

**EFFECTOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE ENDOTELIO VASCULAR
SOBRE LA CICATRIZACIÓN TRAQUEAL, DESPUÉS DE UNA
REANASTOMOSIS Y AUTOTRASPLANTE DE TRAQUEA CERVICAL EN
RATAS**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE: ESPECIALISTA EN
OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO**

P R E S E N T A

DRA. IVETTE CAROL RODRÍGUEZ REVILLA

**BAJO LA DIRECCIÓN DE
M. C. J. RAUL OLMOS ZUÑIGA**

**CO-ASESORES
DR ROJELIO JASSO VICTORIA
DR ANTONIO SODA MERHY**

MÉXICO DF, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

M. en C. RAÚL OLMOS ZÚÑIGA
ASESOR DE TESIS
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA EXPERIMENTAL INER

DR. ANTONIO SODA-MERHY
CO-ASESOR DE TESIS Y PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE
OTORRINOLARINGOLOGIA INER

DR. ROGELIO JASSO-VICTORIA
CO-ASESOR DE TESIS
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA EXPERIMENTAL INER

M. en C. AVELINA SOTRES-VEGA
CO-ASESOR DE TESIS
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA EXPERIMENTAL INER

DR MIGUEL GAXIOLA-GAXIOLA
CO-ASESOR DE TESIS
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA EXPERIMENTAL INER

DR. PATRICIO SANTILLÁN-DOHERTY
CO-ASESOR DE TESIS
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA EXPERIMENTAL INER

DEDICATORIA

A Consuelo por todos los años de esfuerzo y desvelo que permitieron que llegue a esta etapa de mi vida y por todo este tiempo de ausencia.

A mi esposo Ramiro , muchas gracias por todo el apoyo incondicional, por todas esas horas desveló y por siempre confiar en mi.

A mi padre y mis hermanos (Javier, Herbert) por todo el cariño y la amistad que siempre me han dado.

AGRADECIMIENTOS

A todo el equipo de el laboratorio de cirugía experimental en especial a M. en C. Raúl Olmos, Dr. Rogelio Jasso y a M. En C. Avelina Sotres por haber hecho posible la realización de esta tesis, por todas las enseñanzas, por su apoyo incondicional y la amistad que me brindaron.

AL DR. ANTONIO SODA MERHY por permitir que forme parte de este excelente departamento y por sus enseñanzas.

AL DR ARTURO RAMÍREZ Y DRA LISETTE CRISTERNA por todas sus enseñanzas durante estos años.

A mis adscritos: DR BERNANDRO DAVILA, DR. BRAVO, DR ALEJANDRO JIMENEZ CHOBILLON, DR. GABRIEL TONA ACEDO, , DRA MARIA LIDIA SÁNCHEZ Y DRA CARMEN TIRADO.

Gracias a mis compañeros y amigos que me ayudaron a formarme durante la residencia: LUIS PEDRO, YURIA, NIDIA, RODSBERTO, INGE, MARIO, NACHO, CARLOS, ELOISA, LEONARDO, ALBERTO, FERNANDO, ROSALVA, IOHANNAN, SCHOBERT, DANIEL , CARLA, LAURA, GABRIEL, KAREN, , y JAIME.

Dra. Arango muchas gracias por su apoyo y amistad.

Al personal de enfermería: Tere, Blanca, Mary, Anita, Emma.

INDICE

DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
RESUMEN	VI
INDICE	1
I. INTRODUCCIÒN	3
II. JUSTIFICACIÒN	6
III. HIPOTESIS	6
IV. OBJETIVOS	7
1. Objetivo general	
2. Objetivo especifico	
V. MATERIAL Y METODOS	8
1. Recursos	
2. Animales de experimentaciòn	9
2.1 Criterios de inclusiòn	
2.2 Criterios de exclusiòn	
2.3 Criterios de eliminaciòn	
3. Grupos de estudio	10
4. Anestesia	10
5. Tècnica quirùrgica	11
6. Evaluaciòn	13
6.1 Clìnica	13
6.2 Macroscòpica	13
6.3 Morfomètrica	14
6.4 Microscòpica	14
6.4 Angiogènica (Inmunohistoquímica)	15
VII. RESULTADOS	17
1. Clínicos	17
2. Macroscòpicos	17
3. Morfomètricos	19
4. Microscòpicos	19
5. Angiogènicos (Inmunohistoquímica)	22

VIII. DISCUSIÓN	23
IX. CONSLUSIÓN	27
X. FIGURAS	28
XI. CUADROS	36
XII. GRÁFICAS	40
XIII. BIBLIOGRAFÍA	41

RESUMEN

Uno de los problemas que ha dificultado el trasplante traqueal es la revascularización de injerto. El factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), es una glicoproteína que se secreta durante la isquemia e hipoxia y actúa como un potente inductor de la angiogénesis promoviendo la cicatrización del tejido y evitando la necrosis del mismo. El objetivo del estudio es evaluar la cicatrización, cambios macroscópicos, microscópicos e inmunohistoquímicos producidos por el VEGF al aplicarlo en la traquea de ratas, después de realizar reanastomosis de traquea cervical y autotrasplante de 6 anillos traqueales cervicales. Material y métodos. Se utilizó 40 ratas Wistar que se dividieron en 4 grupos de estudio (n=10): Sección y reanastomosis de traquea cervical con aplicación tópica en el sitio de anastomosis de: Grupo I: Solución salina fisiológica (SSF). *Grupo II:* VEGF. Autotrasplante de 6 anillos traqueales cervicales con inmersión del segmento a trasplantar y aplicación tópica en la zona de suturas de: *Grupo III:* SSF y *Grupo IV:* VEGF.

Resultados. Todos los animales sobrevivieron al procedimiento quirúrgico y 98% sobrevivieron al tiempo de estudio establecido. Macroscópicamente no se observó necrosis del injerto, fístula o dehiscencia de en ninguno de los grupos. La adventicia en 40% (Grupo II) y 10% (Grupo I) se encontró imagen en "reloj de arena" en el sitio de la anastomosis. Morfométricamente en los grupos II, III y IV la estenosis traqueal fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$ ANDEVA, Tukey) en comparación con el grupo I. La histología mostró la presencia de infiltrado linfocitario severo, así como la neoformación de vasos sanguíneos en los grupos II y IV, lo cual fue significativo al compararlo con los grupos I y III ($p < 0.001$ ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS). La expresión del VEGF por inmunohistoquímica, reveló la presencia del VEGF en todos los grupos, sin embargo, la expresión de este en el grupo IV fue significativamente mayor que en los otros 3 grupos de estudio ($p < 0.01$, ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS). Conclusión. La aplicación tópica durante 5 minutos del VEGF en la traquea e injertos traqueales trasplantados, promueve la neoformación de vasos sanguíneos y evita la necrosis de los mismos, sin embargo al parecer estimula la producción de una inflamación crónica, así como la expresión de otros factores de crecimiento que promueven la formación de cicatrices fibróticas que ocluyen la luz traqueal.

Palabras clave. Factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), Traqueoplastia, Autotrasplante traqueal.

I. INTRODUCCIÓN.

La tráquea es un órgano tubular de forma circular que se encuentra sostenida por anillos cartilaginosos en forma de herradura que se conectan por detrás mediante una membrana elástica (1, 2), posee una porción extratorácica y otra intratorácica y su función es llevar el aire inspirado ya sea por la nariz o boca hacia las zonas de intercambio gaseoso.

Las vías respiratorias pueden padecer enfermedades que limitan el flujo respiratorio provocado por la obstrucción intraluminal de la vía respiratoria, engrosamiento de sus paredes o pérdida de la elasticidad de los tejidos intersticiales que es necesaria para conservar la permeabilidad de la vía aérea y el intercambio gaseoso entre el organismo y el medio ambiente.

Las enfermedades traqueales, principalmente las estenosis de origen congénito, traumático, postintubación o neoplásico, requieren de resección siendo el Standard de oro las plastias traqueales con anastomosis termino-terminal, sin embargo esto representa un problema, ya que las resecciones llegan a ser tan grandes que el tejido no es suficiente para su reconstrucción y se tiene que realizar trasplantes traqueales, el cual es el método de reconstrucción para defectos extensos para lograr el óptimo funcionamiento de la vía aérea, sin embargo estos frecuentemente se complican con fibrosis y estenosis pos-quirúrgica lo que ha dificultado la aplicación clínica de esta técnica, ya que la reconstrucción exitosa de la vía aérea depende de lograr un esqueleto rígido, flujo adecuado de aire y preservación del epitelio de la luz traqueal (3-7). También se han utilizado materiales sintéticos como titanio, polietileno, silicón, marlex y teflón, pero ninguno ha tenido el éxito deseado, debido a que permiten el escape de aire, no son lo suficientemente rígidos y se

colapsan, además de que no proporcionan la adecuada movilización de las secreciones (8).

El trasplante traqueal se ha dificultado por tres causas: la preservación, inmunosupresión y revascularización de injerto, esta última porque al llevar a cabo el trasplante se suprime el aporte sanguíneo y dado que la tráquea no posee una circulación sistémica ni local (ya que esta dada por plexos), su proceso de cicatrización se altera (9).

Experimentalmente se ha observado que la máxima extensión traqueal, en humanos, que se puede reseca son 4 a 5 cm sin presentar complicaciones. Sin embargo el trasplante de injertos mayores a 6 cm de largo muestra complicaciones (necrosis, retraso de la cicatrización, estenosis o malacias) por isquemia (10-14), ya que el periodo isquémico de un segmento traqueal transplantado persiste hasta que se ha establecido una adecuada revascularización, lo cual puede ser de 14 a 15 días. Sin embargo se ha observado que un injerto no puede sobrevivir este periodo de tiempo de isquemia provocando daño en el epitelio traqueal, reabsorción del cartílago y necrosis del mismo (7, 15)

Para resolver este problema se han realizado diferentes modelos experimentales como la utilización de colgajos de omento para cubrir los injertos traqueales transplantados (omentopexia), pero no ha funcionado para trasplantes mayores de 6 cm., debido a que solo se revascularizan las líneas de sutura, pero no en la porción media del injerto (14). También se ha evaluado la revascularización directa sin buenos resultados, ya que los vasos anastomosados se obstruyen y el injerto se necrosa (12,17).

