



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y
PRODUCCIÓN ANIMAL

“Evaluación de la utilidad y funcionalidad de la
reconstrucción de la arteria pulmonar de perros, con
aloinjertos de arteria pulmonar liofilizada y criopreservada”

T E S I S

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Yessica Rosalinda Heras Romero

Tutor principal: MC. J. Raúl Olmos Zúñiga

Comité tutorial: Dr. Rogelio Jasso Victoria

Dra. Sara Caballero Chacón

México D.F., 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.

Este trabajo de investigación se realizó en el departamento de investigación en Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” con financiamiento del mismo departamento, bajo la dirección de M. en C. J. Raúl Olmos-Zúñiga y Dr. Rogelio Jasso-Victoria así como con la participación y asesoría de los investigadores en ciencias médicas: M. en C. Avelina Sotres Vega, Dr. Jaime Villalba-Caloca, Q.F.B. Matilde Baltazares-Lipp, Dr. Miguel Gaxiola-Gaxiola, Dr. Alfredo Santibáñez Salgado y Dr. Patricio Santillán-Doherty.

El programa académico se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, con apoyo de la beca CONACYT. Como parte del programa académico se llevaron asignaturas en Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” y en el Instituto Nacional de Nutrición “Salvador Zubirán”.

CONTENIDO

RESUMEN	I
I INTRODUCCIÓN	1
1 Anatomía y fisiología del Aparato cardiovascular	1
1.1 Circulaciones	2
1.1.1 Circulación mayor	2
1.1.2 Circulación menor	2
1.1.3 Microcirculación	2
1.2 Vasos sanguíneos	3
1.2.1 Arterias	3
1.2.2 Arteria pulmonar	3
2 Patologías de la arteria pulmonar	4
2.1 Neoplasias pulmonares	4
2.2 Aneurismas	4
2.3 Trombosis	5
2.4 Infecciones	5
2.5 Estenosis	5
2.6 Traumatismos	5
3 Tratamiento de las patologías de la arteria pulmonar	5
3.1 Materiales sintéticos	6
3.2 Materiales biológicos	6
4 Técnicas de preservación de órganos y tejidos	6
4.1 Liofilización	6
4.2 Criopreservación	7
II JUSTIFICACIÓN	8
III HIPÓTESIS	8
IV OBJETIVOS	9
1 Objetivo general	9
2 Objetivos específicos	9
V. MATERIAL Y MÉTODOS	10
1 Animales de Experimentación	10
1.1 Criterios de inclusión	10
1.2 Criterios de exclusión	10
1.3 Criterios de eliminación	10
2 Recursos	10
3 Obtención de las arterias pulmonares	11
3.1 Técnica quirúrgica	11
3.2 Procesamiento de la arteria pulmonar	11
3.3 Liofilización de los injertos vasculares arteriales	12
3.4 Criopreservación de los injertos pulmonares	12

4	Grupos de estudio	13
4.1	Anestesia	13
4.2	Técnica quirúrgica receptor	13
4.2.1	Colocación de catéteres	13
4.2.1.1	Catéter pulmonar	14
4.2.1.2	Catéteres sistémicos	14
4.2.2	Colocación del injerto	14
4.3	Colocación del tubo de drenaje endopleural y del sello de agua	15
5	Evaluación	16
5.1	Manejo quirúrgico de los injertos	16
5.2	Cultivos microbiológicos de los injertos	16
5.3	Clínica	17
5.4	Hemodinámica, gasometría y parámetros ventilatorios	17
5.4.1	Parámetros hemodinámicos sistémicos	18
5.4.2	Parámetros hemodinámicos pulmonares	18
5.4.3	Parámetros gasométricos y ventilatorios	18
5.5	Radiológica	18
5.6	Angiográfica	18
5.7	Ecográfica	19
5.8	Macroscópica	19
5.9	Microscópica	19
VI	RESULTADOS	21
1	Manejo quirúrgico	21
2	Cultivos microbiológicos de los injertos	21
3	Hallazgos clínicos	21
4	Hallazgos hemodinámicos, gasometría y parámetros ventilatorios	21
5	Hallazgos radiográficos	23
6 y 7	Hallazgos angiográficos y ecograficos	23
8	Hallazgos macroscópicos	24
9	Hallazgos microscópicos	24
10.	DISCUSIÓN	26
11.	CONCLUSIONES	34
12.	ANEXO I	36
13.	ANEXO II	46
14.	ANEXO III	49
15.	ANEXO IV	50
16.	REFERENCIAS	53

RESUMEN

“EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD Y FUNCIONALIDAD DE LA RECONSTRUCCIÓN DE LA ARTERIA PULMONAR DE PERROS, CON ALOINJERTOS DE ARTERIA PULMONAR CRIOPRESERVADA”.

La liofilización y la criopreservación son técnicas de preservación de tejidos que mantienen la arquitectura morfológica normal de los vasos sanguíneos de alta presión. En este estudio utilizando estas técnicas, se preservaron arterias pulmonares caninas y se utilizaron como aloinjertos de arteria pulmonar (AP) izquierda en 24 perros. El objetivo del trabajo fue evaluar la utilidad, cambios en la función cardiopulmonar, angiográficos, macroscópicos y microscópicos que se producen en la arteria pulmonar de perros, después ser reconstruida con aloinjertos de arteria pulmonar liofilizada o criopreservada.

Material y métodos: En 24 perros se reconstruyó la arteria pulmonar izquierda. Los animales se dividieron en 3 grupos de estudio. Grupo I (n=6): Sección y reanastomosis de la AP izquierda. Grupo II (n=6): Resección de 1 cm de la AP izquierda y reconstrucción con aloinjerto de arteria pulmonar liofilizada (APL). Grupo III (n=6) Resección y reconstrucción de AP izquierda con aloinjerto de arteria pulmonar criopreservada (APC). Donadores (n=6). Los animales se evaluaron clínica, radiológica y ecográficamente. También se evaluaron sus constantes hemodinámicas y gasométricas previo a la cirugía y 4 semanas posteriores a esta. Al finalizar el estudio se llevo a cabo evaluación macroscópica y microscópicamente del estado del injerto y de la anastomosis vascular.

