado con glutaraldehído. La duración del estudio fue de 4 semanas realizando evaluaciones periódicas de forma clínica. Al finalizar el estudio se examinó macroscópicamente la formación de trombos u obliteración del segmento vascular, así como la formación de adherencias. Microscópicamente se evaluó la cicatrización del injerto a la arteria pulmonar, inflamación, presencia de rechazo, calcificaciones y el estado de ambos tejidos. **Resultados.** Todos los animales sobrevivieron al procedimiento quirúrgico y al tiempo de estudio sin presentar ninguna alteración clínica, radiológica y gasométrica. Con respecto a los parámetros hemodinámicos solo las presiones de la arteria pulmonar así como las resistencias pulmonares del grupo IV mostraron cambios estadísticamente significativos (ANOVA $p < 0.05$ y Tukey/Kramer $p < 0.05$) en comparación con los otros grupos de estudio. Microscópicamente en el grupo IV la permeabilidad se redujo hasta en un 75%. **Conclusión.** Se puede concluir que la liofilización es una opción para la preservación de arterias pulmonares caninas, las cuales pueden ser utilizadas como injerto de reemplazo de la misma en un modelo experimental canino, ya que presenta una buena integración y cicatrización. Es un material fácil de preparar, tiene adecuada resistencia, y un manejo quirúrgico fácil, además de un bajo costo.

Palabras Clave.

Arteria pulmonar, Aloinjertos, Liofilización, Glutaraldehído y Ácido Glutámico.

I.- INTRODUCCIÓN.

1.- Anatomía y fisiología del sistema circulatorio.

La función principal del aparato cardiovascular (sistema circulatorio) es la de transportar sangre en forma continua a través de los vasos sanguíneos para suministrar oxígeno (O₂), nutrientes y otras sustancias (mediadores químicos, hormonas y elementos del sistema inmunológico) a todos los tejidos del cuerpo, así como la remoción de bióxido de carbono (CO₂) y bioproductos del metabolismo celular de los mismos. ^[1]

Vasos sanguíneos.

Los vasos sanguíneos son un sistema de conductos elásticos que pueden modificar su diámetro y que forman un circuito cerrado para permitir el retorno de sangre al corazón. En este circuito la sangre avanza por las arterias que conforme se van ramificando y haciendo más pequeñas se transforman en arteriolas y dan origen a una red o cama vascular de capilares, los cuales cambian y se vuelven a unir para formar vénulas y venas que regresan la sangre al corazón.

Existen cuatro tipos de vasos sanguíneos: arterias, arteriolas, capilares y venas, los cuales se diferencian entre sí por el grosor de las capas que componen su pared, así como por el tipo de sangre que transportan.

Las arterias y las venas en condiciones normales siempre van juntas. ^[2,3]

1.1.- Arterias.

Las arterias son las encargadas de llevar sangre oxigenada y con nutrientes desde el corazón hacia los distintos órganos y tejidos del cuerpo. Todas las arterias transportan oxígeno por su luz, que es la región del vaso por donde pasa la sangre, a excepción de la pulmonar que lleva pocas cantidades de éste.

Las arterias se encuentran formadas por tres capas denominadas tunicas: externa o adventicia, media y la interna o íntima. ^[3]

Túnica adventicia: se compone de fibras de colágena y elásticas. Esta tiene como función dar soporte al vaso sanguíneo.

Túnica media: está compuesta por capas concéntricas de fibras musculares lisas, elásticas, reticulares y proteoglicanos, su función es la de permitir que el vaso se distienda o se contraiga.

Túnica íntima: se encuentra formada por una capa de endotelio (que está en contacto con la sangre), membrana basal, una capa de tejido conectivo subendotelial laxo y otra capa de tejido elástico. La función de ésta es evitar la formación de trombos.

Tipos de arterias.

En los vertebrados superiores la composición de las capas de las arterias son similares a la salida de los ventrículos, sin embargo conforme se van distribuyendo y ramificando en las diferentes regiones corporales, estas cambian la estructura de sus paredes para tener una mayor capacidad de distenderse (vasodilatación) o para contraerse (vasoconstricción) y amortiguar las pulsaciones y presiones que produce el corazón durante el latido, por lo que las arterias que se encuentran más cercanas a éste tienen mayor cantidad de tejido elástico, mientras que las más lejanas poseen más fibras de tejido muscular. Estas características hacen que las arterias sean divididas en dos tipos: arterias elásticas o de conducción y las musculares o de distribución.

Arterias elásticas: Son las arterias de gran calibre o arterias mayores (aorta, tronco braquiocefálico, carótidas, pulmonares, subclavias e iliacas), las cuales se caracterizan por que, durante la eyección (expulsión) de sangre del corazón, sus fibras se distienden y actúan como un reservorio de presión y energía que cuando el corazón deja de bombear sangre, estas vuelven a su calibre normal y la presión que almacenaron se transforma en energía cinética que empuja la sangre hacia las arterias musculares con un flujo más o menos continuo.

Arterias musculares: Son arterias de mediano calibre (humerales, radiales, intercostales, esplénica, mesentéricas, femorales, poplíteas y tibiales) que se dilatan o se contraen de

acuerdo a las necesidades de la región a irrigar y son las encargadas de distribuir la sangre en las diferentes regiones del cuerpo. ^[4,5]

1.2.- Arteriolas.

Son las ramas más pequeñas de las arterias y están formadas por tres túnicas de las cuales la externa está constituida por tejido conectivo laxo, *vasa vasorum* y fibras nerviosas. La túnica media, posee de una a cuatro capas de células musculares lisas y pocas fibras elásticas, mientras que la íntima es muy similar a la arterial con un endotelio, lámina basal, subendotelio, fibras elásticas y fibras de colágena.

Las arteriolas también tienen la capacidad de dilatarse y contraerse, gracias a estas características son las encargadas de determinar el flujo y presión con la que irrigan las diferentes regiones del cuerpo.

Las arteriolas son vasos de distribución con alta presión y bajo flujo por lo que también reciben el nombre de arteriolas de resistencia. ^[4-6]

1.3.- Capilares.

Son las estructuras más pequeñas del aparato cardiovascular, se localizan a nivel tisular y son el sitio funcional para el intercambio de oxígeno, nutrientes, electrolitos y productos de desecho celular. Éstos unen arteriolas con vénulas pero principalmente forman redes ramificadas que permiten un intercambio rápido y directo de gran cantidad de sustancias.

Los capilares no tienen túnica externa ni media, pero sí poseen una íntima que se compone por una capa de células endoteliales y una membrana basal con lo que la sangre solo tiene que atravesar una capa celular para llegar a los tejidos y nutrirlos.

El paso de sangre de las arteriolas a las vénulas se da a través de derivaciones arteriovenosas que pueden ser de dos tipos: anastomosis arteriovenosas y las metarteriolas.

Las anastomosis arteriovenosas surgen del lado arteriolar (precapilar) son puentes para el paso de sangre a toda la red capilar, se encuentran formadas por células musculares lisas y actúan como un esfínter con el que se regula la distribución del flujo sanguíneo, dependiendo de las necesidades del órgano a irrigar.

Los capilares verdaderos siempre presentan un esfínter precapilar que al relajarse o contraerse da origen a un fenómeno llamado vasomoción que permite el flujo continuo de sangre a los tejidos.

La metarteriola es el canal por el cual pasa la sangre directamente desde una arteriola terminal hasta una vénula, esta también cuenta con tres tunicas de la cual la adventicia presenta tejido conectivo laxo, la media compuesta por células musculares lisas y la intima un endotelio y lámina basal.

A los capilares se les puede dividir en dos clases:

Capilares continuos: se encuentran en el tejido pulmonar, muscular y tejidos conjuntivos, éstos se caracterizan por que sus membranas forman un anillo sin interrupciones alrededor del capilar.

Capilares fenestrados: contienen poros o fenestraciones en sus membranas y se localizan en el riñón, intestino delgado, plexos coroideos de los ventrículos encefálicos, cuerpos ciliares de los ojos, hígado, médula ósea y bazo.

Las vénulas se forman de la unión de varios capilares y su función es la de recolectar la sangre de los capilares y llevarla hacia las venas. Son de tres tipos: postcapilar, de colección y muscular. Las dos primeras únicamente tienen túnica íntima a diferencia de la vénula muscular que sí está formada por las tres tunicas, de las cuales la media posee músculo liso, por lo que estas actúan como un esfínter.

1.4.- Venas.

Las venas tienen como papel principal recoger sangre de las vénulas y retornarla al corazón derecho a través de las cavas superior (cranial) e inferior (caudal). Éstos vasos a diferencia de las arterias transportan sangre no oxigenada y con subproductos del metabolismo celular de los tejidos, a excepción de las venas pulmonares que si acarrear sangre oxigenada.

Al igual que las arterias tienen la capacidad de dilatarse o contraerse para adaptarse a los cambios de presión y volumen sanguíneo que pasa por ellas, aunque en condiciones normales la presión que llevan es menor a la de las arterias. Se encuentran constituidas por tres capas aunque con grosores diferentes al de las arterias. La túnica adventicia está constituida por tejido conectivo, fibras elásticas y haces longitudinales de fibras musculares que permiten el sostén del vaso. La túnica media está formada a base de músculo liso, así como por fibras de colágena que permiten la dilatación y constricción. La túnica íntima tiene un endotelio con un revestimiento interior con válvulas semilunares para asegurar la circulación en un solo sentido.

Se clasifican en pequeñas, medianas (humerales, radiales, intercostales, esplénica, mesentéricas, femorales y tibiales) y venas mayores o de gran calibre (cavas, braquiocefálicas, yugulares).^[7,8]

1.5.- Irrigación e inervación de los vasos sanguíneos.

Tanto en las arterias como en las venas la túnica adventicia se encuentra irrigada por un sistema de capilares y por la *vasa vasorum*, mientras que la media y la íntima recibe aporte sanguíneo por difusión de la sangre que se encuentra dentro del vaso. La inervación está dada por el *nervis vascularis* que son fibras simpáticas del sistema nervioso autónomo.^[6,9]

2.- Circulaciones.

La sangre fluye del corazón hacia los diferentes tejidos del cuerpo y regresa de éstos al mismo a través de dos tipos de circulación: **Circulación menor o pulmonar** que utiliza como bomba al corazón derecho y la **Circulación mayor o sistémica**, periférica o general en donde la sangre es bombeada por el corazón izquierdo.

Existe otro tipo de circulación denominada microcirculación donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes y oxígeno (O₂).^[1, 8,10]

2.1.- Circulación sistémica, mayor, periférica o general.

La circulación mayor o sistémica se inicia cuando el ventrículo izquierdo bombea la sangre ya oxigenada hacia la aorta torácica ascendente (craneal), arco aórtico, aorta torácica descendente (caudal) y la aorta abdominal (aorta abdominal descendente). Desde el arco aórtico se va ramificando y llega a cada región del cuerpo a irrigar y así en cada una de estas se continua ramificando hasta transformarse en arteriolas, posteriormente en capilares en donde se realiza el intercambio de oxígeno y nutrientes, donde la sangre con bióxido de carbono (CO₂) y productos del metabolismo celular pasa a las vénulas que se van haciendo mayores hasta formar las venas de cada órgano, las cuales drenan hacia las venas cavas que llevan la sangre hasta el atrio derecho. ^[11]

2.2.- Circulación menor o pulmonar.