Otros estudios mencionan que la adición de factores de crecimiento en la zona de las anastomosis tiene buenos resultados, debido a que estos son potentes promotores de la angiogénesis y su aplicación incrementa la revascularización del injerto (9,18, 19).

El factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) es una glicoproteína secretada por las células endoteliales durante la isquemia, hipoxia o en ambos casos, y éste actúa como un potente inductor de la angiogénesis y promueve la cicatrización del tejido (20-23).

El gen del VEGF está situado en el brazo corto del cromosoma 6, sintetizada por diferentes tipos de células. Su acción es ejercida a través de su unión a receptores tipo tirosin-kinasa, siendo la célula endotelial su principal célula diana. El VEGF se considera como uno de los más potentes reguladores de la angiogénesis, tanto en condiciones normales como patológicas, además es un inductor de la permeabilidad vascular y promotor de la cicatrización tisular. (22, 24-25).

Con base en lo anterior se puede pensar que el adicionar factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) cuando se realiza un autotrasplante traqueal, estimulará la angiogénesis, mejorará la revascularización y cicatrización de la misma.

II. JUSTIFICACIÓN.

Las patologías traqueales secundarias a estenosis, trauma o neoplasias, tienen como indicación la resección de ésta, pero cuando dichas resecciones son muy extensas, se requiere de la colocación de una prótesis o la realización de un trasplante. En los trasplantes de tráquea se han presentado problemas con la revascularización del segmento resecado e injerto trasplantado, lo cual provoca mala cicatrización que la mayoría de las veces complica la ventilación del paciente.

Es por lo que en este estudio, para mejorar la revascularización de un segmento traqueal trasplantado que presenta isquemia e hipoxia, se propone tratar con VEGF a los injertos traqueales a trasplantar, con el fin de inducir la angiogénesis, promover una buena cicatrización del injerto trasplantado y mantener las funciones normales de la traquea.

A la fecha no existen estudios publicados sobre la aplicación tópica de Factor de crecimiento del endotelio vascular en autotrasplantes de anillos traqueales ni en las reanastomosis de traquea.

III. HIPÓTESIS.

El factor de crecimiento de endotelio vascular es un inductor de la angiogénesis, promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos y la cicatrización del tejido durante la isquemia e hipoxia, entonces al aplicar este factor en un injerto traqueal antes de trasplantar, favorecerá la formación de nuevos vasos y la cicatrización del mismo después de ser trasplantado.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo general.

Evaluar la cicatrización, cambios macroscópicos, microscópicos e inmunohistoquímicos producidos por el factor de crecimiento de endotelio vascular al aplicarlo en la traquea de ratas, después de realizar reanastomosis de traquea cervical y autotrasplante de 6 anillos traqueales cervicales.

2. Objetivos específicos.

- Evaluar la cicatrización que produce el factor de crecimiento de endotelio vascular al aplicarlo en la traquea de ratas, después de realizar reanastomosis traqueales cervicales simples y autotrasplante traqueal cervical.

- Valorar los cambios macroscópicos que sufre la traquea después de aplicar factor de crecimiento de endotelio vascular en la traquea de ratas con reanastomosis traqueales cervicales simples y autotrasplante traqueal cervical.

- Evaluar los cambios microscópicos que produce el factor de crecimiento de endotelio vascular al aplicarlo en la traquea de ratas, después de realizar reanastomosis traqueales cervicales simples y autotrasplante traqueal cervical.

- Determinar la expresión del VEGF por inmunohistoquímica, en los sitios de las anastomosis traqueales cicatrizadas, postraqueoplastía cervical simple y postrasplante de 6 anillos traqueales cervicales.

V. MATERIAL Y METODOS.

1. Recursos.

El financiamiento de esta investigación fue otorgado por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER-“ICV”) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (Proyecto REF: F643).

En este estudio participaron los investigadores y técnicos del Departamento de Investigación en Cirugía Experimental, Investigación en Morfología y Departamento de Otorrinolaringología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, que proporcionaron los quirófanos, microscopios e instrumental necesario para la realización de los procedimientos quirúrgicos, tratamientos y seguimiento postoperatorios de los animales, así como los del Departamento de Investigación en Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán”.

Los animales que se utilizaron en este estudio fueron proporcionados por el bioterio del INER-“ICV”.

2. Animales de experimentación.

Se utilizaron 40 ratas Wistar, sanas, sin importar sexo, ni edad con un peso aproximado de 250 gramos, las cuales fueron manejadas de acuerdo a las Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana (26) y a la Guide for the care and Use of Laboratory Animals (27).

2.1 Criterios de inclusión.

Se incluyeron ratas clínicamente sanas, sin antecedentes de ninguna patología ni cirugía de vías respiratorias.

2.2 Criterios de exclusión.

Los animales con datos clínicamente patológicos a su llegada al INER y previos al procedimiento quirúrgico o con antecedentes de alguna cirugía o enfermedad respiratoria se excluyeron del estudio.

2.3 Criterios de eliminación.

Todo animal que presento signos clínicos de cualquier patología que no fue provocada por el procedimiento quirúrgico, fue eliminado.

2.4 Criterios de terminación.

Todo animal con signos de dificultad respiratoria severa o cualquier otra patología que produjo signos evidentes de enfermedad fueron objeto de terminación del estudio.

3. Grupos de Estudio.

Los animales se dividieron en cuatro grupos de estudio:

En dos grupos se secciono la traquea cervical y se realizó reanastomosis simple. En los grupos restantes se llevo a cabo autotrasplante de 6 anillos traqueales cervicales y se trataron de la siguiente forma:

Grupo I (n=10): Sección y reanastomosis traqueal con aplicación tópica de solución salina fisiológica (SSF) en el sitio de la anastomosis.

Grupo II (n=10): Se llevo a cabo sección y reanastomosis con aplicación tópica de VEGF en la zona de las suturas.

Grupo III (n=10): Se realizó autotrasplante de 6 anillos traqueales cervicales con inmersión del segmento a trasplantar en SSF por 5 minutos y aplicación tópica de la misma en la zona de suturas.

Grupo IV (n=10): Autotrasplante de 6 anillos traqueales con inmersión del segmento a trasplantar en VEGF por 5 minutos y aplicación tópica del mismo en la zona de suturas.

4. Anestesia.

Los animales se prepararon con 12 horas de ayuno para sólidos y 12 horas para líquidos. La anestesia en todos los grupos de estudio se realizó utilizando 0.5 mg de sulfato de atropina vía intramuscular y pentobarbital sódico (Anestesal, Pfizer, Estado de México, México) a dosis de 30 mg/kg vía intraperitoneal (28, 29), posterior a esto cada animal fue colocado sobre la

mesa de cirugía en posición decúbito dorsal y se continuo con el procedimiento quirúrgico.

5. Técnica quirúrgica.

Las técnicas quirúrgicas tanto de traqueoplastía como la de trasplante se realizaron con técnicas de microcirugía con microscopio (OPMI 19-FC Carl Zeiss, Faserbeleuchtung, West Germany)

5.1 Traqueoplastía cervical

Se realizó una incisión media en la región anterior del cuello, se diseco el tejido celular subcutáneo y platisma hasta llegar a los músculos infrahioideos (esternohioideo y esternotirohioideo) los cuales se separaron en la línea alba hasta llegar a la tráquea, la cual se diseco en toda su circunferencia, se secciono a nivel de tercer anillo, se reseco un anillo traqueal (que se utilizó como anillo control para el estudio histológico) y se aplico en los extremos proximal y distal de la traquea seccionada de forma tópica 1 ml de SSF (solución de cloruro de sodio al 0.9% Pisa, Guadalajara, México) en los animales del grupo I, mientras que en los del grupo II se aplicaron 5µg/ml de VEGF (Human VEGF standard part 890220, RD Systems, Minneapolis, USA) (contenidos en 1 ml de SSF) (dosis utilizada en otros estudios de cicatrización traqueal en conejos) (20) y finalmente se realizó anastomosis término terminal con material no absorbible de 7 ceros (Prolene, Ethicon, New Jersey, USA) con súrgete continuo. Terminada la traqueoplastía se cerró por planos sin dejar drenaje. (Figura 1)

5.2 Autotrasplante.

La vía de acceso se llevo a cabo de la misma forma que en los animales de traqueoplastia, solo que en estos animales se seccionaron 6 anillos traqueales

(3° a 9° anillo traqueal) que fue el injerto a autotrasplantar , los cuales se sumergieron durante 5 minutos en SSF (en el grupo III), mientras que en el grupo IV se sumergieron en 1 ml de SSF que contenía 5µg/ml del VEGF, acto seguido se procedió a la aplicación tópica de cada solución respectivamente en la traquea y se continuo con las anastomosis utilizando material no absorbible de 7 ceros (Prolene, Ethicon, New Jersey, USA) con súrgete continuo, finalmente se realizó el cierre convencional. Figura 2.

Al finalizar el procedimiento quirúrgico se procedió a realizar intubación orotraqueal de todas las ratas operadas para evitar que las secreciones traqueales producidas después del procedimiento, obstruyeran la luz de la misma y se esperó a que todos los animales se recuperaran de la anestesia, se extubaron y se les aplicó flunixin meglumina IM (Finadyne Schering Plough, USA) a dosis de 2 mg/kg (esto se llevo a cabo durante 7 días). Finalmente se colocaron en sus cajas de recuperación (se colocaron 4 ratas por caja para duplicarle su espacio vital mínimo) hasta finalizar el estudio (26-29).

Aquellos animales que durante el transcurso del estudio mostraron dolor intenso o crónico incapaz de ser manejado médicamente o signos clínicos como consecuencia del procedimiento quirúrgico que pusieron en riesgo su vida, fueron sometido a eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sodico (Anestosal, Pfizer, Estado de México, México) (26,27).