Resultados. Todos los animales sobrevivieron al procedimiento quirúrgico y al tiempo de estudio establecido y no se observó ninguna alteración clínica, radiológica o gasométrica. Angiográficamente 2 animales mostraron obstrucción total del injerto. Hemodinámicamente las presiones sistémicas sistólica y diastólica, las presiones de la AP y la resistencias pulmonares del grupo III se incrementaron y mostraron cambios estadísticamente significativos (ANOVA $p < 0.05$ y Tukey $p < 0.05$) con respecto a los otros grupos de estudio. Microscópicamente en el grupo III existió proliferación de la íntima y de la colágena, así como una moderada inflamación.

Conclusión. La liofilización de la AP es mejor opción de preservación que la criopreservación y puede utilizarse exitosamente como injertos de la AP, obteniéndose adecuada integración y cicatrización.

Palabras clave: arteria pulmonar, criopreservación, liofilización, cirugía experimental.

I.- INTRODUCCIÓN

El aparato cardiovascular (sistema circulatorio) es un circuito; ya que una célula sanguínea viaja desde un punto del sistema y regresa al mismo punto.

El sistema cardiovascular tiene como función principal el transportar sangre en forma continua a través de los vasos sanguíneos, así desempeña tres funciones básicas: 1) suministrar oxígeno (O₂), nutrientes y otras sustancias (mediadores químicos, hormonas y elementos del sistema inmunológico) a todos los tejidos del cuerpo, 2) remoción de bióxido de carbono (CO₂) y bioproductos del metabolismo celular de los mismos¹ y 3) transportar hormonas de una región a otra del organismo, para mantener la presión hidrostática normal en las arterias, capilares y venas. Además de compartir algunos mecanismos homeostáticos tales como: regulación de la temperatura corporal, comunicación humoral a través del cuerpo y ajusta el aporte de oxígeno y nutrientes en diferentes estados fisiológicos.² El funcionamiento del sistema cardiovascular se considera normal cuando sus valores tanto en reposo como durante el ejercicio se encuentran dentro de los parámetros normales. La presión hidrostática de las arterias sistémicas es siempre alta para asegurar un flujo sanguíneo normal en los lechos vasculares de los órganos con una gran resistencia innata al paso de la sangre, como lo son cerebro, corazón y riñones, así como para asegurar la irrigación de órganos situados distales al corazón.³

1.- Anatomía y fisiología del Aparato cardiovascular.

El aparato cardiovascular está formado por: el corazón y el sistema circulatorio. El corazón es una bomba que impulsa la sangre hacia la circulación sistémica y la circulación pulmonar. El sistema circulatorio consiste de una serie de vasos distribuidores (arterias), colectores (venas) y un extenso sistema de finos vasos (arteriolas, capilares y vénulas) que permiten el intercambio entre los tejidos y los canales vasculares.⁴ En condiciones normales la sangre fluye del corazón hacia los diferentes tejidos del cuerpo y regresa a estos 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. Sin embargo existe otro tipo de circulación denominada microcirculación donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes y O₂.^{1,4,5} El sistema circulatorio posee válvulas en diferentes puntos, que permite que el flujo de la sangre se realice en un solo sentido.⁶

1.1.- Circulaciones.

1.1.1.- Circulación mayor.

La circulación mayor o sistémica se inicia cuando el ventrículo izquierdo bombea la sangre ya oxigenada hacia la aorta torácica craneal (ascendente en humanos), arco aórtico, aorta torácica caudal (descendente) y la aorta abdominal. La aorta se ramifica desde el arco aórtico hacia cada región del cuerpo para irrigar a cada una de éstas, posteriormente en cada región se continua ramificando hasta transformarse en arteriolas y después en capilares siendo el sitio donde se realiza el intercambio de oxígeno y nutrientes. Acto seguido la sangre con bióxido de carbono (CO₂) y productos del metabolismo celular pasa a las vénulas que incrementan su tamaño hasta formar las venas de cada órgano, las cuales drenan hacia las venas cavas, las cuales llevan la sangre hasta el atrio derecho (aurícula derecha).

La circulación sistémica es un sistema de alta presión, para contrarrestar las fuerzas gravitacionales y facilitar el paso del flujo sanguíneo a través de los lechos vasculares de gran resistencia y con esto asegurar la irrigación de los órganos situados dístales al corazón.⁷

1.1.2.- Circulación menor.

La circulación pulmonar tiene como fin proporcionar oxígeno del medio ambiente a la sangre no oxigenada proveniente de todos los tejidos del cuerpo. En ésta la sangre procedente de todo el organismo llega al atrio derecho 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, la cual cierra sus válvulas semilunares para evitar el reflujo hacia el ventrículo, ésta se divide en arteria pulmonar derecha e izquierda y a su vez éstas originan una arteria para cada lóbulo pulmonar, que conforme avanzan hacia el interior del lóbulo, se continúan subdividiéndose en arteriolas y a nivel alveolar se transforman en capilares en donde se da el intercambio de gases.^{8,9}

1.1.3.- Microcirculación.

Los capilares pulmonares drenan la sangre oxigenada en las vénulas que progresivamente incrementan su tamaño hasta formar las venas de cada lóbulo pulmonar, que son las encargadas de retornar la sangre al atrio izquierdo del corazón, de donde pasa al ventrículo izquierdo para ser bombeada nuevamente a la circulación mayor.^{1,4,7-9}

El lecho capilar pulmonar ofrece poca resistencia al flujo, por lo que la presión arterial media de la arteria pulmonar es de baja presión (10 mmHg).

El oxígeno es captado durante la inspiración y fluye a través de la tráquea, bronquios y bronquiolos hasta llegar a los alvéolos pulmonares en donde se da el intercambio gaseoso y pasa a la sangre capilar, mientras que el bióxido de carbono (CO₂) presente en los alvéolos se elimina durante la espiración.

El promedio de flujo sanguíneo (ml/min) en los animales sanos, es igual tanto en la circulación pulmonar como en la sistémica. Sin embargo, el volumen de sangre de ambas circulaciones es muy diferente.^{10,11}

1.2.- Vasos sanguíneos.