La circulación pulmonar tiene como fin transferir oxígeno del medio ambiente a la sangre no oxigenada proveniente de todos los tejidos del cuerpo.

La sangre procedente de todo el organismo llega al atrio derecho (aurícula derecha) a través de las venas cavas (craneal y caudal o superior e inferior) y pasa al ventrículo derecho en donde nace la arteria pulmonar. La circulación pulmonar se inicia cuando el ventrículo derecho se contrae y la válvula tricúspide se cierra (para evitar el reflujo hacia el atrio), entonces el ventrículo expulsa la sangre al tronco de la arteria pulmonar (que también cierra sus válvulas semilunares para evitar el reflujo hacia el ventrículo), ésta se divide en arteria pulmonar derecha e izquierda que se ramifican para originar una arteria para cada lóbulo pulmonar y conforme avanzan dentro de su lóbulo respectivo, estas ramas continúan subdividiéndose en arteriolas y a nivel alveolar se transforman en capilares en donde se da el intercambio de gases. Los capilares pulmonares drenan la sangre oxigenada en vénulas que se van haciendo progresivamente mayores hasta formar las venas de cada lóbulo pulmonar, las cuales regresan la sangre al atrio izquierdo del corazón, de donde pasa al ventrículo izquierdo para ser bombeada nuevamente a la circulación mayor. ^[1, 8, 10, 12,13]

3.- Trastornos y tratamientos de la Arteria Pulmonar.

La arteria pulmonar es la arteria funcional de la pequeña circulación que conduce la sangre no oxigenada del corazón derecho a los pulmones, emerge de la parte superior e izquierda

del ventrículo derecho, es un vaso de calibre grueso (en promedio 10 mm). Bajo el arco de la aorta se divide en sus dos ramas, derecha e izquierda, contra la pared del saco pericárdico. ^[7, 14] Cualquier alteración de la vía vascular, principalmente a nivel de la arteria pulmonar puede afectar el intercambio gaseoso y producir insuficiencia respiratoria que a su vez provocan cambios en la hemodinamia y oxigenación de los tejidos del organismo.

La arteria pulmonar sufre de patologías tanto congénitas como adquiridas (aneurismas, neoplasias pulmonares, trombosis, estenosis, infecciones, traumatismos o enfermedades congénitas) las cuales tienen que ser reparadas mediante la resección y reconstrucción quirúrgica con injertos vasculares que actúen como conductos que permitan mantener el flujo sanguíneo del ventrículo derecho hacia los pulmones evitando así, cambios gasométricos, hemodinámicos sistémicos y la muerte. ^[15, 16] Un injerto vascular ideal debe ser fácil de implantar, tener poca degeneración o desarrollo de trombos, permitir el crecimiento del mismo, no debe de requerir del uso de anticoagulantes así como, resistente a infecciones y tener baja antigenicidad. ^[15, 17, 18]

En la actualidad se llevan a cabo múltiples investigaciones para encontrar el conducto vascular ideal para sustituir la arteria pulmonar, ya que tanto los injertos sintéticos como los biológicos utilizados clínicamente, están muy lejos de ser el material ideal, ya que ninguno tiene la capacidad de crecimiento potencial por lo que su durabilidad es limitada, son trombogénicos, se calcifican, estenosan o no tienen las mismas dimensiones del segmento que se va a resear.

Dentro de los materiales sintéticos utilizados se encuentra los tubos de dacrón, que aunque cumplen su función, por su baja porosidad hay que suministrar heparina a los pacientes, además tienen pobre neoformación de la íntima y de tejido interno que en ocasiones provoca que estas se calcifiquen y estensen promoviendo la reoperación del enfermo para su reemplazo. También se ha utilizado politetrafluoroetileno, que aunque tiene una mayor reepitelización, también requiere del uso de antiagregantes plaquetarios para evitar su obstrucción, además por su alto costo en nuestro medio, no se tiene acceso a ellos y la reconstrucción de la arteria se dificulta. ^[19]

En cuanto a los materiales biológicos se han utilizado homoinjertos de aorta irradiados, sin embargo la pared de éstos injertos con frecuencia se calcifica dentro del primer año, posteriormente se degenera provocando estenosis e insuficiencia del vaso. ^[20, 21] También se ha reportado el uso de homoinjertos de aorta y arteria pulmonar crió preservadas, las cuales fueron inicialmente utilizadas en un esfuerzo para reducir la prevalencia de la falla del conducto a largo plazo, sin embargo los pacientes a los que se les colocaron tuvieron que ser reoperados porque estas se calcificaron. ^[15] Otro material que se ha utilizado es el pericardio bovino tratado con glutaraldehído y se ha observado que en éstos no se forman capas que produzcan una obstrucción progresiva del injerto, permiten que el diámetro de los conductos de arteria pulmonar puede moldearse al tamaño que requieran los pacientes, potencialmente retrasan el deterioro y calcificación del mismo y su subsecuente reemplazo. ^[22]

Clínicamente los productos vasculares protésicos y homoinjertos disponibles, básicamente no son viables, por lo que en los últimos años la fabricación de éstos reemplazos ha involucrado el concepto de que la estructura de los tejidos sea generada a partir de células vasculares. ^[18, 23, 24]

En la actualidad existen muchos métodos de preservación que permiten la viabilidad de los tejidos, entre los que sobresale la liofilización y la preservación en glutaraldehído. La liofilización es un proceso químico unitario, mediante el cuál es posible secar o deshidratar un compuesto previamente congelado, su aplicación proporciona una alternativa útil de preservación a largo plazo ya que le confiere estabilidad a diferentes compuestos de origen biológico, aunque las condiciones experimentales para su aplicación deben ajustarse cuidadosamente a las características de cada caso en particular.

La utilización de la liofilización como un método de preservación para injertos vasculares presenta ciertas ventajas ya que una vez concluida la liofilización del injerto vascular, este se procesa para su esterilización con gas, para lo cuál uno de los injertos vasculares se coloca dentro de un empaque individual y transparente, características que facilitan la

identificación, el acceso y la elección del injerto vascular. Así mismo, los injertos vasculares se mantienen almacenados a temperatura ambiente y no se requieren de grandes espacios para su almacenamiento. ^[25] La preservación de injertos vasculares mediante su tratamiento con glutaraldehído consiste básicamente en mantenerlos sumergidos en una solución preparada con glutaraldehído diluido en un amortiguador de fosfatos inmediatamente después de su procuración, El glutaraldehído es un agente químico esterilizante que se ha utilizado ampliamente para mejorar la tolerancia y la durabilidad de las bioprótesis. ^[26] Además mantiene su integridad arquitectónica y reduce la antigenicidad del tejido bloqueando el fenómeno de rechazo. ^[27] Sin embargo, la calcificación de las bioprótesis tratadas con glutaraldehído es una consecuencia importante de este tratamiento, ^[28] aunque esta disminuye de manera importante cuando el tejido tratado con glutaraldehído se somete a un tratamiento con ácido L – glutámico. ^[28, 29] Independientemente de que con cualquiera de las dos técnicas de preservación mencionadas anteriormente los injertos vasculares no inducen respuesta inmune celular en el huésped con lo que se evita el uso de inmunosupresores. ^[26, 28, 30, 31, 32, 33]

Los problemas relacionados con el comportamiento de los injertos vasculares a largo plazo comunes a las dos técnicas de preservación incluyen principalmente el mantenimiento de un injerto vascular permeable, ya que la permeabilidad parece disminuir conforme avanza el tiempo de la colocación del injerto vascular aumentando el porcentaje de estenosis ^[31, 32, 34] además de que la viabilidad de las células endoteliales pospreservación del injerto vascular también disminuye, incluyendo la capacidad para reendotelizar *in vivo* el injerto vascular colocado. ^[25, 30, 35, 36]

En base a lo anterior y considerando que los injertos vasculares ideales para ser utilizados como reemplazo de arteria pulmonar deben de tener una estructura de tejido vascular, se puede pensar que preservar arterias pulmonares mediante liofilización o tratamiento con glutaraldehído evitaran la degeneración de las mismas, el desarrollo de trombos, tendrán baja antigenicidad y restringirán el uso de anticoagulantes.

II.- JUSTIFICACIÓN.

En la práctica diaria de la cirugía clínica en medicina veterinaria, con mucha frecuencia la presencia de patologías que afectan el flujo sanguíneo del ventrículo derecho hacia la arteria pulmonar, requiere de la resección y reconstrucción de la arteria misma. Para esto se han utilizado diferentes sustitutos tanto sintéticos como biológicos, pero no existe una prótesis vascular ideal que no sufra trombosis, calcificación, estenosis o que tenga las mismas dimensiones del segmento resecado, por lo que se dificulta la reconstrucción, además de su elevado costo.

En la actualidad se cuenta con el desarrollo de nuevas técnicas para la preservación de tejidos, como la liofilización y tratamiento con glutaraldehído y ácido glutámico, las cuales reducen la antigenicidad, evitan la trombosis y la calcificación de los injertos, en este estudio se propone el uso de la liofilización y el tratamiento con glutaraldehído para la preparación de arterias pulmonares procuradas de cadáveres, con el fin de obtener una bioprótesis vascular que su estructura sea de tejido vascular y pueda ser utilizada como reemplazo de la arteria pulmonar cuando ésta sea lesionada.

III.- HIPOTESIS.

La liofilización y el tratamiento con glutaraldehído más ácido glutámico, son métodos de preservación de tejidos, los cuales reducen la antigenicidad, evitan la trombosis y la calcificación de los injertos, además son de bajo costo, entonces el preservar arterias pulmonares mediante éstos procedimientos permitirá obtener una bioprótesis vascular que pueda ser utilizada como reemplazo de la misma cuando esta sea resecada.

IV.- OBJETIVOS.

1.1.- Objetivo general.

Evaluar la utilidad, cambios en la función cardiopulmonar, angiográficos, macroscópicos y microscópicos producidos en la arteria pulmonar de perros, después de ser reconstruida con aloinjertos de arteria pulmonar liofilizada y tratada con glutaraldehído y ácido glutámico.

1.2.- Objetivos específicos.

Valorar los cambios que se producen en la función cardiopulmonar, de perros, después de reconstruir la arteria pulmonar con aloinjertos de arteria pulmonar liofilizada y tratada con glutaraldehído y ácido glutámico.

Evaluar los cambios angiográficos que sufre la arteria pulmonar de perros, después de ser reconstruida con aloinjertos de arteria pulmonar liofilizada y tratada con glutaraldehído y ácido glutámico.

Determinar los cambios macroscópicos que se producen en la arteria pulmonar de perros, después de ser reconstruida con aloinjertos de arteria pulmonar liofilizada y tratada con glutaraldehído y ácido glutámico.