6. Evaluación.

Los animales fueron evaluados durante 4 semanas después de realizada la cirugía y la aplicación del tratamiento. A todas las ratas se les realizó

evaluación clínica diaria durante la primera semana postquirúrgica y cada tercer día el tiempo restante del estudio.

6.1 Clínica

La evaluación clínica consistió en realizar observación de cada animal dentro de su caja y se evaluó la presencia de sangrado de la herida quirúrgica, inflamación, infección, dehiscencia de la herida quirúrgica. Además se prestó atención en observar si las ratas presentaron enfisema subcutáneo de cuello que nos indicara mala cicatrización de las anastomosis o autoinjertos, así como la presencia de disnea por obstrucción o mala cicatrización (dehiscencia o rechazo de los mismos)

6.2 Macroscópica.

Concluidas las 4 semanas poscirugía todos los animales se sometieron a eutanasia con sobredosis anestésica (Anestesal, Pfizer, Estado de México, México) (24, 25) y a todas las ratas operadas se les evaluó mediante observación directa con el microscopio la integración y cicatrización intraluminal y extraluminal de las anastomosis traqueales, la presencia de estenosis, dehiscencia o rechazo, así como la formación de fístulas.

Para evaluar el estado de la cicatriz formada en la luz traqueal, se retiró el segmento anastomosado y se observó la mucosa del mismo.

6.3 Análisis morfométrico de la luz traqueal (Grado de Estenosis traqueal)

Para evaluar el grado de estenosis, una vez que las traqueas fueron extraídas y fijadas en formaldehído por 24 horas, estas fueron colocadas sobre una regla milimétrica y con un programa con software IMAGE (Pro plus 4.0, USA) se trazo todo el borde de la luz traqueal de los anillos controles (proximal y distal a

las anastomosis), de la anastomosis traqueal tanto en los animales sometidos a traqueoplastía como en los autotrasplantados), así como los de la porción media del injerto autotrasplantado para obtener el área de la luz traqueal en mm^2 . Posterior a esto se obtuvo el porcentaje de luz traqueal (anastomosis en traqueoplastia y anastomosis proximal, distal y anillo intermedio) que presento cada animal al final del estudio en relación a sus anillos controles (anillo proximal y distal). Figura 3

Estos porcentaje se evaluaron de acuerdo a una escala modificada de la de Cotton(30) y la propuesta por Freitag y col.(31): Grado 1 = 0 – 25 % estenosis, 2 = 26 – 50 %. 3 = 51 - 75 y grado 4 = 76 – Luz no detectable.

6.4 Microscópica

Para la evaluación microscópica, se tomaron muestras de las anastomosis en los grupos I y II y de todo el injerto traqueal en los grupos III y IV, los cuales se fijaron en formaldehído al 10% por 24 horas. Posteriormente se incluyeron en parafina, se les realizaron cortes de 4_M , se tiñeron con hematoxilina-eosina, así como con tricrómica de Massón y se les evaluó la presencia de vasos de neoformación, inflamación, necrosis, formación de tejido de granulación, cambios epiteliales, además de la formación de fibras de colágena (para valorar la cicatrización).

6.5 Evaluación angiogénica (Cuantificación in situ del VEGF por inmunohistoquímica).

La evaluación angiogénica consistió en determinar la expresión del VEGF por inmunohistoquímica, en los sitios de las anastomosis traqueales cicatrizadas,

postraqueoplastía cervical simple y postrasplante de 6 anillos traqueales cervicales.

Para determinar la expresión del VEGF producido por los vasos de neoformación se utilizó el sistema streptavidina-biotina-peroxidasa, tinción con aminoetilcarbazol y contratinción con hematoxilina.

En los bloques de parafina de las muestras de las anastomosis traqueales (que fueron preparadas para el estudio microscópico), se les realizaron cortes de 1-3 micras, los cuales fueron montados en laminillas silanizadas, las muestras se desparafinaron en una estufa por 20 minutos a 80°C, se rehidrataron y clarificaron en xilol y alcohol. Posteriormente dichas laminillas fueron colocadas en un buffer de citratos pH:6 para recuperar el antígeno, mediante un baño María a 80°C durante 20 minutos, transcurrido este tiempo, las laminillas se enfriaron y se sometieron a un primer lavado con TBST durante 3 -5 minutos. Acto seguido la peroxidasa endógena fue removida y se colocó el primer anticuerpo en las laminillas (anti-VEGF 20µg/ml antibody R&D systems catalog number:AF564), inmediatamente después fueron incubadas por 24 horas a 4°C. Concluido esto se les aplicó el segundo anticuerpo biotililado durante 10 minutos a temperatura ambiente. El paso siguiente fue lavar las laminillas con TBST por un lapso de 3 - 5 minutos, se incubaron con el conjugado streptavidina/peroxidasa 15 minutos, fueron lavadas e inmediatamente se le añadió el cromógeno revelador amino-etil-carbazole, se incubaron de 1 - 5 minutos dependiendo de la intensidad de la marca. Finalmente las laminillas se trataron con hematoxilina para virar el color del tejido y fueron montadas en un medio acuoso para hacer aparente el VEGF. La presencia de un tono café rojizo en la submucosa traqueal, alrededor de los vasos sanguíneos y en las

células endoteliales denota una expresión positiva del VEGF. Si no existe expresión del VEGF el tejido se observa de color azul, igual al que se observa en el control negativo del ensayo (laminilla que se incluye en el ensayo para determinar VEGF por inmunohistoquímica a la que no se le incorpora el anticuerpo anti-VEGF).

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

El análisis estadístico del grado de estenosis, presencia de vasos de neoformación, células inflamatorias, hipertrofia epitelial, fibrosis y cuantificación in situ del VEGF en las anastomosis se realizó mediante las pruebas de ANDEVA, TUKEY y KRUSKAL WALLIS. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

VI. RESULTADOS.

1. Hallazgos clínicos.

Todos los animales sobrevivieron al procedimiento quirúrgico y al tiempo de estudio establecido, con una evolución clínica satisfactoria, a excepción de 2 animales del grupo II (20%) que tuvieron que ser sometidos a eutanasia al día 21 poscirugía por mostrar datos de dificultad respiratoria caracterizado por disnea severa.

En ningún animal se observó sangrado activo por herida quirúrgica, dehiscencia ni enfisema subcutáneo de cuello. Durante la primera semana se observó inflamación leve en el sitio de la herida quirúrgica la cual desapareció entre el día 8 – 10 y en este lapso, la herida quirúrgica se encontraba adecuadamente cicatrizada en todos los grupos.

2. Hallazgos macroscópicos.

Al concluir sus cuatro semanas de estudio, la evaluación macroscópica de los animales del grupo I (Traqueoplastia con aplicación de SSF) en ningún caso se observó necrosis, formación de fístulas, ni dehiscencia de la sutura. En la adventicia traqueal observó presencia de tejido fibroso de consistencia laxa en cantidad moderada y con adecuada cicatrización en el sitio de la anastomosis (Figura 4A) La mucosa se apreció bien cicatrizada, sin lesiones ni secreciones en luz traqueal (Figura 4B, 4C).

En el Grupo II (Traqueoplastia con aplicación de VEGF) tampoco en ningún caso se observó necrosis, formación de fístulas, ni dehiscencia de la sutura. En todos los animales se observó con moderada cantidad de tejido fibroso de consistencia laxa alrededor de la traquea. En el 40 % (4 animales) se observó

traquea con imagen en “Reloj de arena” en sitio de anastomosis. En 60 % (6 animales) adventicia con adecuada cicatrización (Figura 4D). La mucosa traqueal mostró adecuada cicatrización, sin lesiones. En 1 rata se encontró moderada cantidad de secreción hialina, en los otros animales luz traqueal sin secreciones. (Figura 4E, 4F)

En el grupo III (Autotransplante con aplicación de solución salina fisiológica al 0.9%) se observó en 1 animal presencia de absceso superficial a plano muscular de 1 cm de diámetro aproximadamente, encapsulado, con contenido verde purulento, fétido. En todos los animales se observó moderada cantidad de tejido fibroso laxo. Adventicia con adecuada cicatrización en anastomosis proximal y distal.(Figura 5A) En ningún animal se observó necrosis, fístulas, ni dehiscencia y la mucosa traqueal se encontró bien cicatrizada (Figura 5B, 5C).

En el grupo IV (Autotransplante con aplicación de VEGF), dos animales presentaron absceso superficial a plano muscular, encapsulado, con material purulento amarillo. Un animal presento imagen en reloj de arena del injerto. (Figura 5D) Los otros animales (90%) mostraron la adventicia con adecuada cicatrización. En todos los animales se observo presencia de moderada cantidad de tejido fibroso laxo. Ninguno mostró fístula, necrosis o dehiscencia. Mucosa de traquea con adecuada cicatrización (Figura 5E, 5F)

3. Hallazgos morfométricos de la luz traqueal (Grado de la estenosis).

Con respecto a la evaluación morfométrica se observó que en el 100% de las anastomosis de todos los grupos de estudio, la luz traqueal disminuyó significativamente ($p < 0.01$ Andeva, Tukey) después de procedimiento quirúrgico en comparación con sus anillos controles (Figura 4C,4F,5C,5F). Al comparar dentro de cada grupo no hubo diferencia significativa ($p = \text{NS}$ Andeva, Tukey).