Existen cuatro tipos de vasos sanguíneos los cuales se dividen en arterias, arteriolas, capilares, y venas. Estos se diferencian entre si por el grosor de las capas que componen su pared y tipo de sangre que transportan.^{2,7}

1.2.1.- Arterias.

Las arterias llevan sangre oxigenada y con nutrientes desde el corazón hacia los distintos órganos y tejidos del cuerpo. Todas las arterias transportan O₂ 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. Este tipo de vasos sanguíneos se encuentran formados por tres capas denominadas túnicas: externa o adventicia, media y la interna o íntima.

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 constituye 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 y su función de ésta es evitar la formación de trombos.

1.2.2.- Arteria pulmonar.

La arteria pulmonar es la arteria funcional de la circulación pulmonar ya que conduce la sangre no oxigenada del corazón derecho a los pulmones. En condiciones normales la arteria pulmonar e origina en la válvula pulmonar y gira dorsal y caudalmente hacia la

izquierda de la raíz aórtica y dorsalmente a la orejuela izquierda. Esta se ramifica en ramas izquierda y derecha caudalmente a la raíz aórtica e inmediatamente antes de llegar al atrio derecho. La rama caudal derecha avanza caudalmente a la raíz de la aorta, a través del extremo superior del atrio derecho, y surge lateralmente al bronquio derecho. La rama caudal izquierda cruza el extremo superior de la orejuela izquierda y surge lateralmente al bronquio izquierdo.^{2,3,6-8}

2.- Patologías de la arteria pulmonar

La arteria pulmonar sufre de diferentes patologías tanto congénitas como adquiridas que afectan el intercambio gaseoso provocando cambios en la oxigenación de los tejidos y en la hemodinamia tanto local como sistémica de los individuos. Dicha arteria puede sufrir cambios en su funcionamiento por la presencia de neoplasias, aneurismas, trombosis, estenosis, infecciones o traumatismos, que tienen que ser reparados mediante la resección y reconstrucción quirúrgica de la misma para restaurar y mantener su función normal.¹²⁻¹⁴

2.1.- Neoplasias pulmonares.

Los tumores primarios de las arterias pulmonares se diagnosticaban con poca frecuencia, ya que el diagnóstico se realizaba post mortem en el 50% de los casos, sin embargo, en la última década se ha observado un incremento en la detección temprana de estas patologías como resultado del avance en las técnicas diagnósticas.^{15,16}

Su localización más frecuente es al nivel del tronco de la arteria pulmonar y de ahí puede extenderse hacia otras arterias de menor calibre e incluso, enviar émbolos a arterias distales pudiendo producir infarto pulmonar, o bien, el desarrollo de nuevas tumoraciones.¹⁷

Las neoplasias más comunes de la arteria pulmonar son los sarcomas como el fibromixosarcoma y sarcoma intimal.¹⁸

2.2.- Aneurismas.

Los aneurismas de la arteria pulmonar son una dilatación patológica en la pared de una arteria, del tronco de dicha arteria o de una o ambas ramas principales. Esta dilatación se produce generalmente en una zona débil de la pared, pero en ocasiones pueden pasar desapercibidos por no mostrar signos clínicos, o confundirse radiológicamente con adenopatías u otro tipo de masas mediastínicas.¹⁹⁻²¹

2.3.- Trombosis.

Las trombosis en la arteria pulmonar se forman por la migración de un émbolo producido en alguna parte del sistema venoso, el cual llega hasta las arterias pulmonares y se fija a la pared arterial.

La mayoría de los émbolos que provocan una trombosis pulmonar en el 90-95% de los casos se originan de trombos venosos profundos que se desprenden (TVP) de las extremidades inferiores.²²

Aunque también los procesos tromboticos y tromboembolicos de la arteria pulmonar, pueden ser ocasionados por procedimientos quirúrgicos, transplantes de corazón y pulmón, así como procesos traumáticos.²³⁻²⁵

2.4.- Infecciones.

Los trastornos infecciosos de la arteria pulmonar comprenden procesos bacterianos, micóticos, parasitarios o virales que pueden dañar o destruir todas las capas de la pared arterial. La infección se produce cuando las bacterias u hongos viajan por el torrente circulatorio (bacteremia) y se alojan en la arteria.²⁶

2.5.- Estenosis.

La arteria pulmonar puede tener problemas estenóticos provocados por diferentes causas entre las que se encuentran neoplasias, presencia de trombos e infecciones que produzcan daño de las paredes de los vasos.²⁷

2.6.- Traumatismos.

Son lesiones producidas por contusiones severas, traumas penetrantes (mordeduras, arma de fuego, etc) o iatrogenias quirúrgicas que ocasionan la pérdida de la continuidad de la arteria pulmonar. El tratamiento de éstas representa una urgencia médica, ya que si no se tratan rápidamente producen una hemorragia que provoca una disminución de la presión pulmonar y deterioro progresivo de la función respiratoria hasta comprometer la vida del paciente.

3.- Tratamiento de las patologías de la arteria pulmonar.

La mayoría de las veces el tratamiento de las afecciones de la arteria pulmonar (aneurisma, neoplasia, trombosis, estenosis, infección o traumatismo), requiere de la resección y reparación quirúrgica, generalmente mediante el uso de un reemplazo del

conducto arterial. Para la reconstrucción de la arteria pulmonar han utilizado injertos sintéticos y biológicos pero ninguno ha demostrado ser el material ideal, debido a que son alogénicos, no tienen capacidad de crecimiento reparación y remodelación, son trombogénicos, se calcifican, estenosan y en ocasiones no tienen las mismas dimensiones del segmento que se va a resecar o no se encuentran disponibles.^{28, 29}

3.1.- Materiales sintéticos.

Con respecto a éstos, el tereftalato de polietileno (dacrón) y el politetrafluoroetileno (goretex) son los más utilizados, sin embargo estos sufren proliferación de la íntima que les produce obstrucción y son más susceptibles de sufrir infecciones, por lo que no han sido considerados como materiales ideales para la reconstrucción de la arteria pulmonar.³⁰⁻³²

3.2.- Materiales biológicos.