Evaluar los cambios microscópicos que se producen en la arteria pulmonar de perros, después de ser reconstruida con aloinjertos de arteria pulmonar liofilizada y tratada con glutaraldehído y ácido glutámico.

V.- MATERIAL Y MÉTODOS.

1.- Animales de Experimentación.

Se utilizaron 24 perros mestizos, clínicamente sanos, sin importar el sexo o la edad, con un peso entre 15 y 18 kg, seis de éstos animales fueron donadores y 18 receptores. Todos los animales se manejaron de acuerdo a las Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana ^[37] y de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos. ^[38]

1.1.- Criterios de inclusión.

Se incluyeron perros clínicamente sanos, que no presentaron antecedentes de alguna enfermedad respiratoria desde que llegaron al bioterio del INER y antes de que se les realizará el procedimiento quirúrgico.

1.2.- Criterios de exclusión.

Los animales con datos clínicamente patológicos desde su llegada al bioterio del INER y previos al procedimiento quirúrgico o con antecedentes de alguna cirugía de tórax fueron excluidos del estudio.

1.3.- Criterios de eliminación.

Todo animal que presento signos clínicos de cualquier patología que no se haya provocado por el procedimiento quirúrgico fue eliminado.

2.- Recursos.

El financiamiento de esta investigación fue otorgado por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán”.

En este estudio participaron el personal médico y técnico del departamento de Investigación en Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, quien proporciono los quirófanos, equipos de anestesia inhalada, monitores y un gasómetro para la valoración de signos vitales, así como el aparato de rayos X e instrumental necesario para

la realización de los procedimientos quirúrgicos, tratamientos y seguimiento postoperatorio de los animales.

También intervino en este estudio el personal del departamento de Investigación en Morfología del INER, quien proceso las muestras de los tejidos sometidos a estudio. La preparación de las arterias liofilizadas, preservación en glutaraldehído al 0.01% y el ácido glutámico para el lavado de éstas con el fin de retirar el exceso de glutaraldehído fue proporcionados por el departamento de Investigación en Cirugía Experimental del INER.

Los animales que se sometieron a estudio se obtuvieron de los centros antirrábicos de la ciudad de México y fueron preparados en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

3.- Obtención de las arterias pulmonares

Todos los perros fueron sometidos a anestesia general con pentobarbital sódico (Anestesal, Pfizer) a dosis de 28 mg/kg intravenoso y se realizó tricotomía y antisepsia de la región esternal con límite craneal en la entrada del tórax y caudal en la apófisis xifoides del esternón. Inmediatamente cada animal fue colocado sobre la mesa de cirugía en posición decúbito dorsal, se les colocó una cánula orotraqueal, se conectaron a un ventilador de volumen (Harvard Apparatus, Boston MA, USA) y fueron ventilados con un volumen corriente de 10 ml/kg una fracción inspirada de oxígeno (FiO_2) de 100% y 20 respiraciones por minuto.

Se delimitó la zona quirúrgica con campos de tela estériles, se incidió la región esternal por su línea media, el esternón fue seccionado en su línea media y se colocó un separador de Finochietto para hacer visibles las estructuras de la cavidad torácica. Acto seguido se llevo a cabo la disección y sección de la vena ácigos, se disecó y refirieron las venas cavas (craneal y caudal), tronco de la arteria pulmonar, así como la traquea y una vez realizado esto a cada animal se le administró heparina a dosis de 20 UI por kg de peso, finalmente a cada perro se le administró una sobredosis de pentobarbital sódico e inmediatamente después se extrajo el bloque cardiopulmonar.

Una vez que el bloque se encontró fuera de la cavidad, se disecó el tronco de la pulmonar y se seccionó desde su salida del corazón hasta su entrada en cada pulmón, inmediatamente la arteria se sumergió y se lavó en 100ml de una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9% adicionada con 5000 UI de heparina, 8000 UI de penicilina procaínica y 1 g de sulfato de estreptomicina por cada 500ml de solución. Una vez que se lavó la arteria, se colocaron tres cánulas de silicón (una en el tronco y otra dentro de cada una de las ramas) en la luz con el fin de mantener la estructura tubular durante los procesos de preservación con liofilización o su tratamiento con glutaraldehído. (Figura.1)



Figura 1. Mantenimiento de la estructura tubular de la arteria pulmonar mediante cánulas de silicón. Previo a su proceso de liofilización.

3.1.- Liofilización de los injertos vasculares arteriales

Una vez que las arterias se lavaron y se montaron sobre los tubos de silicón, se colocaron dentro de un matraz Erlenmeyer (Figura 1) que fue sellado con papel parafilm y congeló a una temperatura de -70°C durante 24 horas. Posteriormente se liofilizo a una temperatura de -43°C , con una presión de vacío de $< 300 \times 10^{-3}\text{ B}$. Una vez liofilizada se retiraron las cánulas y se empaquetaron para su esterilización con oxido de etileno. ^[39] Las arterias

esterilizadas, se almacenaron a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización. (Figura 2)

3.2.- Preparación de la arteria pulmonar con glutaraldehído.

Una vez que las arterias se lavaron y se montaron sobre los tubos de silicón, se depositaron dentro de un recipiente de polipropileno con una solución amortiguada de fosfatos con glutaraldehído a una concentración de 0.001%, con pH de 7.4 y temperatura de 4° C. (Figura 3)

En ésta solución, las arterias se almacenaron durante 15 días y transcurrido este tiempo los injertos vasculares se desmontaron de las cánula y se introdujeron nuevamente en la misma solución hasta dos días antes del procedimiento quirúrgico, que fue cuando se lavaron durante 30 minutos con salina fisiológica al 0.9 % para retirar el exceso de glutaraldehído.

Concluido el lavado la arteria se almacenó en una solución de ácido glutámico al 0.001% durante por 48 horas a 4° C. (Figura 4) Transcurrido éste tiempo e inmediatamente antes de su uso, las arterias se lavaron con una solución salina al 0.9%.





Figura 2. Muestra la arteria pulmonar liofilizada empaquetada y esterilizada



Figura 3. Preparación de arterias con glutaraldehído, solución amortiguadora de fosfatos.



Figura 4. Se puede observar el momento del lavado de la arteria pulmonar con ácido glutámico en el agitador

4.- Grupos de estudio.

Los animales fueron divididos en cuatro grupos de estudio.

Grupo I (n=6); Se realizó medición de parámetros hemodinámicos y gasométricos

Grupo II (n=6): Mediante toracotomía lateral izquierda se efectuó sección y anastomosis de la arteria pulmonar izquierda.

Grupo III (n=6): Se realizó disección y resección de la arteria pulmonar izquierda y ésta se reconstruyó con un aloinjerto de arteria pulmonar liofilizado.

Grupo IV (n=6): Por medio de toracotomía, se reseco y reconstruyó la arteria pulmonar izquierda con un aloinjerto de ésta, tratado con glutaraldehído al 0.01% lavada para retirar el exceso de éste con ácido glutámico.

5.- Anestesia.

Los animales se prepararon con 24 horas de ayuno para sólidos y 12 horas para líquidos.

La anestesia en todos los grupos de estudio se indujo con hidrocloreuro de xilacina (Rompun, Bayer) a dosis de 0.1 mg/kg y 6 mg/kg de propofol (Recofol, PISA) vía intravenosa (IV) mezclados en la misma jeringa e inmediatamente después se les aplicó dipirona (Metamizol Sódico-Nondol-Sector Salud) a dosis de 28 mg/kg IV como analgésico.^[40]

6.- Técnicas quirúrgica receptor.

Una vez anestesiados los animales fueron colocados sobre la mesa de cirugía en posición decúbito dorsal y se intubaron con una sonda orotraqueal (Baxter 6 Fr). Acto seguido se procedió a la tricotomía y lavado con jabón quirúrgico de la región costal izquierda, tomando como referencia el límite caudal de la región escapular y la doceava costilla. Finalmente se realizó la antisepsia de la zona con yodo povidona (Dermodine Solución, Dermodex S.A. de C.V.). Posterior a esto, cada animal fue colocado sobre la mesa de cirugía en posición decúbito lateral derecho y se conectó la cánula orotraqueal a un ventilador de volumen (Harvard Apparatus, Boston MA, USA) con un vaporizador (Isotec 3 Ohmeda) y la anestesia se mantuvo con isofluorano al 3.5%. (Figura 5)

Todos los animales se ventilaron con un volumen corriente de 15 ml/kg y una fracción inspirada de oxígeno (FiO₂) de 100% y 20 respiraciones por minuto, durante todo el procedimiento quirúrgico y se vigiló la frecuencia cardiaca con un monitor para electrocardiografía (Datascope Passport).^[40] Antes de iniciar la cirugía y después de delimitar la zona quirúrgica, los injertos de arteria pulmonar tratadas con glutaraldehído a utilizar fueron lavados por tres periodos de 10 minutos cada uno con solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9% estéril adicionada con ácido glutámico, para retirar el exceso de glutaraldehído.^[41] Mientras que las arterias liofilizadas también antes de iniciar la cirugía, se sumergieron por un lapso de 10 minutos en solución de NaCl al 0.9% estéril para su rehidratación. También después de que las arterias fueron lavadas y rehidratadas se tomo una muestra para cultivo microbiológico.^[42]

En los grupos II, III y IV se realizó toracotomía izquierda a nivel del quinto espacio intercostal, que es el sitio en donde se tiene mejor acceso al hilio pulmonar. La piel se incidió con bisturí, inmediatamente se procedió al corte y hemostasia del músculo escaleno (también con bisturí), posteriormente se continuó la incisión con tijera del músculo serrato ventral y se expuso el quinto espacio intercostal. Los músculos intercostales se incidieron en su parte media con tijera para evitar lastimar los vasos intercostales que viajan por la parte caudal de cada costilla y se expuso la pleura (Figura 6), la cual fue incidida con tijera, inmediatamente después se colocó un separador de Finochietto, se disecó y reseco la arteria pulmonar izquierda (Figura 7), la cual fue substituida con una rama de las arterias que fueron preparadas, mediante una anastomosis termino-terminal con material de sutura no absorbible de polipropileno 4-0 (Prolene, Ethicon) y sutura continua (Figura 8). Acto seguido se revisó que no exista sangrado en la zona de las anastomosis y se continuó con la colocación del sello de agua y cierre convencional.





Figura 5. Animal de experimentación colocado sobre la mesa de cirugía en posición decúbito lateral derecho, conectado al equipo de anestesia y al monitor cardiaco del laboratorio de Investigación Quirúrgica del INER.



Figura 6. Fotografía que muestra la disección de los músculos intercostales internos.
Nótese la integridad de la pleura parietal.