También al comparar entre grupos se pudo observar que el grupo II (Traqueoplastia con VEGF), así como las anastomosis proximales y distales de los grupos III (Autotrasplante con SSF) y IV (Autotrasplante con VEGF), mostraron una estenosis traqueal estadísticamente significativa ($p < 0.05$ Andeva, Tukey) en comparación con el grupo I (Traqueoplastia con SSF) y las porciones medias de los injertos trasplantados ($p < 0.05$ Andeva, Tukey) (Cuadro 1) (Gráfica 1)

4. Hallazgos microscópicos.

En la evaluación histológica de las anastomosis en los animales del grupo I (Traqueoplastia con aplicación de solución fisiológica), en el 40% de los casos (4 ratas) mostraron el epitelio conservado, 5 animales (50%) lo presentaron adelgazado y con cilios aplanados, mientras que la rata restante (10%) desarrollo hiperplasia epitelial con presencia de neutrófilos. Todas las muestras de las ratas operadas (100%) de este grupo, presentaron leve infiltrado inflamatorio linfocitario en la lámina propia. También en el 100% de estos animales se observó adecuada cicatrización de la anastomosis traqueal caracterizada por la leve formación de delgadas fibras de colágena organizadas en forma unidireccional. En este grupo no se observó aumento en

la cantidad de vasos en comparación con los anillos controles y los otros grupos de estudio. (Figura 6D, 6E, 6F).

En el grupo II (Traqueoplastia con aplicación de VEGF), en 9 ratas (90%) se observó el epitelio adelgazado y cilios aplanados. En 1 rata (10%) el epitelio se encontró adelgazado y en algunas zonas solo se observaban restos de la membrana basal. En el 100% de los animales la lámina propia presentó infiltrado inflamatorio severo a base de linfocitos, que produjo una importante separación entre epitelio y pericondrio en comparación con la histología de los anillos controles (Figura 6F). En 2 animales (20%) se observó presencia de células gigantes a cuerpo extraño alrededor de las suturas (Figura 6H). Todas desarrollaron buena cicatrización, de las cuales 6 (60%) de las anastomosis traqueales mostraron leve formación de delgadas fibras de colágena organizadas en forma unidireccional. Sin embargo 4 ratas (40%) desarrollaron mayor cantidad de fibras de colágena que se observaron completamente desorganizadas (fibrosis moderada) (Figura 6I). En 5 animales (50%) se apreció mayor cantidad de vasos sanguíneos en la lamina propia en relación a los anillos controles y a los animales del grupo I. Un animal de experimentación (10%) desarrollo calcificaciones en la lámina propia (Figura 6G).

En el grupo III (Autotransplante con SSF), el 40% de las ratas (4) mostraron el epitelio normal (epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado con presencia de células caliciformes y cilios conservados). En 5 animales (50%) de este grupo el epitelio se encontró adelgazado con los cilios aplanados. La rata restante (10%) no tenía epitelio. La lámina propia en todos los animales (100%) mostró infiltrado inflamatorio a base de linfocitos, solo que en 5 (50%) este fue leve, en 4 (40%) moderado y en un animal (10%) severo. Solo 1 animal (10%) presentó

células gigantes a cuerpo extraño alrededor de las suturas. En todos los casos la cicatriz de las anastomosis (100%) se desarrollaron delgadas fibras de colágena bien organizadas en cantidad moderada en el sitio de las anastomosis. En este grupo tampoco se observaron aumento en el número de vasos en comparación con los anillos controles y los otros grupos de estudio. (Figura 7A,7B,7C)

En el grupo IV (Autotransplante con VEGF), en 8 ratas (80%) se encontró el epitelio adelgazado con los cilios aplanados, 10% (1 rata) mostró el epitelio hiperplásico (Figura 7F) y la otra rata (10%) el epitelio en algunas zonas estaba ausente y en otras adelgazado pero con cilios. Tres animales (30%) presentaron neutrófilos en el epitelio. En todos los animales (100%) se encontró lámina propia con infiltrado inflamatorio linfocitario severo y aumento importante del espacio entre epitelio y pericondrio, secundario al infiltrado inflamatorio (Figura 7F). En 2 animales (20%) se observó presencia de células gigantes a cuerpo extraño alrededor de las suturas (Figura 7G). Un animal (10%) desarrolló granuloma en lámina propia. La cicatriz formada en 8 casos (80%) se caracterizó por el leve desarrollo de delgadas fibras de colágena bien organizadas. Mientras que en los otros 2 animales (20%) se observó fibrosis severa (fibras gruesas y desorganizadas) en el sitio de las anastomosis. En 7 animales (70%) se observó aumento en el número de vasos en relación a los anillos controles y los otros grupos de estudio. Un animal (10%) de este grupo, también desarrollo calcificaciones en lámina propia. (Figura 7I).

Al comparar los hallazgos histológicos dentro de cada grupo y entre grupos, la arquitectura del epitelio, presencia de neutrófilos, células gigantes a cuerpo extraño, fibrosis y calcificaciones no fueron significativas ($p=NS$ ANDEVA,

TUKEY, KRUSKAL WALLIS). Sin embargo la presencia de infiltrado linfocitario severo, así como la neoformación de vasos sanguíneos en los grupos II y IV, mostró una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los grupos I y II ($p < 0.001$ ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS) (Cuadro 2).

5. Evaluación angiogénica.

Al determinar la expresión del VEGF por inmunohistoquímica, tanto en los anillos controles (proximal y distal), sitios de anastomosis y porción media del injerto en los grupos de trasplante, se observó la manifestación de VEGF en todos los grupos, sin embargo, la expresión de este en el grupo IV fue significativamente mayor que en los otros 3 grupos de estudio ($p < 0.01$, ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS) (Cuadros 3 y 4). (Figura 8)

VII. DISCUSION.

Las lesiones traqueales en humanos con una extensión menores a 6 cm de longitud tienen como indicación de tratamiento la resección del segmento afectado y anastomosis termino-terminal (Traqueoplastía) del mismo, lo cual generalmente tiene buenos resultados, siempre y cuando la anastomosis no se encuentre a tensión y mantenga una adecuada vascularización (32).

Sin embargo la reparación de defectos traqueales mayores a 6 cm. es un problema que no se ha podido resolver a pesar del uso de múltiples técnicas quirúrgicas que se vienen desarrollando desde el siglo pasado, ya que se complican con fibrosis y estenosis pos-quirúrgica, por lo que se tiene que realizar nuevamente el procedimiento quirúrgico, pero desafortunadamente en

ocasiones el tejido traqueal restante ya no es suficiente y se tiene que recurrir a la realización de un trasplante (4-8, 31, 33)

La realización de trasplante traqueal es la técnica quirúrgica ideal para la reparación de lesiones traqueales extensas, sin embargo no se tiene el éxito deseado, porque la mayoría de las veces el injerto se necrosa y/o estenosa por alteraciones derivadas de la isquemia, debido a que la traquea no tiene una circulación sistémica, ni local, ya que su aporte sanguíneo esta dado por plexos (11)

La revascularización del injerto traqueal se inicia en el sitio de la anastomosis y se disemina de forma centripeta siendo la pared traqueal anterior la más sensible a daño isquémico por encontrarse distal a las arterias intercartilaginosas transversas anteriores (15,33). Se ha propuesto varias técnicas quirúrgicas para mejorar la revascularización de los injertos (omentopexia, pedículos vasculares, musculares) con poco éxito (7, 15)

Se han realizado estudios en los que se ha identificado que los factores de crecimiento modulan la reparación tisular ya que promueven la proliferación celular y la quimiotaxis de células inflamatorias (23, 34). Entre estos factores de crecimiento, se ha visto que el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) tiene un papel importante en la angiogénesis (promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes) y el aumento de la permeabilidad vascular en situaciones de isquemia para disminuir el daño tisular (35,36).

En este estudio se realizó la aplicación tópica de VEGF en autotrasplantes de 6 anillos traqueales con el propósito de incrementar el proceso natural de

formación de vasos sanguíneos colaterales en los sitios de las anastomosis, para evitar las complicaciones secundarias a la isquemia del injerto.

La evolución clínica fue similar en todos los grupos, debido a que si se presentó cicatrización del injerto traqueal y de las traqueoplastías; solo dos animales del grupo II tuvieron que ser sometidos a eutanasia el día 21 por disnea severa provocada por una disminución importante de la luz traqueal. Estos hallazgos no coinciden con los de otros autores que han trabajado con la aplicación tópica de factores de crecimiento en reparaciones traqueales (9, 20)

Los hallazgos macroscópicos mostraron una adecuada cicatrización de la adventicia en los grupos en los que aplicó SSF, pero en 4 animales del grupo II y 1 animal del grupo IV, el sitio de las anastomosis sufrió contracción de los bordes de la traquea (*imagen en reloj de arena*), lo que es ocasionado por la presencia de estenosis fibrosas, que coincide con los hallazgos descritos por otros autores (5, 9, 33).

La disminución severa de la luz traqueal, observada mediante el estudio morfométrico en los grupos a los que se aplicó el VEGF, pudo ser ocasionada porque la cantidad del VEGF que se queda en el tejido traqueal provoca una expresión prolongada del mismo, lo cual produce una estimulación excesiva de la angiogenesis, hiperpermeabilidad vascular y mala cicatrización. Los hallazgos observados en este estudio coinciden con los descritos por Pokharel (37) y Wallner (23, 34) quienes evaluaron la presencia de factores de crecimiento en estenosis laringotraqueales. Sin embargo los resultados encontrados durante la realización de esta investigación, son diferentes a los relatados por Dodge y colaboradores (20), quienes llevaron a cabo un estudio en conejos, en los que aplicaron tópicamente el VEGF en un segmento elíptico

de la pared anterior de 6 anillos traqueales y no a toda la circunferencia de los anillos traqueales y por eso se puede pensar que no observaron estenosis.

Por otro lado también se puede inferir que esa disminución de la luz traqueal fue provocada porque el aumento de la permeabilidad vascular mediado por el VEGF, promueve la liberación de células inflamatorias y otros factores de crecimiento al sitio de daño (38).

Histológicamente, a diferencia de lo descrito por otros autores (20), en nuestro estudio las anastomosis de los grupos a los que se les aplicó el VEGF presentaron aumento marcado en la vascularidad así como un infiltrado inflamatorio crónico severo. Esta marcada inflamación es posiblemente desencadenada por dos mecanismos: 1) El VEGF produce una sobrerregulación de varias moléculas de adhesión celular del endotelio (E selectina, ICAM-1 y VCAM) y quimioatracción de monocitos y macrófagos contribuyendo al infiltrado leucocitario. 2) Aumento de la permeabilidad de vasos linfáticos (que en condiciones fisiológicas se encuentran colapsados) que incrementan la capacidad de transporte linfático hacia la matriz extracelular y retrasan la resolución del edema y de la inflamación (38, 39).