Se han utilizado diferentes materiales biológicos preservados con distintos métodos, dentro de estos se encuentran: los tubos de pericardio y yugular de bovino tratado con glutaraldehído, homo y heteroinjertos de arteria pulmonar en fresco y liofilizados, así como arterias umbilicales,^{33,34} pero estos tienen poca durabilidad debido a que se degeneran poco tiempo después de la cirugía y terminan calcificándose,³⁵ requieren de anticoagulantes, además cuando son sometidos a presiones sistémicas, sufren de aneurismas, así como pseudoaneurismas en la línea de suturas y ruptura de los mismos.³⁶⁻³⁸

4.- Técnicas de preservación de órganos y tejidos.

Actualmente con el desarrollo de nuevas técnicas de preservación de órganos, se han investigado el uso de varias técnicas entre las que sobresalen la liofilización y la criopreservación, para encontrar cual de estas permite desarrollar el conducto vascular ideal para la sustitución de segmentos vasculares tanto de alta como de baja presión.

4.1.- Liofilización.

Consiste en desecar un producto previamente congelado, lográndose la sublimación del hielo bajo vacío, es decir de hielo (sólido) a gas (vapor), sin que en ningún momento aparezca el agua en su estado líquido. La sublimación del hielo deja vacíos en la materia sólida, preservando así la integridad de las actividades y estructura biológica y químicas

de dicha materia. Debido a sus cualidades preservantes, la liofilización tiene mucho y variados usos en el laboratorio. Se ha convertido en un medio indispensable en muchas aplicaciones bioquímicas y farmacéuticas. Se usa para lograr la estabilidad en almacenamiento a largo plazo de los materiales biológicos tales como los cultivos microbianos, las enzimas, la sangre y productos farmacéuticos.³⁹

4.2.- Criopreservación.

La criopreservación, es probablemente el método más efectivo para el mantenimiento de los parámetros morfológicos y bioquímicos de diferentes células y tejidos, consiste en colocar el biomaterial dentro de un criovial, sumergido en un medio o solución para su congelación y almacenamiento a bajas temperaturas⁴⁰ ya que los injertos criopreservados tienen la ventaja de mantenerse con pocos cambios estructurales, tienen baja antigenicidad, son antitrombóticos y rara vez se infectan.⁴¹

También se ha observado que este método de preservación, mantiene viables los fibroblastos con lo cual teóricamente estos injertos pueden tener potencial de crecimiento.^{42,43}

Con base a lo anterior y considerando que los injertos vasculares ideales deben de tener una arquitectura y actividad bioquímica igual a la del tejido vascular sano, se puede pensar que la liofilización y criopreservación de arterias pulmonares pueden ser las técnicas de preservación de tejidos, que evitarán la degeneración de las éstas, disminuirán su antigenicidad bloqueando el fenómeno de rechazo y evitarán la formación de trombos cuando sean colocadas como sustituto del conducto arterial pulmonar.

II. JUSTIFICACIÓN.

La reparación quirúrgica de varios defectos de la arteria pulmonar con el fin de mantener el flujo sanguíneo y evitar daños en la función cardiopulmonar, generalmente requiere del reemplazo de ésta con otro conducto. Clínicamente los productos protésicos ya sean biológicos o sintéticos disponibles, no son viables debido a que actúan como materiales alogénicos, tienen poco potencial de crecimiento, reparación y remodelación, además se trombosan y calcifican lo que limita su funcionamiento a largo plazo. Esta demanda clínica ha hecho que muchos investigadores busquen la producción de una prótesis de arteria pulmonar que sea viable y funcional a largo plazo. En años recientes con el desarrollo de nuevas técnicas de preservación de tejidos, se ha observado que la criopreservación es una técnica de preservación que cuando se ha utilizado en vasos de alta presión (aorta, carótida), reduce la antigenicidad del injerto bloqueando el fenómeno de rechazo, evita la formación de trombos y la calcificación de los injertos, por lo que se pensó que el utilizar esta técnica para preservar arterias pulmonares permitirá el funcionamiento ideal de las mismas cuando sean utilizadas como injertos para mantener el flujo cardiopulmonar.

III. HIPOTESIS.

La liofilización y la criopreservación son técnicas de preservación de tejidos que mantienen la arquitectura morfológica normal de los vasos sanguíneos de alta presión después de ser preservadas, así como su funcionalidad posterior a su implantación como injerto, entonces el preservar arterias pulmonares con estas técnicas permitirá obtener una bioprótesis pulmonar con arquitectura morfológica normal que pueda ser utilizada como reemplazo de la misma cuando se realice resección de una arteria pulmonar dañada.

IV. OBJETIVOS.

1.- Objetivo general.

Evaluar la utilidad, cambios en la función cardiopulmonar, angiográficos, macroscópicos y microscópicos que se producen en la arteria pulmonar de perros, después ser reconstruida con aloinjertos de arteria pulmonar liofilizada y criopreservada.

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 criopreservada.

- Evaluar los cambios angiográficos que sufre la arteria pulmonar de perros después de ser reconstruida con aloinjertos de arteria pulmonar liofilizada y criopreservada.

- Valorar los cambios ecográficos que sufre la arteria pulmonar de perros después de ser reconstruida con aloinjertos de arteria pulmonar liofilizada y criopreservada.

- Determinar los cambios macroscópicos que sufre la arteria pulmonar de perros después de ser reconstruida con aloinjertos de arteria pulmonar liofilizada criopreservada.

- Valorar los cambios microscópicos que sufre la arteria pulmonar de perros después de ser reconstruida con aloinjertos de arteria pulmonar liofilizada criopreservada.

- Comparar los resultados entre los tres grupos de estudio.

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 estos animales fueron donadores y dieciocho 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 ⁴⁴ y de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos.⁴⁵

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 realizara 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 presentó 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 proporcionó 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.

Las arterias pulmonares liofilizadas y criopreservadas, fueron 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

3.1.- Técnica quirúrgica.