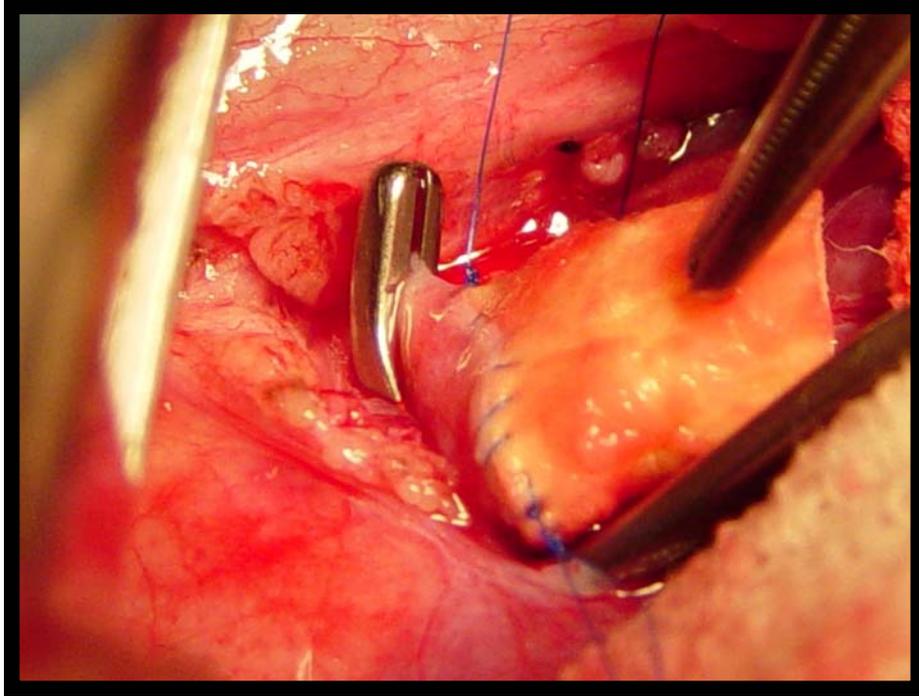


Figura 7. Fotografía que muestra la anastomosis de la arteria pulmonar con un aloinjerto liofilizado.

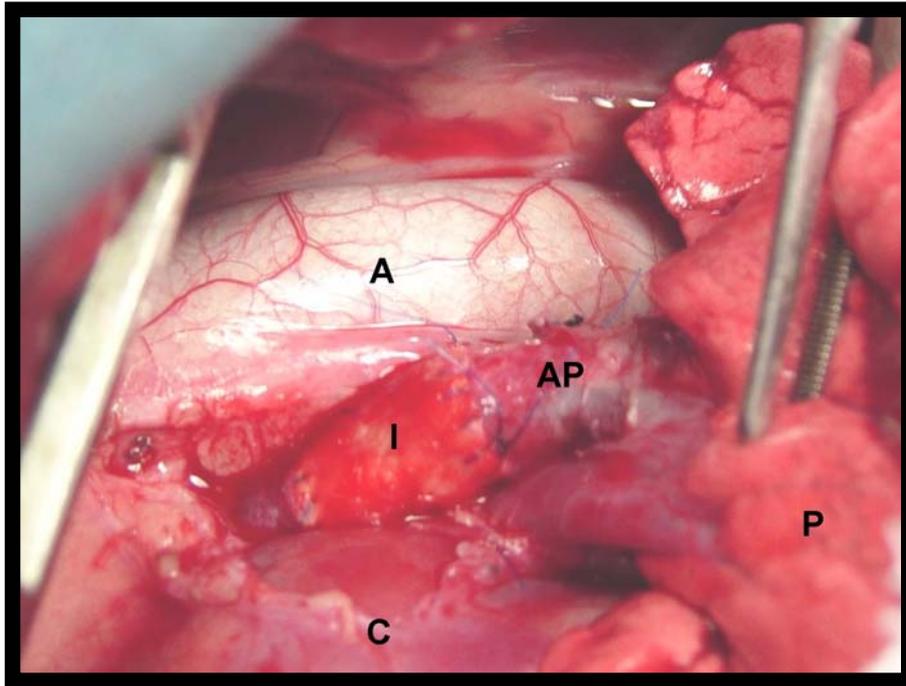


Figura 8. Fotografía que muestra el injerto de arteria pulmonar liofilizado. AP; Arteria Pulmonar. I; Injerto Liofilizado. A; Aorta. C; Corazón. P; Pulmón.

7.- Sello de agua.

El sello de agua fue elaborado con una botella de cuello ancho, la cual fue llenada en una tercera parte con agua, posteriormente se tapo el frasco con un tapón al que se le hicieron dos agujeros, por uno de ellos se paso un tubo de vidrio largo y por el otro un tubo de vidrio más corto. El tubo largo se colocó a 1.5 centímetros por debajo de la superficie del agua y el tubo de silicón que provenía de la cavidad pleural se conecto a éste tubo largo para que el gas saliera a través del mismo, cuando se aumentara la presión intrapleurales al insuflar los pulmones. Una vez que el aire salió de la cavidad y se condujo por el tubo de drenaje y por

el tubo largo de vidrio, éste pasa por debajo del agua de la botella y el aire borbotea hacia la superficie y sale al exterior por el tubo de cristal corto. ^[13]

8.- Evaluación.

8.1.- Clínica.

La duración del estudio fue de 4 semanas, los animales fueron evaluados de forma clínica dos días antes del procedimiento quirúrgico, diario durante la primera semana postcirugía y cada tercer día durante las tres semanas restantes. Dentro de ésta, se evaluó el grado de disnea de acuerdo a una escala modificada a la utilizada por la Medical Research Council, ^[43] la cuál se basa en la severidad de la misma: 0= sin dificultad para respirar después de correr, 1= dificultad para respirar después de correr, 2= dificultad para respirar en reposo.

La evaluación clínica consistió en realizar observación de cada animal dentro de su jaula, toma de temperatura, valoración de la coloración de mucosa oral, auscultación de la cavidad torácica mediante estetoscopio para evaluar la frecuencia respiratoria, ruidos respiratorios, y frecuencia cardíaca. Después de la cirugía además de esto, se revisó la existencia de inflamación y/o sangrado de la herida quirúrgica, así como, la presencia de enfisema subcutáneo sugerente de neumotórax.

El grado de disnea se evaluó sometiendo a los animales a una prueba de estrés, la cual se llevo a cabo primero observando a los animales en reposo dentro de su jaula, posteriormente cada animal caminó una distancia de 20 metros y finalmente corriendo (recorriendo la misma distancia) e inmediatamente después de esto se observó si los animales presentaban dificultad para respirar, vigilando la frecuencia respiratoria y cardíaca, escuchando los ruidos respiratorios, se observó si presentaban respiración torácica o abdominal, así como la coloración de la mucosa oral.

8.2.- Hemodinámica y gasométrica.

Se realizó evaluación de los parámetros hemodinámicas y gasométricos previo a la cirugía, inmediatamente después de colocar el injerto en la arteria pulmonar y al final del estudio.

Los parámetros hemodinámicos evaluados fueron: frecuencia cardiaca (FC), gasto cardiaco (GC), presión media de arteria pulmonar (PMAP), presión arterial media sistémica (PMAS), resistencia vasculares pulmonares (RVP), resistencia vasculares sistémicas (RVS). Mientras que los parámetros gasométricos evaluados fueron: presión inspiratoria máxima (PIM), presión parcial de oxígeno (O₂) y bióxido de carbono (CO₂) al igual que el pH tanto en las muestras sanguíneas arteriales como en las venosas. ^[44] El análisis estadístico de éstos datos se llevo a cabo mediante análisis de varianza (ANOVA y procedimiento Tukey/Kramer).

Para la evaluación de los parámetros hemodinámicos pulmonares se disecó y colocó un catéter de Swan Ganz 7F en la vena yugular derecha, el cual se dirigió hasta la arteria pulmonar, posteriormente este catéter fue conectado a una computadora de registro de gasto cardiaco (Hemodynamic Profile Computer Spectramed model SP-1445, Oxnard, CA-USA) y al monitor de electrocardiografía. (Figura 9)

Para la toma de muestras y medición de los parámetros hemodinámicos sistémicos, se realizó disección de la arteria y vena femoral derecha y se les introdujo un catéter de polivinilo. El catéter arterial se conectó al monitor de electrocardiografía y el catéter venoso fue conectado a una columna de agua con la que se midió la presión venosa central. ^[45] A través de éstos también se llevó a cabo la toma de muestras sanguíneas arteriales y venosas en las que se realizó la evaluación de los gases sanguíneos con un gasómetro (AVL Compact 2, Blood gas analyzer). Posteriormente éstos datos fueron anotados de forma individual en hojas de registro. (Suplemento 1)

8.3.- Radiológica.

Se tomaron placas de rayos X ventro-dorsales del tórax, para evaluar radiográficamente, presencia de neumotórax, llenado pulmonar, así como la silueta cardiaca, tráquea, esófago, vena cava y la posición del diafragma. Los estudios se realizaron antes, inmediatamente después del procedimiento quirúrgico y cada semana hasta que concluyo el tiempo de estudio.

8.4.- Angiográfica.

Al finalizar el estudio en todos los animales se realizó un estudio angiográfico de la arteria pulmonar y se evaluó la permeabilidad de la misma. Para esto a través del catéter colocado en la vena yugular derecha se inyectó material de contraste (Conray 400) y se tomó una placa radiográfica ventro dorsal durante el momento de la inyección, con lo que se hicieron aparentes los vasos sanguíneos del pulmón. (Figura 10)

8.5.- Macroscópica.

Una vez transcurridas 4 semanas postcirugía los animales fueron sometidos a eutanasia con sobredosis de pentobarbital sódico (Anestésal), macroscópicamente se revisó el estado de la anastomosis donde se colocó el injerto liofilizado o preparado con glutaraldehído y ácido glutámico respectivamente y mediante observación directa se evaluó su integración, cicatrización, presencia de trombos, estenosis del injerto, dehiscencia, infección o rechazo del injerto. (Figura 11)

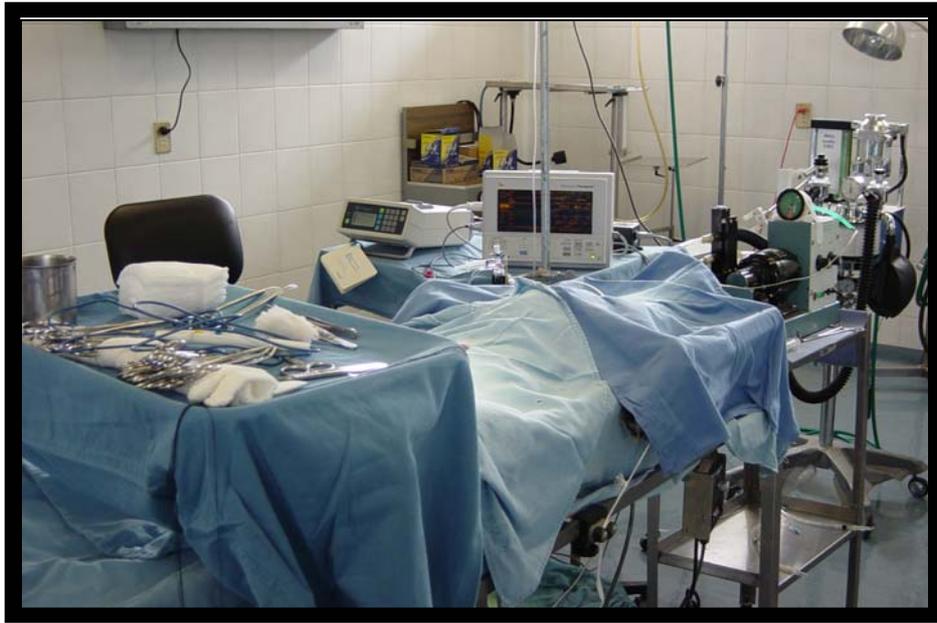


Figura 9. Monitoreo de los parámetros hemodinámicos, mediante la colocación de catéteres conectados a una computadora de registro de gasto cardiaco