En el análisis inmunohistoquímico se encontró manifestación del VEGF en todos los grupos de estudio, siendo mas significativo en el grupo IV, lo cual es similar a lo observado en el estudio realizado por Dodge (18) quien realizó la aplicación tópica de VEGF en tráqueas, así con lo descrito por Galiano R quien aplico tópicamente este factor de crecimiento en heridas de pacientes diabéticos (36). Con respecto a la expresión del VEGF en los grupos que se aplico SSF, coinciden con lo descrito por otros autores que mencionan que la producción de éste es normal en el proceso de reparación de cualquier herida,

ya que existe una respuesta angiogénica para facilitar una adecuada cicatrización así como la neoformación de vasos sanguíneos principalmente alrededor de las líneas de sutura. (38,40, 41)

VIII. CONCLUSION

Con base a lo anterior se puede concluir que la aplicación tópica durante 5 minutos del VEGF en la traquea e injertos traqueales trasplantados, promueve la neoformación de vasos sanguíneos y evita la necrosis de los mismos, sin embargo al parecer estimula la inflamación crónica, así como la expresión de otros factores de crecimiento que promueven la formación de cicatrices fibróticas que ocluyen la luz traqueal, por lo que se piensa que se deben realizar otros estudios para determinar la dosis y el tiempo ideal de aplicación del VEGF, así como investigar que factores de crecimiento son liberados por estímulo del VEGF, para identificar cuales de ellos influyeron en la producción de estenosis observada en este estudio.

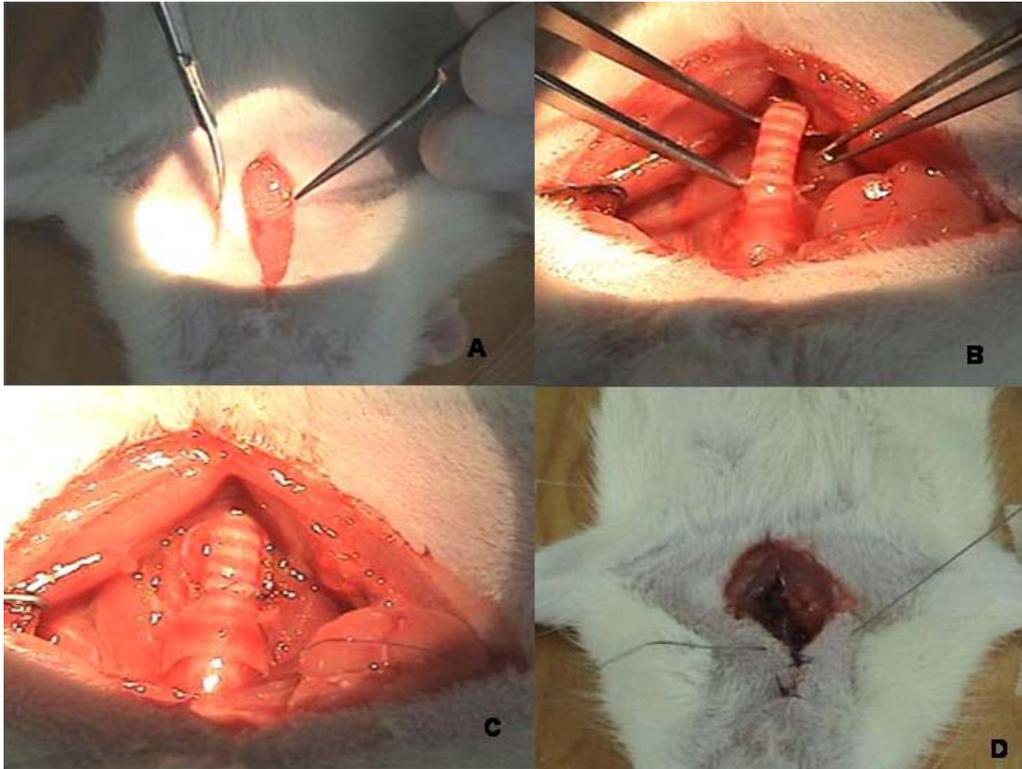


Figura 1 Fotografía de técnica quirúrgica de Traqueoplastias. A. Incisión en piel. B. Disección de traquea cervical. C. Anastomosis termino- terminal. D. Cierre de la incisión

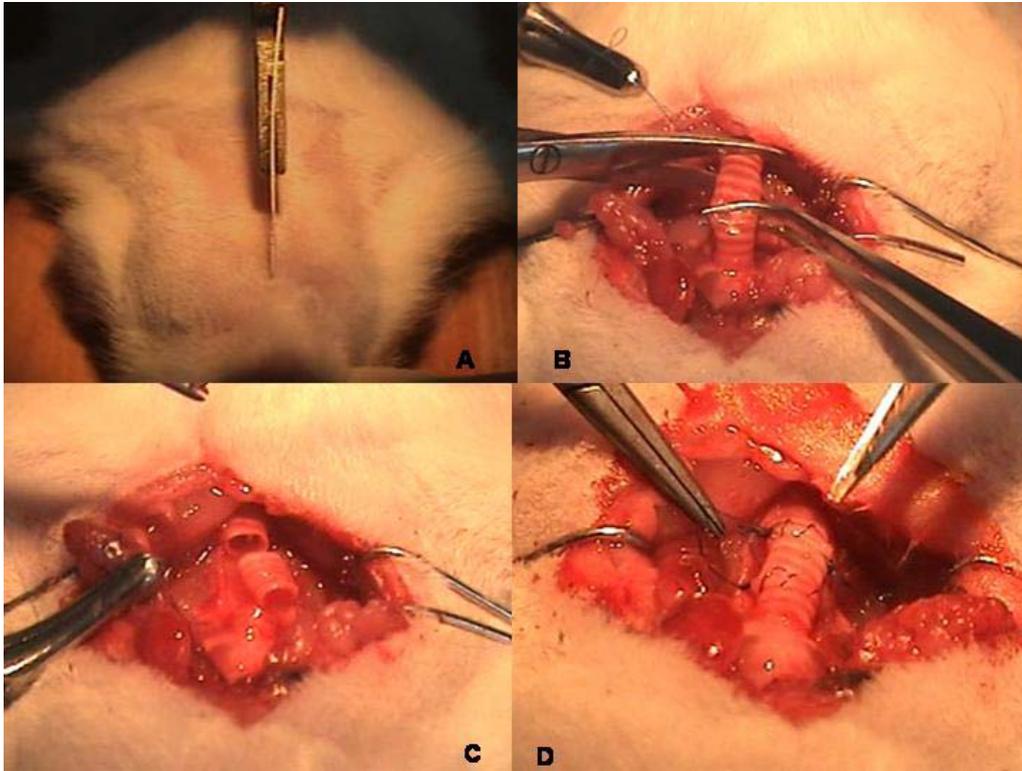


Figura 2. Fotografía de técnica quirúrgica de autotrasplantes traqueales. A. Incisión en piel. B. Disección de traquea cervical. C. Colocación del injerto en posición para iniciar anastomosis. D. Anastomosis distal y proximal

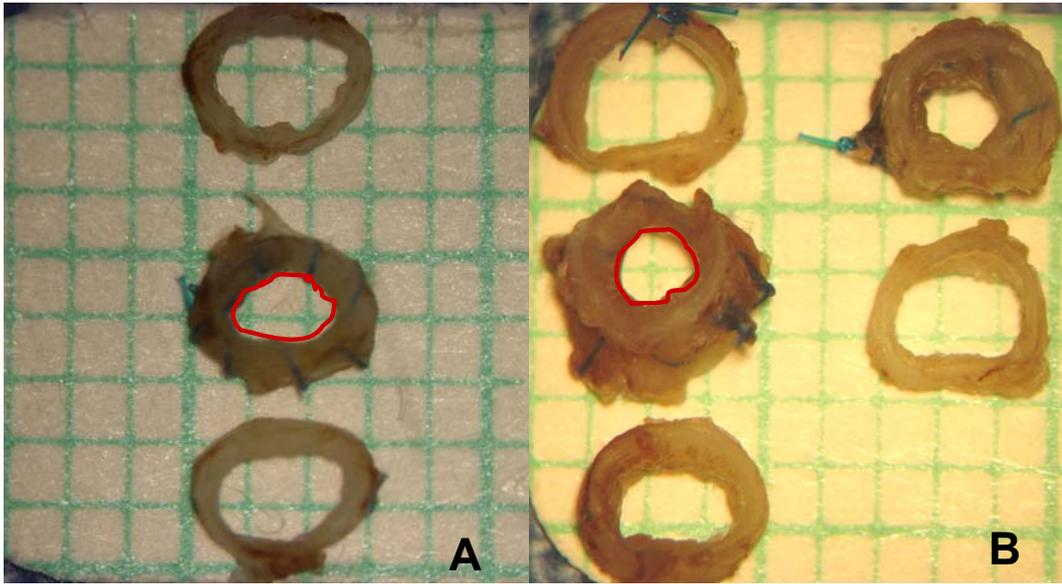


Figura 3. Microfotografía que muestra la forma en la que fue realizada la morfometría en las muestras que se colocaron sobre regla milimétrica. A corresponde a las traqueoplastías. B. Anillos traqueales de autotrasplantes.