Todos los perros se sometieron a anestesia general con pentobarbital sódico (Anestesal®, Pfizer, México) con una dosis de 28 mg/kg IV y se realizó tricotomía, antisepsia de la región esternal con límite craneal en la entrada del tórax y caudal en la apófisis xifoides del esternón. Inmediatamente cada animal se colocó sobre la mesa de cirugía en posición decúbito dorsal, se les colocó una cánula oro traqueal, se conectó a un ventilador de volumen (Harvard Apparatus®, Boston MA, USA) y se ventiló con un volumen corriente de 15 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 se seccionó en su línea media y se colocó un separador de Finnochietto para hacer visibles las estructuras de la cavidad torácica. Enseguida se llevó 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 tráquea y una vez realizado esto a cada animal se le administró heparina a dosis de 20 UI/ Kg de peso, cinco minutos después de que esta fue administrada, a cada perro se le administró una sobredosis de pentobarbital sódico e inmediatamente después se extrajo el bloque cardiopulmonar.

3.2.- Procesamiento de la arteria pulmonar.

Una vez que el bloque cardiopulmonar se encontraba fuera de la cavidad, se disecó el tronco de la arteria pulmonar y se seccionó desde su salida del corazón hasta su entrada en cada pulmón, inmediatamente la arteria se sumergió y se lavó en 100 ml de una solución de NaCl al 0.9% adicionada con 5000 UI de heparina, 8000 UI de penicilina procaínica y 1 g de sulfato de estreptomicina por cada 500 ml de solución (Figura 1).

3.3.- Liofilización de los injertos vasculares arteriales.

Una vez que las arterias fueron lavadas con la técnica anteriormente descrita, 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 su liofilización. Inmediatamente después las arterias ya montadas se colocaron dentro de un matraz Erlenmeyer que fue sellado con un tapón de plástico y con papel parafilm, se congeló a una temperatura de -70°C durante 24 horas. Posteriormente se liofilizó a una temperatura de -43°C , con una presión de vacío de $< 300 \times 10^{-03}$ B. Una vez liofilizada se retiraron las cánulas y se empaquetaron en sobres individuales para su esterilización con óxido de etileno (Figura 2a). Las arterias esterilizadas, se almacenaron a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización (Figura 2b) y se reconstituyeron mediante hidratación al sumergirlas durante 30 minutos en solución salina a 37°C .

3.4.- Criopreservación de los injertos pulmonares.

Inmediatamente después de la procuración, la arteria pulmonar se colocó sobre una charola de mayo colocada sobre una cámara de hielo. La arteria se enjuagó con una solución con glucosa al 50% (Solución DX-50®, PISA, Mex) adicionada con 5000U de heparina (Inhepar®, PISA, Mex), 1g de estreptomina (Sulfastrep®, PISA, Mex) y 1000000 UI de penicilina (PISA, Mex) por cada litro de solución, se retiraron los coágulos cuidando de no disecar el tejido propio de la arteria. Con ayuda de un bisturí se cortó un segmento del tronco común de la arteria pulmonar, este segmento fue el segmento “control pre-criopreservación” y no se sometió a ningún tipo de criopreservación, se sumergió en una solución de formol amortiguado al 10% para estudio histológico y morfométrico. El resto de la arteria se colocó dentro de un criotubo que contenía medio CS-C especial para células endoteliales (SIGMA, C1431, EUA) complementado con el factor endotelial de crecimiento celular (SIGMA, E9640, EUA) y adicionado con 10% de Dimetil Sulfóxido (SIGMA, D2650, EUA), 20% de Suero Bovino Fetal (GIBCO, 16000-044, EUA) y una solución antibiótica-antimicótica (SIGMA, A5955, EUA). Los criotubos que contenían las arterias pulmonares se colocaron dentro de una caja de poliestireno con el objeto de disminuir la temperatura de congelación de manera gradual en $-1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, hasta alcanzar una temperatura de -70°C en el congelador en donde se mantuvieron durante 48 horas en forma previa a su almacenamiento en nitrógeno líquido (fase de vapor -196°C) durante 15 días hasta el momento de utilización, para lo cual, en forma previa inmediata al procedimiento quirúrgico fueron retiradas del tanque de nitrógeno,

descongeladas colocando el criovial en un baño maría a 37°C y enjuagadas en solución salina a 37°C.

Una vez concluida la preservación de los injertos pulmonares y antes de trasplantarlos se realizó control microbiológico

4. Grupos de estudio.

Los animales se dividieron en tres grupos de estudio.

Grupo I o control (n=6): Mediante toracotomía lateral izquierda se realizó resección y reanastomosis de la arteria pulmonar izquierda.

Grupo II (n=6): Se llevó a cabo disección y resección de 1 cm de la arteria pulmonar izquierda y ésta se reconstruyó con un aloinjerto de arteria pulmonar liofilizado.

Grupo III (n=6): Por medio de toracotomía, se resecó 1 cm y reconstruyó la arteria pulmonar izquierda con un aloinjerto de arteria pulmonar criopreservada.

4.1.- 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, Mex) a dosis de 0.1 mg/Kg y 6 mg/kg de propofol (Recofol®, PISA, Mex) vía intravenosa (IV) mezclados en la misma jeringa e inmediatamente después se les aplicó dipirona (Metamizol Sódico-Nondol-Sector Salud, Mex) a dosis de 28 mg/Kg IV como analgésico.⁴⁶

4.2.- Técnica quirúrgica receptor.

4.2.1.- Colocación de catéteres.

Una vez anestesiados (Figura 3) los animales se colocaron sobre la mesa de cirugía en posición decúbito dorsal y se intubaron con una sonda orotraqueal (Baxter 6 Fr, EUA).

Acto seguido se procedió a la tricotomía y lavado con jabón quirúrgico de la región cervical e inguinal derecha. Finalmente se realizó antisepsia de la zona con yodo povidona (Dermodine Solución®, Dermodex S.A. de C.V., Mex).

Posteriormente se procedió a la colocación de catéteres en la vena yugular derecha, así como en la arteria y vena femoral derecha para monitorear sus parámetros

hemodinámicos sistémicos y pulmonares, además de toma de muestras arteriales y venosas para realizarles gasometrías.

4.2.1.1- Catéter pulmonar.