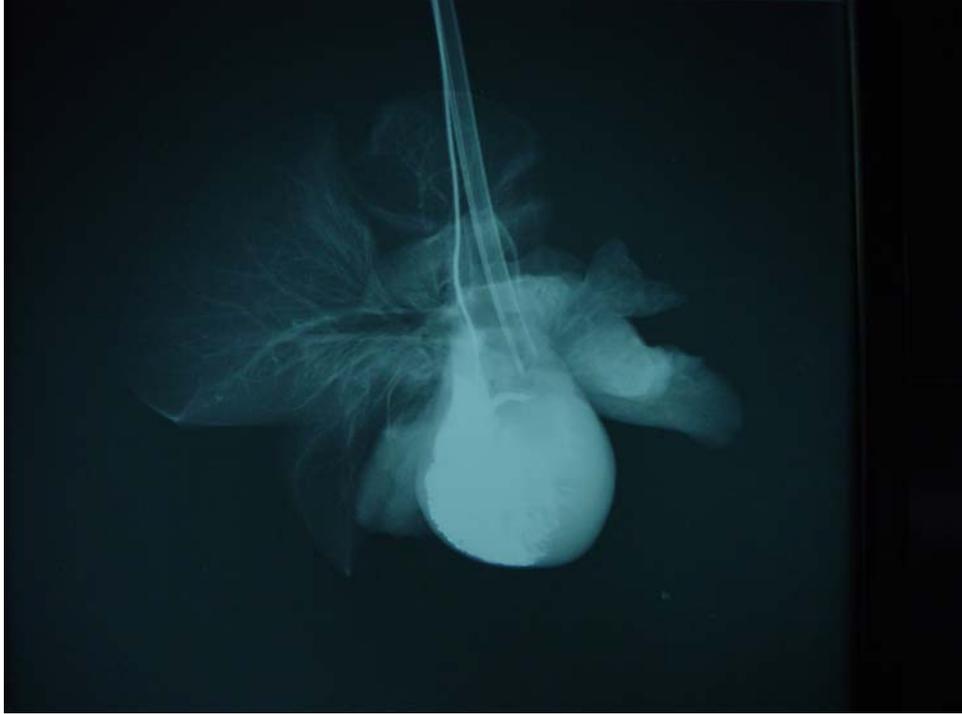


Figura 10. Angiografía ventro - dorsal de un animal del grupo II, en la que se observa la silueta cardíaca, la vena cava craneal (C) y la Arteria Pulmonar permeable (Flecha).



Figura 11. Procuración del injerto de arteria pulmonar al término del estudio, valoración macroscópica del estado de la bioprótesis.

8.6.- Microscópica.

Para la evaluación histológica se tomaron muestras de la arteria pulmonar izquierda e injertos al momento de realizar el procedimiento quirúrgico y al finalizar el estudio, dichas muestras se fijaron en formaldehído al 10%, posteriormente fueron incluidos en parafina, se les realizaron cortes de 4 μ m los cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina y tinción tricrómica de Massón. Una vez teñidas, por microscopia de luz a campo claro se les evaluó la presencia de formación de trombos, inflamación, dehiscencia o rechazo del injerto.

VI.- RESULTADOS.

1.- Control microbiológico de las arterias pulmonares.

Los cultivos microbiológicos realizados a las arterias pulmonares cuando concluyeron los 15 días de preservación en el glutaraldehído, después de su liofilización y antes de ser colocadas como injerto en la arteria pulmonar siempre resultaron negativos. Los cultivos realizados a la solución de preservación también fueron negativos.

2.- Hallazgos clínicos.

Todos los animales (100%) sobrevivieron al procedimiento quirúrgico y al tiempo de estudio establecido. En los tres grupos de estudio ningún animal sometido a cirugía presentó alguna diferencia clínica significativa, ya que sus constantes fisiológicas (temperatura, frecuencia cardíaca y respiratoria) se encontraron dentro de los parámetros normales. Con respecto a los ruidos respiratorios en todos los animales (100%) durante los cinco primeros días después del procedimiento quirúrgico, presentaron disminución de éstos en el hemitórax izquierdo, sin embargo éstos se normalizaron a partir del sexto día postcirugía.

En todos los animales (100%) operados la coloración de las mucosas antes, después del procedimiento quirúrgico y durante todo el tiempo de estudio se observó de color rosáceo.

A la revisión de la herida quirúrgica se presentó inflamación durante la primera semana postcirugía. En ningún perro (0%) se presentó sangrado posquirúrgico, ni enfisema subcutáneo después de la cirugía y la herida quirúrgica en los grupos II, III y IV de estudio se encontró bien cicatrizado a las dos semanas posteriores al procedimiento quirúrgico.

Con respecto a la evaluación de la disnea, todos los animales, cuando se les sometió a la prueba de estrés tuvieron una evolución satisfactoria sin problemas para respirar (grado 0).

Al comparar éstos hallazgos dentro de cada grupo y entre grupos no se presentó diferencia estadísticamente significativa (ANOVA y procedimiento Tukey/Kramer). (Cuadro 1)

Evaluación de la disnea

RESULTADOS			
GRADO DE DISNEA	GRUPOS DE ESTUDIO		
	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
0 (Sin dificultad para respirar después de correr)	6	6	6
1 (Dificultad para respirar después de correr)	0	0	0
2 (Dificultad para respirar en reposo)	0	0	0

p = ns (ANOVA)

Cuadro 1. Muestra el grado de disnea observado durante la evolución clínica en los tres grupos de estudio, después de colocar un injerto vascular en la arteria pulmonar izquierda.

3.- Hallazgos radiológicos.

Radiológicamente, al observar las placas ventrodorsales, inmediatamente después del procedimiento quirúrgico y al día posterior a este, se observó imagen sugerente de neumotórax en la parte craneal del hemitórax izquierdo, sin embargo no se observaron zonas de atelectasia en ningún lóbulo pulmonar, la silueta cardiaca, tráquea, esófago, vena cava y diafragma se encontraron en su posición anatómica correcta dentro de la cavidad torácica. El aire observado en la cavidad empezó a disminuir a partir del tercer día postcirugía y desapareció por completo en el día 5 posterior a ésta. En las placas posteriores y durante todo el estudio, en ningún perro (0%) se observó algún cambio, ya que las placas radiográficas mostraron los campos pulmonares normales sin zonas de atelectasia, así como la posición anatómica del corazón, traquea, esófago y vena cava.

4.- Hallazgos hemodinámicos y gasométricos.

En los cuatro grupos de estudio al comparar la frecuencia cardiaca (FC), presiones arteriales sistémicas; (sistólica, diastólica y media) (PAS, PAD y PAM), gasto cardiaco (GC), parámetros gasométricos arteriales: presión arterial de oxígeno (PaO₂), presión

arterial de bióxido de carbono (PaCO₂), pH arterial y parámetros gasométricos venosos: presión venosa de bióxido de carbono (PvCO₂), pH venoso, saturación venosa de oxígeno (SvO₂), así como la presión inspiratoria máxima (PIM) no mostraron cambios estadísticamente significativos (p=NS, ANOVA y procedimiento Tukey/Kramer), debido a que se mantuvieron dentro de sus valores fisiológicos normales.

Al realizar la evaluación de la presión arterial pulmonar sistólica (PAPS) al finalizar el estudio, esta se incrementó significativamente (ANOVA p<0.05) un 55% (X = 22.5 ± 2.35mm / Hg.) en el grupo IV en comparación con sus valores basales (grupo 1) después de haber sido colocado el injerto vascular, así mismo, este grupo mostró un incremento significativo (procedimiento Tukey/Kramer p<0.05) del 47 y 46 % respectivamente con el grupo II y III. (Tabla 1, Grafica 1) En lo que respecta a la presión arterial pulmonar diastólica (PAPD), aumentó significativamente (p <0.05) un 50% en el grupo IV con respecto al grupo I, II y III. (Tabla 1, Gráfica 2)

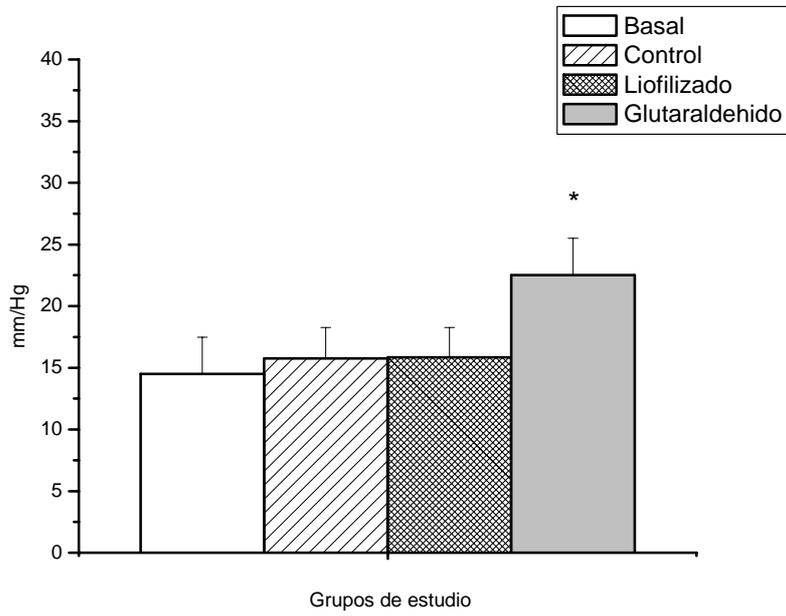
Tabla 1. Cambios hemodinámicos al finalizar el estudio.