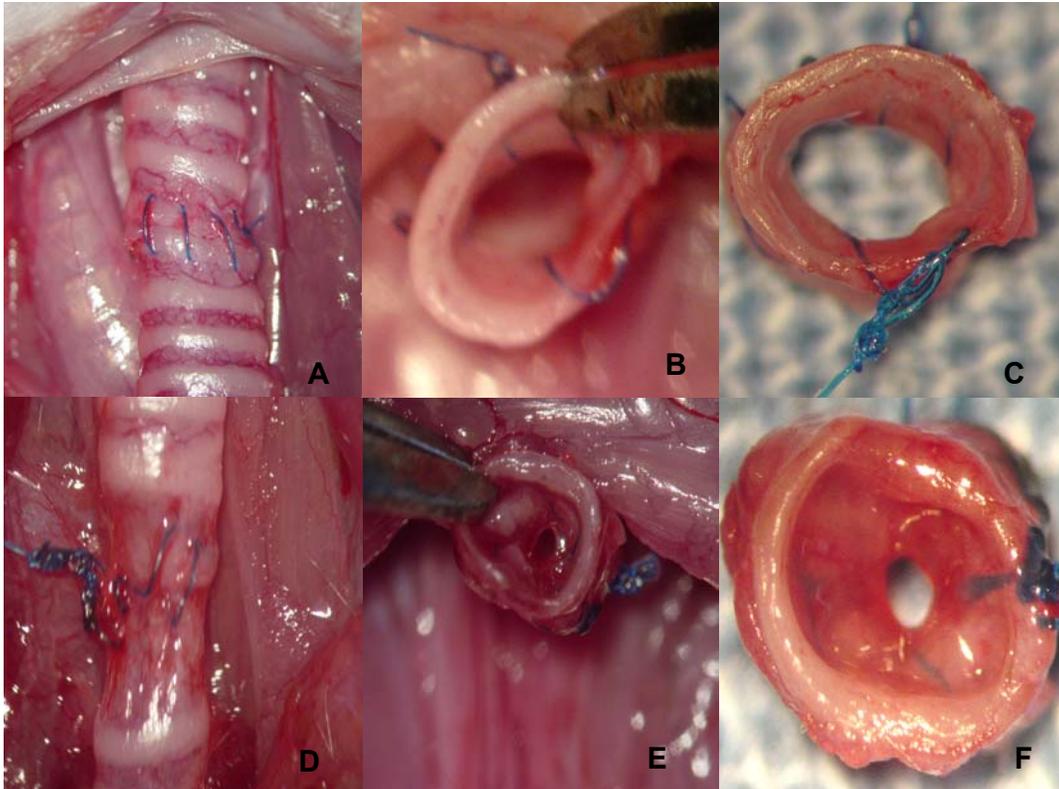


Figura 4. Fotografías tomadas al final del estudio en las que se observa la cicatrización externa y de la luz traqueal en los animales con Traqueoplastía tratada con SSF (A,B,C) y con VEGF (D,E,F).

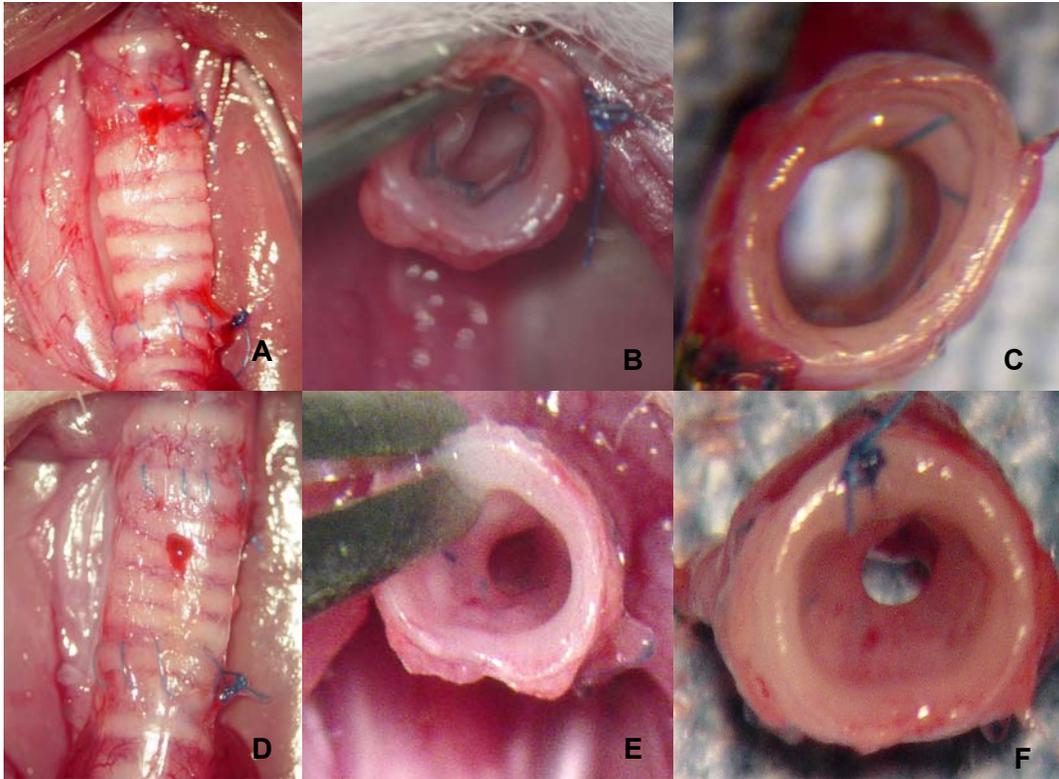


Figura 5. Cicatrización externa y de la luz traqueal en los animales autotrasplantados con SSF (A,B,C) y con VEGF (D,E,F) a los 28 días postcirugía.

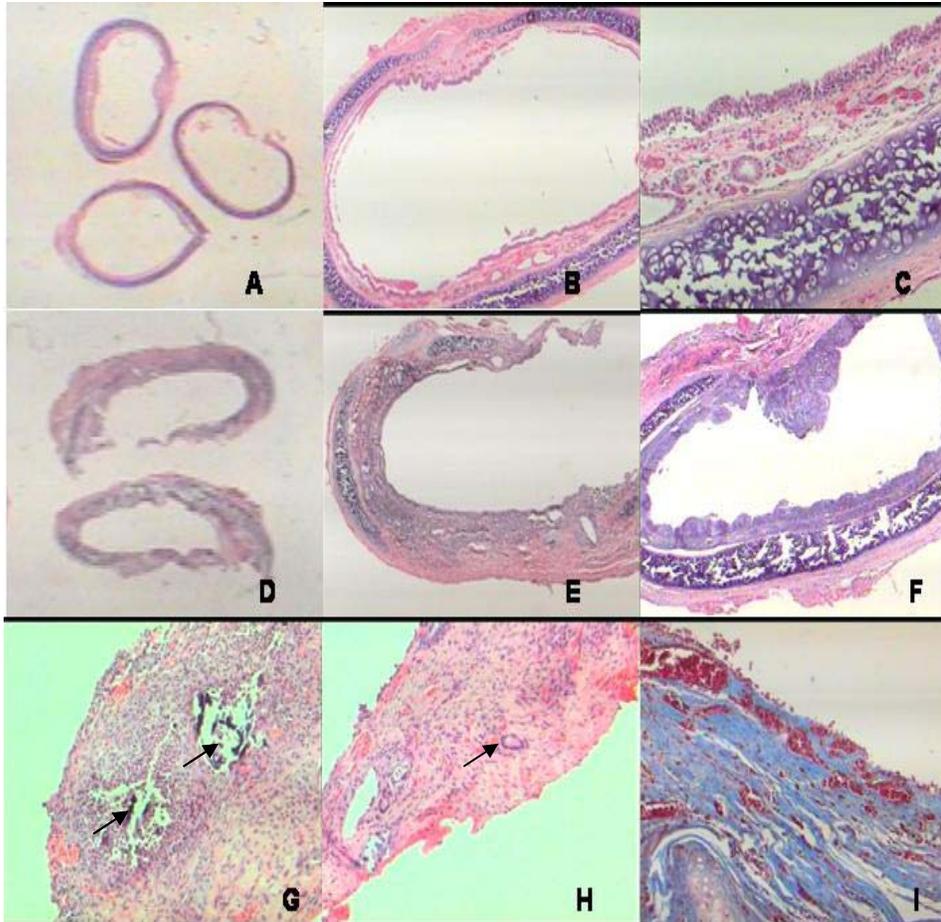


Figura 6. Microfotografía que muestra: Anillos traqueales controles: **A**, Vista panorámica (H-e,4x). **B y C** (H-e 10x) Epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado con células calciformes. Grupo I: **D, E** (H-e, 4x y 10x), epitelio adelgazado, e infiltrado inflamatorio linfocitario leve de lámina propia. Grupo II: **F y G** (H-e 10x) infiltrado inflamatorio severo, disminución de la luz traqueal, aumento de la vasculatura y presencia de calcificaciones (flechas). **H**. (H-e 10x) Infiltrado inflamatorio linfocitario y presencia de célula gigante a cuerpo extraño (flecha). **I**. Fibrosis moderada, fibras de colágena delgadas (Masson 10x).