En el tronco de la arteria pulmonar se introdujo un catéter de Swan Ganz 5F (Edwards Lifesciences, EUA), para esto se disecó e introdujo el catéter en la vena yugular derecha, el cual se dirigió hasta la arteria pulmonar con la ayuda del monitor de signos vitales (Datascopie Passport, Cheshire, EUA), posteriormente este catéter se conectó a una computadora de registro de gasto cardiaco (Hemodynamic Profile Computer Spectramed model SP-1445, Oxnard, CA-EUA) y con este se registraron los valores de las presiones pulmonares y el gasto cardiaco.

4.2.1.2.- Catéteres sistémicos.

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 respectivamente. El catéter arterial se conectó al monitor de electrocardiografía y el catéter venoso se conectó a una columna de agua con la que se midió la presión venosa central. A través de estos 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, EUA).

Al concluir la cirugía y la medición de los parámetros hemodinámicos y gasométricos, la arteria y las venas en las que se introdujeron los catéteres fueron reparadas mediante puntos separados con polipropileno de 6-0 (Prolene Ethicon®, EUA) y se continuo con el cierre convencional.

4.2.2 Colocación del injerto.

Inmediatamente después de la colocación de los catéteres sistémicos y pulmonares se colocó a cada animal sobre la mesa de cirugía en posición decúbito lateral derecho (previa 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) 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%.(VCM Anesthesia Machine, Yorkshire, England). Todos los animales se ventilaron con un volumen corriente de 15 ml/Kg con una fracción inspirada de oxígeno (FiO₂) de

100% y 20 respiraciones por minuto durante todo el procedimiento quirúrgico y se vigilaron los signos vitales con un monitor para electrocardiografía (Datascope Passport, EUA) (46).

Antes de iniciar la cirugía y después de delimitar la zona quirúrgica, los injertos de arteria pulmonar liofilizadas se sumergieron por un lapso de 10 minutos en solución de NaCl al 0.9% estéril para su rehidratación. Mientras que cada uno de los viales que contenía las arterias criopreservadas se colocaron en agua a 40°C durante 30 minutos para descongelar el aloinjerto y una vez descongelado, se retiraron del criotubo y se enjuagaron en el medio de criopreservación mantenido a 40°C durante 10 minutos.

También después de que las arterias se rehidrataron o descongelaron se tomó una muestra para cultivo microbiológico, estudio macroscópico y microscópico.

En los 3 grupos 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 incidió con tijera el músculo serrato ventral y el dorsal ancho, para exponer 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, la cual se incidió con tijera, inmediatamente después se colocó un separador de Finochietto, se disecó (Figura 4) y se resecó un segmento de 1 cm de la arteria pulmonar izquierda (Figura 5), la cual se reanastomosó (Figura 6) o substituyó con un aloinjerto liofilizado (Figura 7) o criopreservado (Figura 8) (dependiendo del grupo de estudio) mediante una anastomosis termino-terminal con material de sutura no absorbible de polipropileno 4-0 (Prolene, Ethicon, EUA) y sutura continua. Acto seguido se revisó que no existiera sangrado en la zona de las anastomosis y se continuó con la colocación del sello de agua y cierre convencional.

4.3.- Colocación del tubo de drenaje endopleural y del sello de agua.

Se efectuó una incisión cutánea pequeña en el tercio dorsal de la pared torácica lateral a nivel del noveno espacio intercostal. Se avanzó el tubo subcutáneamente en dirección craneoventral por tres espacios intercostales y se introdujo el tubo a través del músculo y pleura utilizando una pinza hemostática larga, el tubo de drenaje pleural se introdujo dentro de la cavidad torácica en dirección craneoventral, se colocó una jareta de sutura no absorbible en la piel alrededor del tubo (para cerrar la cavidad cuando este fue retirado) y se conectó al sello de agua. Se realizó cierre convencional de la cavidad torácica,

posteriormente los pulmones fueron insuflados a su máxima capacidad (con 15 ml /kg de volumen corriente) para reestablecer la función negativa de la cavidad y una vez que esta se recuperó (cuando el sello de agua ya no mostró burbujeo), la sonda fue extraída y la jareta fue cerrada.

Concluido el procedimiento quirúrgico e inmediatamente después de ser retirado el tubo endopleural y que los animales se recuperaron de la anestesia, estos fueron extubados y colocados en su cuarto de recuperación. Se les administró 28 mg/Kg de dipirona (Metamizol Sódico, Nondol-Sector Salud. D.F., México) vía intramuscular (IM) como analgésico cada 6 horas por 3 días o durante el tiempo que presentaron signos de dolor. También se les aplicó antibioterapia a base de enrofloxacin (Baytril, Bayer, México) a dosis de 20 mg/kg IM cada 24 horas por 5 días. Ningún animal recibió tratamiento inmunosupresor, ni de anticoagulación durante el tiempo que duró el estudio.

5.- Evaluación.

A los injertos al inicio del estudio y durante la realización del procedimiento quirúrgico se les evaluó su manejo quirúrgico, se les realizaron cultivos microbiológicos y se valoró su arquitectura tanto macroscópica como microscópicamente. Posterior al procedimiento quirúrgico, el estudio tuvo una duración de 4 semanas, los animales se evaluaron clínica, radiológica, angiográfica, ecográfica, así como hemodinámica y gasométricamente. Al finalizar el estudio se llevó a cabo evaluación macroscópica y microscópica del aloinjerto y de los tejidos circundantes.

5.1. Manejo quirúrgico de los injertos.

A todos los injertos se les valoró su consistencia, facilidad para el paso de la sutura, capacidad hemostática en los sitios de sutura y respuesta hemodinámica en el posoperatorio inmediato.

5.2. Cultivos microbiológicos de los injertos

Se realizó control microbiológico, sembrando las muestras de los injertos de AP en agar sangre y agar papa, para el aislamiento de posibles bacterias y hongos respectivamente. Los cultivos se incubaron a 35°C por 7 días en condiciones de aerobiosis para su posterior recuento y diferenciación de colonias.

5.3. Clínica.

Los animales se evaluaron de forma clínica 2 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 principalmente que los animales operados mostraran o no disnea, la cual fue evaluada de acuerdo a una escala modificada a la utilizada por la Medical Research Council⁴⁷, la cuál se basa en la severidad de ésta: 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 valoró la presencia de inflamación, infección 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 esfuerzo, la cual se llevó a cabo primero observando a los animales en reposo dentro de su jaula, posteriormente cada animal caminó una distancia de 20 metros y finalmente se les lanzó una bola de carne para que los animales corrieran por ella (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, también se observó si presentaron respiración torácica o abdominal, así como la coloración de la mucosa oral.