<i>Parámetros hemodinámicos</i>	<i>Basal</i>	<i>Control</i>	<i>Liofilizado</i>	<i>Glutaraldehído</i>
PAPS	14.5 ± 2.98	15.75 ± 2.05	15.85 ± 2.40	22.5 ± 2.35 *
PAPD	6.83 ± 1.72	6.54 ± 1.43	6.83 ± 1.13	10.28 ± 1.28 *
PAPM	10.16 ± 1.49	11.01 ± 1.43	10.25 ± 1.81	13.55 ± 1.49 *
Pcuña	5.62 ± 0.41	7.54 ± 0.87	6.15 ± 0.44	12.45 ± 0.56**
RVP	2606.08±202.86	3815.6±418.37	2830.45±255.50	5044.08±439.99**

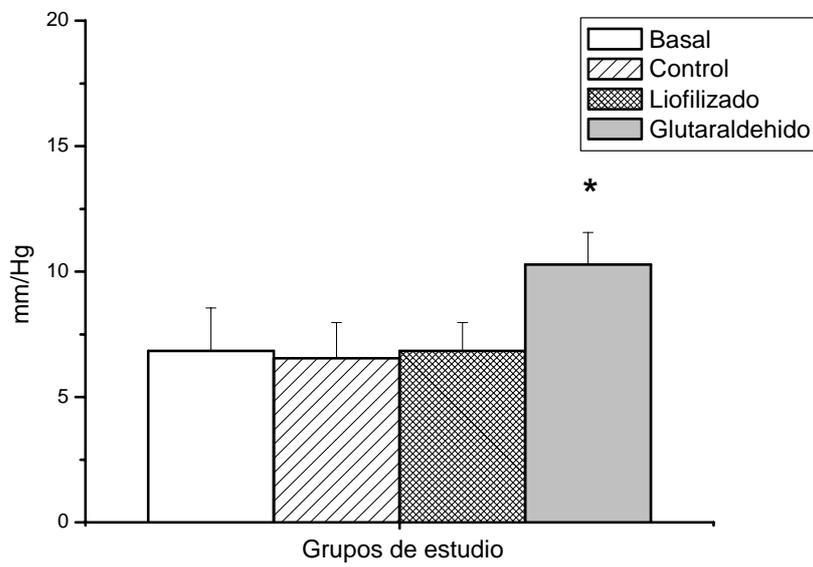
Promedio ± error estándar

ANOVA p <0.05 entre grupos

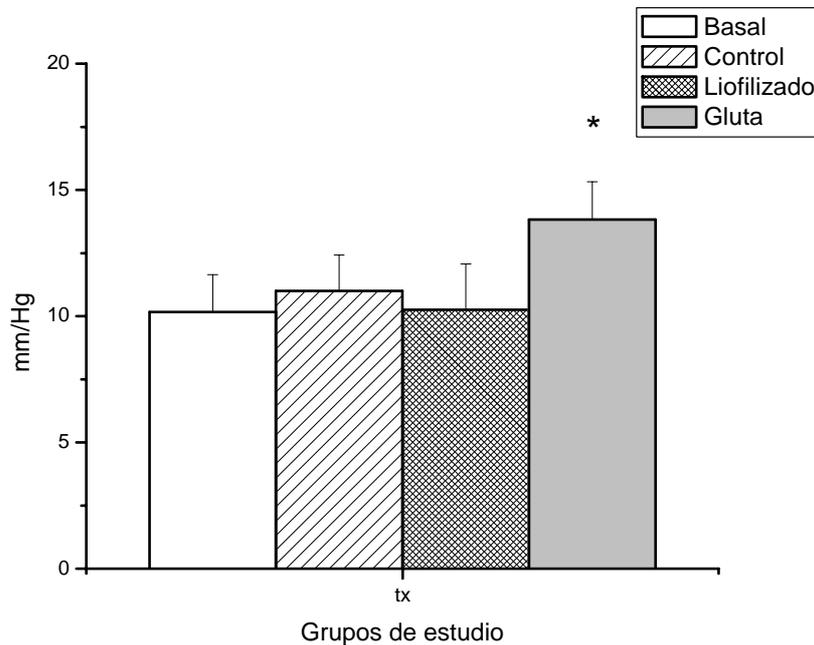
Procedimiento Tukey/Kramer *p <0.05 ** p <0.01



Gráfica 1. Incremento de la PAPS en el grupo IV en comparación con sus valores básales y entre grupos.



Gráfica 2. Incremento de la PAPD en el grupo IV en comparación con el grupo I, II y III.



Gráfica 3. Incremento de la PAPM en el grupo IV al comparar entre grupos (procedimiento Tukey/Kramer $p < 0.05$).

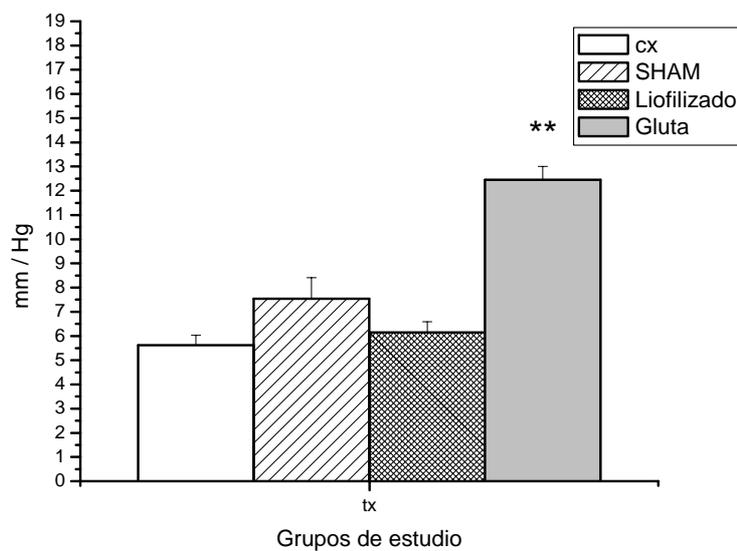
Al valorar la presión arterial pulmonar media (PAPM) en el grupo IV se incrementó significativamente, ($p < 0.05$) en un 33% en comparación con el grupo I y III, con una presión promedio de 13.55 ± 1.49 mm / Hg. al finalizar el estudio y un 25% con respecto al grupo II. (Tabla 1, Gráfica 3)

En el grupo IV la presión en cuña de la arteria pulmonar izquierda se incrementó significativamente ($p < 0.01$) un 121% al término del estudio, en comparación con el grupo I, 87% con el grupo II y 112% con el grupo III. (Tabla 1, Gráfica 4)

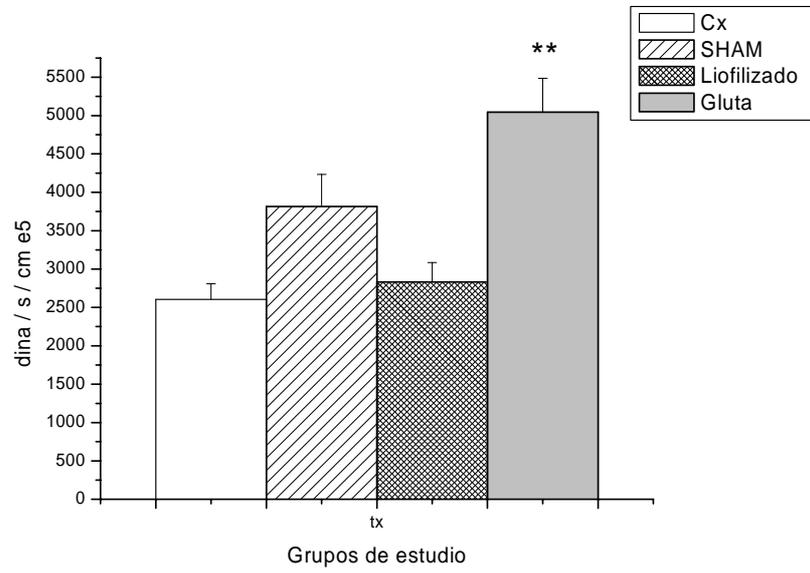
Al realizar la evaluación de la resistencia vascular pulmonar (RVP) encontramos un incremento significativo ($p < 0.01$) del grupo IV en un 93 % con respecto al grupo I, un 47% en el grupo II y un 85% en el grupo III finalizado el tiempo de estudio. (Tabla 1, Gráfica 5).

5.- Hallazgos angiográficos.

Al evaluar la permeabilidad de la arteria pulmonar mediante la realización de angiografías, en los tres grupos de estudio se observó permeabilidad tanto de la arteria pulmonar como del injerto (Figura 12).



Gráfica 4. Incremento de la presión en cuña de la arteria pulmonar izquierda en el grupo IV en comparación con los otros grupos.



Gráfica 5. Incremento de la RVP en el grupo IV en comparación con el grupo I y III.

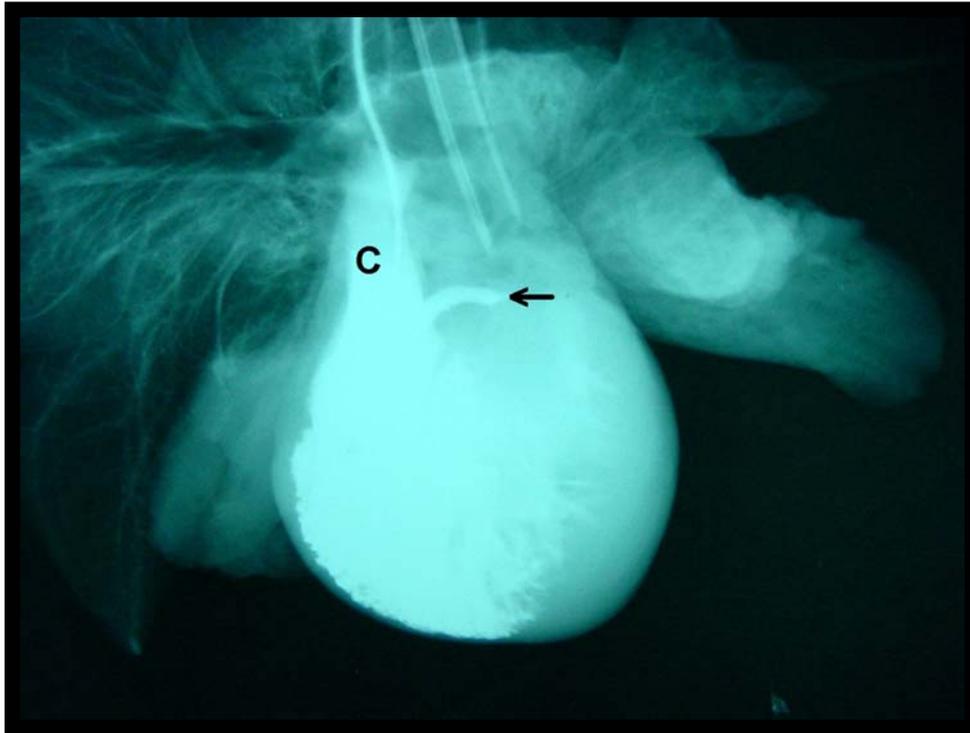


Figura 12. Angiografía ventro-dorsal de un animal del grupo II, en la que se observa la silueta cardíaca, la vena cava craneal (C) y la Arteria Pulmonar permeable (Flecha).

6.- Hallazgos macroscópicos.

Cuando los animales fueron sometidos a eutanasia, a la evaluación macroscópica de la adventicia, en ningún grupo se presentó evidencia alguna de infección, estenosis, dehiscencia, o rechazo del injerto y se observó buena integración del injerto hacia la arteria pulmonar, la cual estuvo caracterizada por el desarrollo de tejido cicatrizal sobre ambas anastomosis.

A la evaluación de la luz del injerto en los 6 animales (100%) del grupo II y III se observó permeable en su totalidad y con el endotelio perfectamente cicatrizado y sin presencia de trombos. Mientras que en los animales del grupo IV; 2 (33.3%) perros, mostraron permeabilidad del 90% y buena cicatrización de su luz. Los otros 4 (66.6%) animales de experimentación de este grupo desarrollaron un trombo en todo el injerto, el cual solo permitió tener permeable la arteria en un 75%.