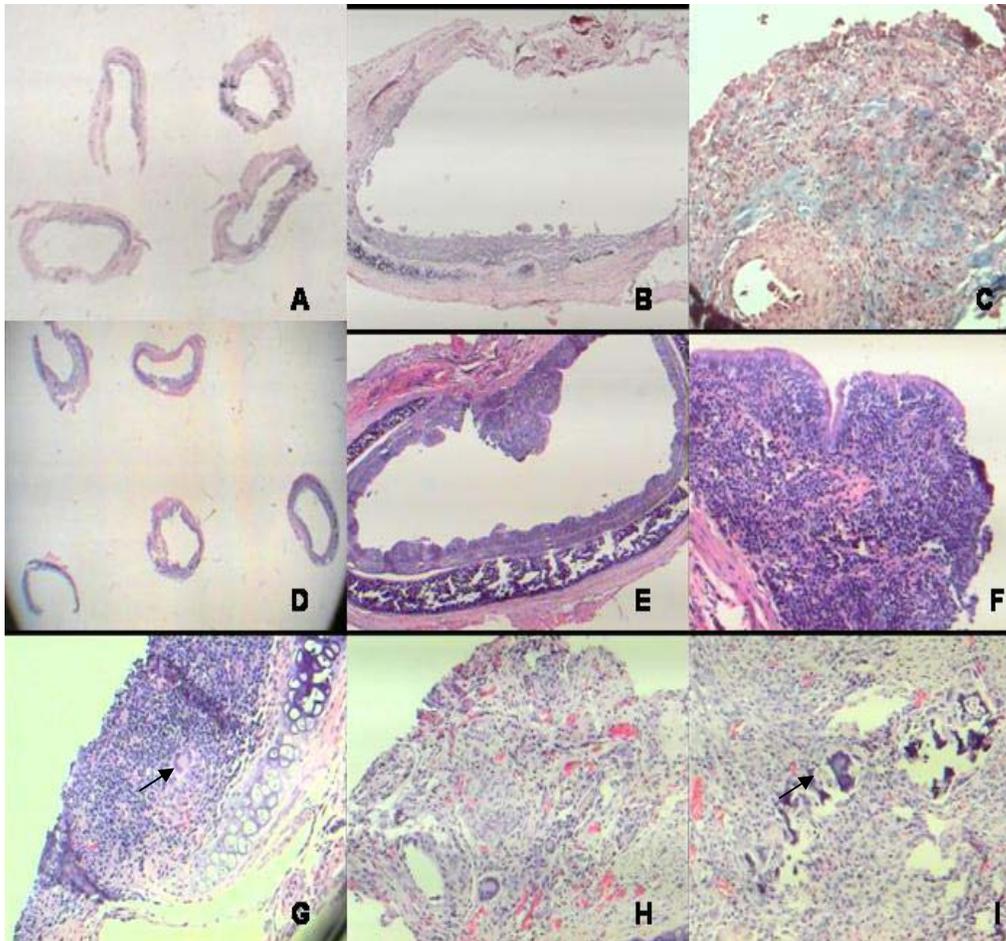


Figura 7 Grupo III (Autotransplante con SSF). **A.** Vista panorámica de anillos traqueales, **B.** Epitelio adelgazado, lamina propia con Infiltrado inflamatorio linfocitario leve (h-e 10x), **C.** fibras de colágeno delgadas y organizadas (Masson 10x). Grupo IV (Autotransplante con VEGF) **D.** Vista panorámica anillos traqueales **E.** Infiltrado inflamatorio severo, aumento del espacio entre epitelio y pericondrio (H-e, 4x). **F.** Epitelio hiperplásico, infiltrado inflamatorio linfocitario severo de lámina propia (H-e 10x). **G.** Infiltrado inflamatorio linfocitario severo, célula gigante a cuerpo extraño, ausencia de epitelio (flecha). **H.** vasos sanguíneos de neoformación (H-e, 10x), **I.** Calcificaciones en la lámina propia (flecha) (H-e, 10x)

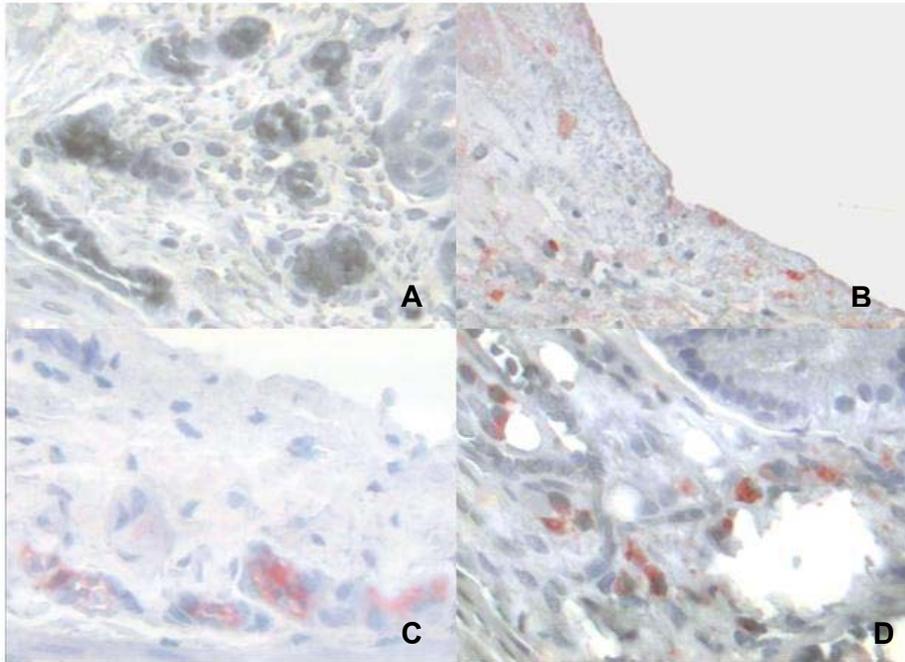


Figura 8. Expresión del VEGF por inmunohistoquímica. A. Grupo I. Submucosa traqueal (40X). Angiogénesis Negativa: Vasos sanguíneos sin expresión de VEGF. B. Grupo II. Submucosa traqueal (10X). Sin expresión de VEGF (Azul), expresión positiva de VEGF (Rojo-Marrón). C. Grupo III. Submucosa traqueal (40X). Angiogénesis Positiva: Vasos sanguíneos con expresión de VEGF. D. Grupo IV, Submucosa traqueal (40X). Angiogénesis Positiva: Vasos sanguíneos con expresión de VEGF.

Evaluación morfométrica								
	Grupo I Traqueo SSF	Grupo II Traqueo VEGF	Grupo III Autotrasplante con SSF			Grupo IV Autotrasplante con VEGF		
Grado de estenosis	Anast.	Anast.	Anast. Prox	Porción media del injerto	Anast. distal	Anast. Prox	Porción media del injerto	Anast. distal
Grado 1 0–25 % estenosis	0	0	0	6	1	1	6	2
Grado 2 26-50 % estenosis	*9	*5	*5	4	*8	4	3	*6
Grado 3 51–75 % estenosis	1	3	*5	0	1	*4	1	2
Grado 4 76–100 % estenosis	0	2	0	0	0	1	0	0

*p<0.05 Andeva, Tukey ± Desviación estándar.

Cuadro 1. Muestra la estenosis traqueal del grupo II, anastomosis proximales y distales de los grupos III y IV en comparación con el grupo I y las porciones medias de los injertos trasplantados.

Hallazgos microscópicos							
Grupo de estudio	Epitelio	Infiltrado Linfocitario	Neutrófilos	Células Gigantes a Cuerpo Extraño	Fibrosis	Vasos de Neoformación	Calcificaciones
Grupo I	4 normal 5 adelgazado 1 hiperplasia	10 leve	1	0	10 leve	0	0
Grupo II	10 adelgazado	* 10 severo	0	2	6 leve 4 moderada	* 5	1
Grupo III	4 normal 5 adelgazado 1 sin epitelio	5 leve 4 moderado 1 severo	0	1	10 leve	0	0
Grupo IV	8 adelgazado 1 hiperplasia 1 sin epitelio	* 10 severo	3	2	8 leve 2 severa	* 7	1

* p < 0.001 ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS ± DESVIACION ESTANDAR

Cuadro 2. Se observa los hallazgos microscópicos observados a los 28 días postcirugía en los cuatro grupos de estudio.

Evaluación inmunohistoquímica de la angiogénesis		
Gpo de estudio	(n) Anillos VEGF (+) / (n) anillos totales	VEGF (-) (n) Anillos VEGF (-) / (n) anillos totales
I Traqueoplastía SSF	4/30	26/30
II Traqueoplastía VEGF	6/30	24/30
III Autotrasplante Traquea SSF	4/50	46/50
IV Autotrasplante Traquea VEGF	*23/50	*27/50

* p< 0.001 ANDEVA, TUKEY ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR.

* p< 0.001 KRUSKAL WALLIS.

Cuadro 3. Se observa el número de anillos que expresaron el factor de crecimiento del endotelio vascular en la submucosa traqueal del total de las muestras en todos los grupos de estudio.

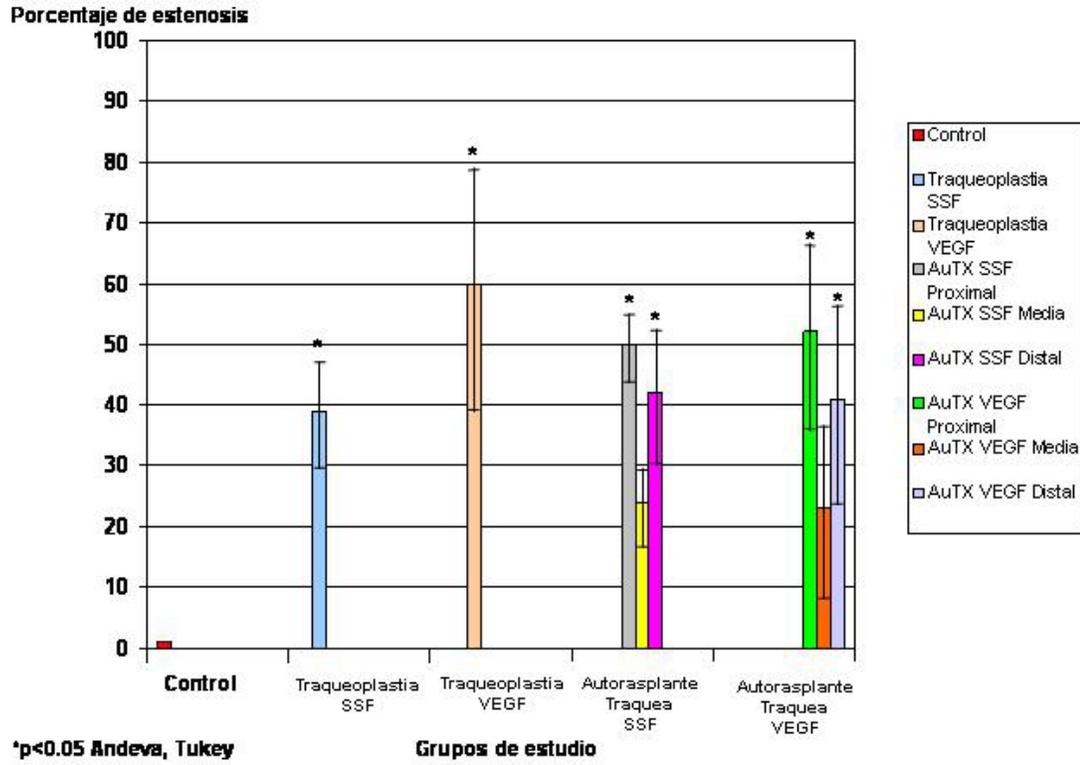
Evaluación inmunohistoquímica de la angiogénesis		
Grupo de estudio	VEGF (+) (%)	VEGF (-) (%)
I Traqueoplastía SSF	13.33	86.66
II Traqueoplastía VEGF	20	80
III Autotrasplante Traquea SSF	8	92
IV Autotrasplante Traquea VEGF	*46	*48

* $p < 0.001$ ANDEVA, TUKEY \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR.