5.4. Hemodinámica, gasometría y parámetros ventilatorios.

Se llevo a cabo la evaluación de los parámetros hemodinámicos sistémicos y pulmonares, así como de los valores gasométricos arteriales y venosos a través de los catéteres colocados en la arteria pulmonar, arteria y vena femoral, además de la presión inspiratoria máxima (PIM) que se midió con un manómetro conectado al ventilador de volumen que registraba la resistencia que presentaba el pulmón durante la inspiración, estos fueron evaluados antes de realizar la cirugía, inmediatamente después de colocar el injerto en la arteria pulmonar y al final del estudio.

5.4.1.- Parámetros hemodinámicos sistémicos.

Los parámetros hemodinámicos sistémicos evaluados fueron: frecuencia cardiaca (FC), gasto cardiaco (GC), presión arterial media sistémica (PMAS), resistencias vasculares sistémicas (RVS) y presión venosa central (PVC).

5.4.2. Parámetros hemodinámicos pulmonares.

Los parámetros hemodinámicos pulmonares que se valoraron, incluyeron a la presión media de arteria pulmonar (PMAP) y las resistencias vasculares pulmonares (RVP), así como los cortos circuitos.

5.4.3. Parámetros gasométricos y ventilatorios.

Los parámetros gasométricos evaluados fueron: 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. También se tomó en cuenta la presión inspiratoria máxima (PIM).

Todos estos datos se colectaron en una hoja de registro (AnexoII) y el análisis estadístico de estos se llevó a cabo mediante análisis de varianza (Andeva) y prueba de Tukey.

5.5. 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, diariamente durante la primera semana después de este y cada semana hasta que concluyó el tiempo de estudio.

5.6. Angiográfica.

Al finalizar el estudio y bajo anestesia general 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 ventrodorsal durante el momento de la inyección, con lo que se hicieron aparentes los vasos sanguíneos del pulmón.

5.7. Ecográfica.

Al final del estudio y también con el animal bajo anestesia general, se llevo a cabo evaluación ecográfica para ver la permeabilidad de los injertos pulmonares.

Se realizó ecografía bidimensional a través de la ventana paraesternal derecha del tórax y se realizaron vistas del eje transversal derecho rotando el transductor aproximadamente 90° en sentido de las agujas del reloj, para obtener la vista de cuatro cavidades. Posteriormente el plano del haz se orientó perpendicular y craneocentralmente al eje longitudinal del corazón y se obtuvieron las diferentes proyecciones del eje transversal del corazón. Acto seguido el ángulo del transductor se rotó ligeramente para observar la aorta ascendente proximal, el atrio derecho y las ramas de la arteria pulmonar. Después a través de la ventana paraesternal craneal izquierda, se inclino el transductor hacia el eje longitudinal y se dirigió el haz en dirección dorsal a la aorta para observar el tracto de salida del ventrículo derecho de la válvula pulmonar y del tronco pulmonar. Además en esta vista se midió la velocidad del flujo sanguíneo de la AP.

5.8. Macroscópica.

Una vez transcurridas 4 semanas postcirugía los animales se sometieron a eutanasia con sobredosis de pentobarbital sódico (Anestesal®, Pfizer, Mex), macroscópicamente se revisó el estado de la anastomosis donde se colocó el injerto pulmonar y mediante observación directa se evaluó su integración, cicatrización, presencia de trombos, estenosis del injerto, aneurismas, dehiscencia, infección o necrosis del injerto.

5.9. Microscópica.

Para la evaluación histológica durante la realización de la cirugía, se tomaron muestras de la arteria pulmonar izquierda e injertos liofilizados o criopreservados inmediatamente después de ser rehidratados o descongelados y al finalizar el estudio, dichas muestras se fijaron en formaldehído al 10%, posteriormente se incluyó el bloque en parafina y se les realizaron cortes de 4µ de grosor. Posterior al proceso de desparafinado e hidratación se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson.

Una vez teñidas, por microscopia de luz se les evaluó integridad estructural, inflamación (presencia de macrófagos, linfocitos y fibroblastos), atrofia de las diferentes capas de la arteria pulmonar, formación de trombos, calcificación del injerto, presencia y organización de las fibras de colágena, dehiscencia o rechazo del injerto.

La evaluación de éstos se llevo a cabo en toda la circunferencia del vaso mediante una escala semicuantitativa descrita por Veiga⁴⁸ en la cual a cada parámetro evaluado se le asigno un porcentaje de acuerdo a la intensidad de los cambios histopatológicos (0-10 % ausente, 11-25% escaso, 26-50% moderado y del 51-100% abundante). La presencia de trombos solo se describió si existían o no.

La organización de las fibras de colágena se realizó mediante una escala subjetiva descrita por el Dr. Miguel Gaxiola, la cual se basa en la disposición que toman las fibras de colágena: 1 fibras de colágena sin dirección definida, 2 alineamiento de las fibras de colágena con disposición perpendicular, con respecto al borde de la lesión, 3 alineamiento horizontal al plano del borde de la lesión y 4 proliferación excesiva de las fibras de colágena con alineamiento horizontal al plano del borde de la lesión.

Para el análisis histológico se realizó un estudio ciego, es decir, se revisaron las laminillas sin saber a qué grupo pertenecía cada una de ellas, para promover un análisis más objetivo de las muestras. El análisis estadístico de estos datos se llevó a cabo mediante ANDEVA y Tukey.

VI. RESULTADOS

1.- Manejo quirúrgico. En todos los casos se observó que los injertos liofilizados y criopreservados, tienen fácil manejo quirúrgico, alta capacidad hemostática y excelente respuesta hemodinámica en el posoperatorio inmediato.

2.- Cultivos microbiológicos de los injertos

En el 100% de las muestras estudiadas los cultivos microbiológicos resultaron negativos, ya que no hubo crecimiento de hongos, levaduras ni bacterias en los medios de cultivo después de 15 días de incubación en aerobiosis.