7.- Hallazgos microscópicos.

Al realizar la evaluación microscópica de los segmentos arteriales anastomosados así como de los injertos, las muestras de los seis (100%) animales del grupo II tomadas al final del procedimiento quirúrgico mostraron una apariencia normal con desarrollo de fibras de colágena en el sitio de la anastomosis. (Figura 13).

El estudio histológico de la arteria pulmonar en cinco (83.3%) de los animales del grupo III, mostró una presencia de fibras de colágena con orientación longitudinal, sin presencia de trombos. El animal restante (16.6%) de este grupo, desarrolló un infiltrado inflamatorio a base de linfocitos en el sitio de la anastomosis. (Figura 14)



20x



20x

Figura 13. Microfotografía a campo claro. Túnica adventicia, con apariencia normal de las fibras de colágena. Izquierda: hematoxilina y eosina (HE), Derecha: tricrómica de Masson
Ambas del grupo II.

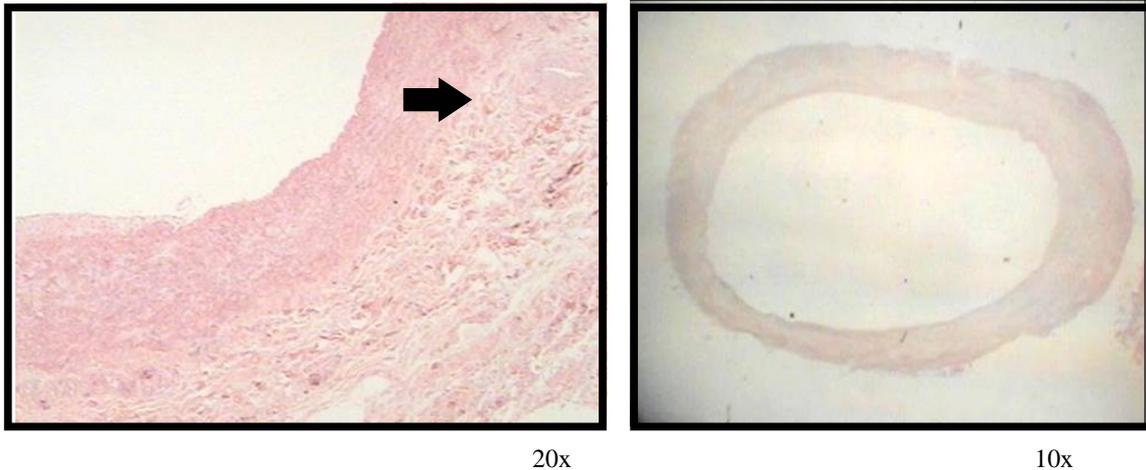
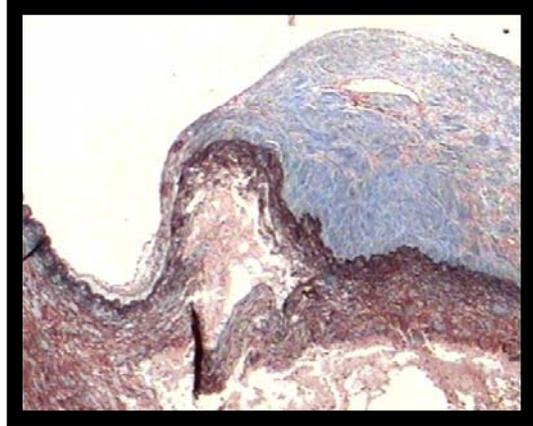


Figura 14. Arteria pulmonar liofilizada. Se observa la luz libre de trombos. Izquierda; infiltrado linfocitario (flecha). Tinción HE

En el grupo IV, en todos los casos (100%) se observó desarrollo de tejido cicatrizal, caracterizado por la formación de fibras de colágena en forma desorganizada. Cuatro de éstos animales (66.6%) presentaron depósitos de colágena adheridos a la pared interna del vaso sanguíneo, también mostraron la presencia de un trombo que ocupaba aproximadamente el 35% de la luz. (Figura 15)



10x



20x

Figura 15. Cortes de arteria pulmonar del grupo IV al finalizar el estudio. Izquierda: trombo adherido a la pared, tinción HE. Derecha: Tricrómica de Masson que muestra un depósito de colágena en el trombo

VII.- DISCUSIÓN.

La conducta médica para el tratamiento de reemplazo con injertos vasculares, ha sido influenciada por diversas experiencias adquiridas en la realización de distintos ensayos tanto clínicos como experimentales, en los que se busca una prótesis adecuada con el fin de mantener el flujo sanguíneo y evitar daños en la función cardiopulmonar, permitiendo al paciente realizar actividades físicas básicas.

El desarrollo de conductos extracardiacos ha tenido grandes avances en la cirugía cardiaca y la creación de éstos ha disminuido la mortalidad de varias cirugías estándar, además de que ha hecho posible la corrección de numerosas anomalías cardíacas congénitas que antes no se podían tratar. ^[15, 20, 21]

El método más aceptado para sustituir la arteria pulmonar y permitir el flujo óptimo del ventrículo derecho hacia el pulmón, es mediante la reconstrucción de la misma, utilizando un prótesis, sin embargo se ha reportado que del 45 al 84% de los pacientes operados con éstos, tienen que ser reoperados a largo plazo, ya que éstos llegan a formar trombos o calcificaciones e infecciones. ^[24, 25, 26]

Lo más reciente para el tratamiento de reemplazo de vasos sanguíneos es la procuración y preservación mediante la liofilización, la cual consiste en la deshidratación del vaso sanguíneo mediante un proceso de congelación, para disminuir las propiedades antigénicas del implante, permitiendo así, el reestablecimiento de la presión vascular normal. ^[27, 29, 32]

Otra opción en la terapia de reemplazo de vasos sanguíneos y por sus propiedades químicas es el glutaraldehído, que se ha utilizado en la preservación de injertos vasculares, debido a que mantiene la integridad arquitectónica del tejido, confiriéndole rigidez y disminuir la antigenicidad del vaso facilitando así el trasplante. Su preservación consiste en sumergir los injertos inmediatamente después de su procuración en una solución preparada con glutaraldehído al 0.01%, mejorando la tolerancia y durabilidad de las prótesis. ^[30]

En el presente estudio se ha propuesto que estas dos técnicas reducen la antigenicidad del injerto bloqueando el fenómeno de rechazo, evitando así, la formación de trombos y la calcificación de los injertos, permitiendo una distribución de flujo adecuada.

Con el fin de probar esta hipótesis, al realizar los cultivos microbiológicos del injerto liofilizado y el injerto tratado con glutaraldehído después de 15 días de preparados y antes de que fueran utilizados para la sustitución de la arteria pulmonar en el grupo III y IV de este estudio, encontramos que todos (100%) fueron negativos debido a que el glutaraldehído actúa como germicida desnaturalizando las proteínas de los agentes infecciosos y con esto, también reduce la antigenicidad.^[31] Éstos hallazgos tienen similitud con los encontrados por el Dr. Ray y colaboradores, quienes tampoco observaron crecimiento de microorganismos en sus cultivos de pericardio bovino tratado con glutaraldehído que utilizó para formar tubos que se colocaban como substitutos de aorta abdominal en perros.^[48, 49]

Al comparar la evolución clínica de los perros sometidos a cirugía de transplante de arteria pulmonar, se observó que todos los animales (100%) presentaron una evolución clínica satisfactoria sin presencia de sangrado posquirúrgico, enfisema subcutáneo o alteración en sus constantes fisiológicas poscirugía y durante todo el tiempo que duró la investigación, porque ambos injertos se integraron bien al tejido vascular y tuvieron una adecuada cicatrización con lo que se evitó así hemorragias y formación de trombos, manteniendo una buena hemodinámica e intercambio gaseoso.

En cuanto a la evaluación de la disnea en este estudio, en ningún animal (0%) después del procedimiento quirúrgico se presentó dificultad para respirar, debido a un manejo apropiado del dolor, el cierre de la pared torácica, y la correcta colocación del sello de agua evitando fugas de aire y las complicaciones que estas podrían provocar (neumotórax, disnea, enfisema subcutáneo).

Radiológicamente no se encontró diferencia alguna, porque la bioprótesis se integró sin ningún problema al tejido vascular, sin mostrar presencia de hemorragia o una reacción

inflamatoria severa. Esto es similar a lo que se observa en placas radiográficas simples, en donde únicamente podemos visualizar la estructura del pulmón y la salida de los grandes vasos sin tener mucha definición en la arteria pulmonar por lo que se tuvo que corroborar mediante la inyección de material de contraste (Conray 400) haciendo evidentes los vasos sanguíneos del pulmón, encontrando una permeabilidad en el 100% de los animales.

El incremento en las presiones pulmonares locales y la resistencia vascular pulmonar encontrada en el grupo IV, nos indican hipertensión pulmonar, siendo ocasionada por la obstrucción en el flujo de la sangre que expulsa el ventrículo derecho, desde las arterias pulmonares a las venas pulmonares y a la aurícula izquierda, Debido a que la circulación pulmonar es un sistema de flujo alto y de presión baja no se mostraron alteraciones al valorar las presiones sistémicas y gasométricas. ^[2]

Macroscópicamente en este estudio se presentó una buena integración del injerto al tejido vascular, con la luz del vaso completamente permeable debido a que en el implante liofilizado proliferaron depósitos de colágena bien organizada no sucediendo lo mismo en cuatro animales (66%) del grupo IV que presento un trombo en la luz del vaso. Actualmente no existe un trabajo sobre la adaptación macroscópica del injerto liofilizado o tratado con glutaraldehído sobre el endotelio vascular.

Las muestras examinadas por microscopia de luz a campo claro, en todos los grupos de este trabajo mostraron buena integración de la bioprótesis al tejido pulmonar, caracterizada por una buena cicatrización, constituida por fibras de colágena y fibras elásticas, sobre el sitio de anastomosis. Un animal (16.6%), mostró una reacción inflamatoria mínima con presencia de algunos linfocitos. Estos datos señalan que el tratamiento de vasos sanguíneos mediante la liofilización, efectivamente reduce la antigenicidad del tejido, con lo que se bloquea el fenómeno de rechazo y lo convierte en un material inerte, ya que en ningún animal (0%) se presento una reacción de incompatibilidad a la prótesis. La presencia de linfocitosis en un animal (16.6%) del grupo II, fue debida principalmente a un proceso de inflamación crónica en los que los linfocitos se presentan por motivos desconocidos. Sin embargo este tipo de inflamación crónica pudiera terminar en cicatrización.

VIII.- CONCLUSIONES.

De acuerdo a lo descrito se puede concluir que:

La liofilización y el tratamiento con glutaraldehído son procesos químicos adecuados que permiten preservar arterias pulmonares para ser utilizadas como sustitutos de la misma y mantener el flujo sanguíneo adecuado entre en el ventrículo derecho y el pulmón.