* $p < 0.001$ KRUSKAL WALLIS.

Cuadro 4. Muestra el porcentaje de expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular en la submucosa traqueal por grupo de estudio.

Evaluación morfométrica de la luz traqueal al final del estudio



Gráfica 1. Muestra el grado de estenosis desarrollado a los 28 días postcirugía.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Dellmann H.D. Histología veterinaria. Sistema respiratorio. ed. Acribia S.A. Zaragoza España 1993: 159-176.
2. - Plopper C.G., Mariassy A.T. and Lollini L.O.: Structure as revealed by airway dissection: A comparison of mammalian lungs. Am Rev Respir Dis. 1993; 28: S4.
3. - Soda M.A., Delgado A., Morales J. Manejo quirúrgico de las estenosis traqueales. Gaceta Medica de México. 1994; 130:386-389.
- 4.- Tojo T., Niwaya K., Sawabata N., Nezu K, Kawachi K., Kitamura S. Tracheal allogenic immunoresponse is reduced by cryopreservation canine experiment. Transplant Proc. 1996; 28:1814-1815.
- 5.- Torres T., Santillan P., Salazar M., Villalba J., Olmos R., Lezama M., Morales J. Resección y doble anastomosis traquea (Estudio experimental). Rev Inst Nal Enf Resp (México). 1991; 4:9-14.
- 6.- Tojo, T., Niwaya, K., Sawabata, N., Nezu, K., Kawachi, K and Kitamura, S.: Tracheal allogenic immunoresponse is reduced by cryopreservation canine experiment. Transplant Proc. 1996; 28(3): 1814-1815.
- 7.- Genden E, Gannon P, Smith S, Keck N, Deftereos M, Urken M. Microvascular Transfer of Long Tracheal Autograft Segments in the canine model. Laryngoscope. 2002, 112: 439 – 444
- 8.- Torres T., Santillan P., Sotres A., Gaxiola M., Jasso R., Sullivan J Olmos R., Urrutia C., Villalba J. Criopreservación de tráquea. Estudio experimental. Rev Soc Mex Neum y Cir Tor. 1991; 1:8-14.
- 9.- Olmos-Zúñiga JR, Eguiza-Rubí V, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, Gaxiola-Gaxiola M, Santibáñez-Salgado JA, Baltazares-Lipp M, Santillán-Doherty P y

Villalba-Caloca J. Trasplante experimental de traquea cervical combinado con la aplicación de factor de crecimiento de fibroblastos. Rev Inst Nal Enf Resp Mex, 2006; 19: (3):172-179.

10.- Davies OG, Edmiston JM, Mc Corkle HC. The repair of experimental tracheal defects with fresh and preserved homologus tracheal grafts. J Thorac Surg 1952; 23: 367-376.

11.- Salmeron J, Gannon PJ, Blackwell KE, et al. Tracheal transplantation: superior and inferior thyroid artery perfusion territory. Laryngoscope 1998; 108: 849-853.

12.- Deleare P, Ziyang L, Feenstra L. Tracheal autograft revascularization and transplantation. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1994; 120: 1130-1136.

13.- Rose KG, Sesterhenn K, Wustrow F. Tracheal allotransplantation in man. Lancet. 1979; 1: 433-436.

14.- Deleare P, Ziyang L, Hermans R, Sciort R, Feenstra L. Experimental tracheal allograft revascularization and transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 110: 728-737.

15.- Camara S, Verissimo F, Mamede M, Llorach M. Time necessary for neovascularization of a tracheal segment by the sternohyoid muscle. Otolaryngology Head and Neck Surgery. 2001, 125 (3):201 – 204.

16.- Park YS, Lee DY, Paik HC, Bae KM, Cho SH. The role of omentopexy in tracheal transplantation in dogs. Yonsei Med J. 1996; 37: 118-124.

17.- Lenot B, Macchiarini P, Darteville P. Tracheal transplantation: An experimental technique with revascularisation and venous drainage. Transplant Proc 1995; 27: 1684-1685.

- 18.- Albes J, Klenzer T, Kotzerke J, et al. Improvement of Tracheal Autograft Revascularization by Means of Fibroblast Growth Factor. *Ann Thorac Surg.* 1994; 57: 444-449.
- 19.- Gospodawiccz D., Neufeld G. Scweigerer L. Fibroblast growth factor: structural and biologic properties. *J. Cell Physiol Suppl.* 1987; 5: 15-26.
- 20.- Dodge-khatami A., Backer C., Holinger L., Mavroudis C., Cook K and Crawford S. Healing of a free tracheal autograft is enhanced by topical vascular endothelial growth factor in a rabbit model. *J. Thorac Cardiovasc Surg.* 2001, 122: 554-561.
- 21.- Knox A.J., Corbett L., Stocks J. Holland E., Zhu Y. and Pang L. Human Airway Smooth Muscle Cells Secrete Vascular Endothelial Growth Factor: Up-regulation by Bradykinin Via A Protein Kinase C and Prostanoid-dependent Mechanism. *Faseb Journal.* 2001; 15:2480-88.
- 22.- Koyama S., Sato E., Tsukadaira A., Haniuda M., Humanami H. Kurai M., Nagai S. and Izumi T. Vascular Endothelial Growth Factor mRNA and Protein Expression in Airway Epithelial Cell Lines in Vitro. *Eur Respir J.* 2002; 20: 1449-56.
- 23.- Walner L.D., Heffelfinger S.C., Stern Y., Abrams M.J., Miller M.A. and Cotton R.T. Potential Role of Growth Factors and Extracellular Matrix in Wound Healing After Laryngotracheal Reconstruction. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 200; 122: 363-6.
- 24.- Restucci B, Papparella S, Maiolino P and De Vico G. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 2002, 39: 488-493.

- 25.- Corral C, Siddiqui A, Wu L, Farrel C, Lyons D, Mustoe T. Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblast growth factor during ischemic wound healing. Arch. Surgery 1999;134: 200- 205.
- 26.- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación de los Estados Unidos Mexicanos. AFÍA 6 dic de 1999.
- 27.- 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.
- 28.- Insel P. Analgésicos, antipiréticos y anti-inflamatorios, y fármacos antigotosos. En: Goodman A. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. México, McGraw-Hill; 1996. p 661-705.
- 29.- Academy of Surgical Research. Course of Animal Anesthesia and Models. Memories of the Course of Animal Anesthesia and Models of the 12 th Annual Meeting and 1ST International Conference of the Academy of Surgical Research; October 1996: Muenster, Germany. Academy of Surgical Research, 1996.
- 30.-Cotton RT, Connor DM, Myer CM: Proposed Grading System For Subglottic Stenosis Based On Endotracheal Tube Sizes. Ann Otol Rhinol Laryngol 1994; 108: 319-323.
31. Freitag L, Ernst A, Unger M, Kovitz K, Marquette CH. A proposed classification system of central airway stenosis. European Respiratory Journal 2007;30 (1): 7-12.

- 32.- Lenot B, Macchiarini P, Dulmet E, Weiss M, Darteville P. Tracheal allograft replacement. An unsuccessful method. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1993;7(12):648-52.
- 33.- Grillo H. Development of tracheal surgery: A historical review. Part 1: Techniques of tracheal surgery. *Ann. Thoracic Surgery* 2003; 75:610-9
- 34.- Walner D, Cotton R, Willging P, Bover K and Toriumi D. Model for evaluating the effect of growth factors on the larynx. *Otolaryngology Head and Neck Surgery* 1999; 120: 78 – 83
- 35.- Ozerdem U, Stallcup WB. Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. *Angiogenesis* 2003; 6(3):241-249.
- 36.- Galiano R, Tepper O, Pelo C, Bhatt K et al. Topical Vascular Endothelial Growth Factor Accelerates Diabetic Wound Healing through Increased Angiogenesis and by Mobilizing and Recruiting Bone Marrow-Derived Cells. *American Journal of Pathology*, 2004; 164(6):1935 -47
- 37.- Pokharel R, Maeda K, Yamamoto T, Noguchi K, Iwai Y, Nakamura H, Kazumoto I. Expression of vascular endothelial growth factor in exuberant tracheal granulation tissue in children. *Journal of Pathology* 1998; 188: 82-86
- 38.- Lazaraous D, Shou M, Scheinowitz M, Hodge E, Thirumurtu V et al. Comparative effects of basic Fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the response to injury. *Circulation* 1996; 94 (5): 1074-82
- 39.- Kunstfeld R, Hirakawa S, HonG K, Schacht T et al. Induction of cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions in VEGF-A transgenic mice results in chronic skin inflammation associated with persistent lymphatic hyperplasia. *Blood.* 2004; 104: 1048 - 1057.

40. Nissen N, Polverini P, Koch A, Volin M, Gamelli R, DiPietro A. Vascular Endothelial Growth Factor Mediates Angiogenic Activity during the Proliferative Phase of Wound Healing. *American Journal of Pathology*, 1998; 152 (6):1445-52

41. Sotres A, Villalba J, Jasso V, Olmos R et al. Cryopreserved tracheal grafts: A review of the literature. *J. Invest. Surg.* 2006;19(2):125-135