La liofilización de arterias pulmonares caninas mantiene los parámetros hemodinámicos y gasométricos dentro de los límites normales.

Las arterias liofilizadas permiten desarrollar la formación de un tejido cicatrizal más organizado evitando la obstrucción de la luz del vaso.

Las arterias pulmonares tratadas con glutaraldehído incrementaron los parámetros hemodinámicos en la circulación menor, haciéndolas por lo tanto, una prótesis inadecuada para la sustitución de la arteria pulmonar.

Las bioprótesis tratadas mediante liofilización ó con glutaraldehído, preparadas tienen un costo mínimo en comparación con el comercial, son fáciles de preparar, poseen una adecuada resistencia, flexibilidad y manejo quirúrgico.

IX.- LITERATURA CITADA.

1. Latarjet, RL. Anatomía Humana. 4ª ed. Médica Panamericana, 1999: 1053-1054 1266-1277.
2. Tresguerres J.A. Fisiología Humana. 7ª ed. Interamericana de España, 2000: 692-695.
3. Guyton CA. Tratado de Fisiología Médica. 10ª ed. Interamericana Mc Graw-Hill 1999: 431-432.
4. Harrison, T. Principles of Internal Medicine. 15ª ed. Interamericana Mc Graw-Hill. Vol II 2002: 1413.
5. Moore, K. Embriología clínica. 6ª ed. Interamericana Mc Graw-Hill 1999: 332, 343-345.
6. Leeson, TS. Texto atlas de histología. 7ª ed. Interamericana, Mc Graw Hill 2002: 314, 530.
7. Rivero, S. Neumología. 4ª ed. Trillas 2002: 26
8. Hollinshead, WH. Anatomía Humana. 8ª ed. Harla 2003: 555.
9. Guadalajara JF. Cardiología. 4ª ed. Méndez Editores 1999: 36-37
10. Yokochi, C. Anatomía del cuerpo humano. 4ª ed. Interamericana Mc Graw Hill 2001: 60, 61.
11. Visner, GB. Isolation and maintenance of human pulmonary artery endothelial cells in culture isolated from transplant donors. Journal of Investigative Surgery. 2001 Jul-Aug; 16(4):209-17.
- 12 Schwartz, S. Principios de cirugía. Vol. I. Interamericana. Mc Graw Hill 1995: 690.
13. Olmos-Zuñiga JR. Evaluación De La Utilidad Del Pericardio Bovino En Resecciones Pulmonares No Anatómicas En Perro. (Estudio Experimental) (Tesis de Maestría en Ciencias). México D.F. Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia. UNAM 2000
14. Dennis D,C. The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice, Non-cardiac Surgical Diseases of the Thorax. W.B. Saunders Company, v17, No.2 1987. pp 398-400.
15. Cerfolio R., Danielson G, Warnes C, Puga FJ, Schaff H, Anderson B and Ilstrup D. Results of an autologous tissue reconstruction for replacement of obstructed extracardiac conduits. J. Thorac Cardiovasc Surg. 1995; 110:1359-1368.

16. Shinoka T., Shum-Thim D., X Ma P., Tanel R., Isogai N., Langer R., Vacanti J. and Mayer J Jr. Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998; 115: 536-545.
17. Mayer JE. Jr. Uses of homograft conduits for right ventricle to pulmonary connections in the neonatal period. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 1995; 7: 130-132.
18. Hoerstrup S.P., Kadner A., Breyman C., Maurus C., Guenter C., Sodian R, Visjager J., Zund G and Turina M. Living, autologous pulmonary artery conduits tissue engineered from human umbilical cord cells. *Ann Thorac Surg,* 2002; 74:46-52.
19. Agarwal KC, Edwards WD, Feldt RH, Danielson GK, Puga FJ, McGoo DC. Clinicopathological correlates of obstructed right-sided porcine valve extracardiac conduits, *J Torac Cardiovasc Surg* 1891;81:591-601.
20. Wallace RB, Rastelli GC, Ongley PA, Titus JL, Mc Goon DC Complete repair of truncus arteriosus defects, *J Torac Cardiovasc Surg* 1969;57,95-107.
21. Malm JR, Bowman FO Jr, Harris PD, Kowalik AT. An evaluation of aortic valve homografts sterilized by electron beam energy. *J Torca Cardiovasc Surg* 1967; 54 471-7
22. Bando K, Danielson GK, SCAF HV, Mair DD, Julsrud PR, Puga FJ. Outcome of pulmonary and aortic homografts for right ventricular outflow tract reconstruction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;109:509-18.
23. Schoen FJ., Mitchell RN., Jonas RA., Pathological considerations in cryopreserved allograft heart valves. *J heart Valve Dis.* 1995; 4: 72-76.
24. Cleveland DC., Williams WG., Razzouk A. Failure of cryopreserved homograft valved conduits in the pulmonary circulation. *Circulation.* 1992; 86 (Supply): II 150-153.
25. Gerestein CG., Takkenberg J., Oei F., Crome-Dijkhuis A., Spitaels S., Van Herwerden L., Steyerberg E. and Bogers A.C. Right ventricular outflow tract reconstruction with an allograft conduit. *Ann Thorac Surg.* 2001; 71: 911-918
26. Willems Tp, Bogers AJ., Cromme-Dijkhuis Ah. Allograft reconstruction of the ventricular outflow tract *Eur J Cardiothorac Surg* 1996; 10: 609-615

27. Rey L Basic Aspects and Future Trends in the Freeze-Drying of Pharmaceuticals. *Dev Biol Stand* 74:3-8, 1992.
28. Jamieson EW and David ET Introduction to International Commit for the Advancemans of Biopróthesis *Ann Thorac Surg* 60: S 61-S64, 1995.

29. Mestres AC Muler J., and Primar JL Large Caliber Cryopreserved Arterial Allografts in Vascular Reconstructive Operations. *Ann Torca Surg* 60: S 105-7, 1995
30. Grabenwoger M. Sider J. and Fitzal F Impacto f Glutaraldehyde on Calcification of Pericardial Bioprosthetic Heart Valve Material *Ann Thorac Surg* 62, 772-777 1996
31. Grabenwoger M., Grim M Eybl E et al Decreased Tissue Reaction to Bioprosthetic Herat Valve Material alter L-Glutamic Acid Treatment *J of Biol Mat Res* 26: 1231-1240 1992.
32. Ohkado A. Hachida M Hoshi H et al Problems in Preservation of Allogenic Herat Valves and Vessels. *Transplantation Proceedings* 31: 2047-2048, 1999
33. Pratt MF and Schneider JG Microsurgical Application of Freeze Dried Arterial Allografts *Laryngoscope* 96: 695-29 1986)
- 34 Pratt MF Schneider JG and Galley FR Experimental Freeze Dried Micro arterial Allografts in Rabbits *Arch Otolaryngology Head Neack Surg* 113. 953-58 1987
35. Motomura M., imakita M Yutani Ch. Et al Histological Modification by Cryopreservation in Rat Aortic Allografts *Ann Thorac Surg* 60:S168-S171, 1996
36. Najmaddin A., Clifford PC Chant Ad et al. Inflow Site its Effect on Femoroapopliteal and Distal Graft Patency *Br. J Surg* 75: 434-35 1988
37. Leukauf C., Szeles C Salaymeh L et al In vitro and in vivo endothelization of glutaraldehyde treated Bovine Pericardium *Journal of Heart and Valve Disease* 2. 230-35 1993
38. McGann LE Yang Hy and Walterson M Manifestations of Cell Damage after Freezing and Thawing. *Cryobiology* 25 178-185 1988
39. Estados Unidos Mexicanos. AFÍA. Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. *Diario Oficial de la Federación* 6 dic, 1999
40. National Institutes of Health U.S.A. Guía Para el Cuidado y Uso de Los Animales de Laboratorio. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health U.S.A. Edición Mexicana Auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. México, D.F. 2002
41. Sotres Vega Avelina, Olmos-Zuñiga J. Raúl, Jasso-Victoria Rogelio, Gutiérrez-Marcos L. Miguel, Franco-Oropeza Armando y Santillán Doherty Patricio. *Arterias Caninas*

Preservadas Como Material Didáctico Para La Realización De Anastomosis Vasculares, Rev. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. 2002; 15 (2): 78-83

42. 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

43. Scintilla Doherty P., Jasso Victoria R., Sotres Vega A., Olmos R., Arreola J.L., García D., Gaxiola M., Vanda B., Santibañez A., Martin S and Cabello R.: Thoracoabdominal Wall Repair With Glutaraldehyde-Preserved Bovine Pericardium. J. Invest Surg. 1996; 9: 45—55

44. Olmos Zuñiga J. Raúl, Jasso Victoria Rogelio, Sotres Vega Avelina, Gaxiola Gaxiola Miguel, Cedillo Ley Ivonne, Argote Green Marcelo and Santillán Doherty Patricio. Suture Line Reinforcement With Glutaraldehyde Preserved Bovine Pericardium For Non-Anatomic Of Lung Tissue Resection. Journal of Investigative Surgery. 2001; 14 (3): 161–8

45. American Thoracic Society. Task Group on Screening for Respiratory Disease in Occupational Settings. Am Rev Respir Dis. 1982, 126: 952-56

46. Sotres Vega Avelina, Jasso-Victoria Rogelio, Olmos-Zuñiga J. Raúl, Franco-Oropeza Armando, Gutiérrez-Marcos L. Miguel y Santillán Doherty Patricio. *Gasometrías En Perros Mestizos*. Rev. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. 2002; 15 (3): 153-61.

47. Olmos Zuñiga J.R., Sotres A., Jasso R., Díaz M.A., Espinosa G., Arreola J.L., Cedillo I y Santillán Doherty P.: Evaluación De Cambios Hemodinámicos Y Gasométricos Producidos Por Neumoperitoneo Experimental Con Bióxido De Carbono Y Helio En Perros. Revista Del Instituto Nacional De Enfermedades Respiratorias 1997; 10 (1): 18-23.

48. Rey A, Marquez LA y Heine JL Pericardio bovino tratado con glutaraldehído en la aorta de perros. 1982 pp. 161 - 165

49. Rey A. Hernioplastia ventral infraumbilical en equino con pericardio de bovino tratado con glutaraldehído. Reporte de un caso. Memorias del primer congreso Nacional de Cirugía Veterinaria, FMVZ UNA; 1987, 136 -138.

SUPLEMENTO 1.

Protocolo Reconstrucción de Arteria Pulmonar

Operado: _____

Fecha _____ No Registro Animal _____ No Experimento _____ AP _____ Peso _____

	Basal	Basal	Post Tx	15 min.	30 min.	45 min.	60 min.	75 min.	90 min.	105 min.	120 min.	135 min.	150 min.	Final
FC														
PAS														
PAD														
PAM														
PSAP														
PDAP														
PMAP														
Pcuña														
PVC														
GC														
RAP														
RVPi														
RVS														
RVSi														
DavO2														
PaO2														
PaCO2														
ph art														
PvO2														
PvCO2														
ph ven														
SaO2%														
SvO2%														
PIM														

Hb _____ FiO2 _____ VC _____ FC _____