3.- Hallazgos clínicos

El total de los animales (100%) sobrevivieron al procedimiento quirúrgico y al tiempo de estudio establecido. Ninguno de los animales de los tres grupos de estudio presentó diferencia clínica significativa considerando que sus constantes fisiológicas (temperatura, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, coloración de mucosas), se encontraron dentro de los parámetros de referencia.

Todos los animales mostraron disminución de los ruidos respiratorios en el hemitórax izquierdo durante los primeros tres días postquirúrgicos, sin embargo estos se restablecieron entre el quinto y sexto día poscirugía.

El 100% (n=18) de los animales sometidos a la prueba de esfuerzo, respondieron satisfactoriamente al no tener problemas para respirar durante todo el tiempo de estudio.

Con respecto a la evaluación de la herida quirúrgica en los dieciocho animales (100%) se presentó inflamación y dolor leve durante la primera semana pos-quirúrgica, en ningún caso se observó presencia de sangrado post-operatorio, ni dehiscencia de la herida quirúrgica. En los tres grupos la herida quirúrgica se observó completamente cicatrizada entre el día 14 y 16 post-cirugía.

4. Hallazgos hemodinámicos, gasométricos y parámetros ventilatorios.

Al comparar los valores de los parámetros hemodinámicos, gasométricos y ventilatorios de los tres grupos de estudio tomados antes de la cirugía, inmediatamente después de la colocación del injerto y al final del estudio, se observó que: la frecuencia cardíaca (FC), gasto cardíaco (GC), presión arterial media sistémica (PAMS), presión venosa central (PVC) y los parámetros gasométricos: presión parcial de oxígeno (O₂), bióxido de carbono

(CO₂), pH arterial, pH venoso y la presión inspiratoria máxima (PIM), no mostraron cambios estadísticamente significativos ($p=NS$, ANOVA, $p=NS$ Tukey/Kramer), ya que se mantuvieron dentro de los valores fisiológicos de referencia.

Únicamente se observaron cambios hemodinámicos en los siguientes parámetros:

Presión arterial sistémica sistólica.

Al comparar dentro de cada grupo la presión arterial sistémica sistólica no mostró cambios significativos. Sin embargo al realizar la comparación entre grupos, en el pos-cirugía y al final del estudio los animales de los grupos II y III, tuvieron un incremento significativo contra el grupo I ($p<0.05$ ANDEVA y TUKEY). Aunque estos valores, siempre se encontraron dentro de los parámetros fisiológicos de referencia. (Gráfica 1)

Presión arterial sistémica diastólica.

La presión arterial sistémica diastólica del grupo III se incrementó significativamente ($p<0.05$ Andeva, Tukey) inmediatamente después de la cirugía y al final del estudio en comparación con los grupos I y II (Grafica 2).

Presión arterial pulmonar sistólica.

La presión arterial pulmonar sistólica del grupo III se incrementó significativamente en comparación con su valores basales, inmediatamente después de la cirugía y al final del estudio ($p<0.01$ Andeva, Tukey). Sin embargo este incremento únicamente rebaso los parámetros fisiológicos normales al final del estudio.

Al comparar entre grupos esta también se observó incrementada en comparación con los valores basales, postcirugía y al final del estudio de los grupos I y II ($p<0.01$ Andeva, Tukey). (Gráfica 3)

Presión arterial pulmonar diastólica

Con respecto a la presión arterial pulmonar diastólica, la del grupo III se incrementó significativamente en comparación con su valores basales, inmediatamente después de la cirugía y al final del estudio ($p<0.05$ Andeva, Tukey). Sin embargo este incremento únicamente rebasó los parámetros fisiológicos normales al final del estudio.

Al comparar entre grupos esta también se observó incrementada en comparación con los valores basales, postcirugía y al final del estudio de los grupos I y II ($p < 0.05$ Andeva, Tukey). (Gráfica 4)

Presión arterial pulmonar media.

La presión arterial pulmonar media del grupo III se incrementó significativamente ($p < 0.05$ Andeva, Tukey) inmediatamente después de la cirugía y al final del estudio en comparación con sus valores basales. Sin embargo al compararlo entre grupos, no se observó diferencia estadística alguna ($p = \text{NS}$, Andeva, Tukey) (Gráfica 5)

Resistencia vascular pulmonar

Las resistencias vasculares pulmonares del grupo II y III se incrementaron inmediatamente después de la cirugía y al final del estudio al compararlos dentro del mismo grupo ($p < 0.01$ Andeva, Tukey).

Al realizar comparación entre grupos, se observó incremento de la RVP en el posquirúrgico inmediato y al final del estudio en los grupos II y III con respecto al grupo I, sin embargo solo el incremento de la RVP del grupo III fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$ Andeva y Tukey) (Gráfica 6)

5. Hallazgos radiográficos

En los 3 grupos de estudio ($n=18$) las placas ventrodorsales, que se tomaron inmediatamente después del procedimiento quirúrgico y al día siguiente, se apreció una imagen sugerente de neumotórax en la parte craneal del hemitórax izquierdo, sin atelectasia en ningún lóbulo pulmonar. En lo que respecta a la silueta cardiaca, tráquea, esófago, vena cava y diafragma, no presentaron alteración alguna. El aire presente en la cavidad torácica comenzó a disminuir a partir del tercer día posquirúrgico y desapareció en el quinto día. En las placas radiográficas posteriores, la cavidad mostró sus características anatómicas normales (Figura 9).

6 y 7. Hallazgos angiográficos y ecográficos.

Los hallazgos angiográficos (Figura 10) y ecográficos en los animales del grupo I y II, mostraron permeabilidad de las anastomosis de la arteria pulmonar en el 100% de los casos. En el grupo III, el 66.6% (4 animales) de los perros mostraron la arteria pulmonar

izquierda injertada completamente permeable (Figura 11), sin embargo 2 animales (33.3%) presentaron obstrucción del injerto al final del estudio.

8. Hallazgos macroscópicos.

En todos los casos, al realizar la obtención del injerto de arteria pulmonar trasplantado, se observó que el pulmón izquierdo se encontraba adherido a la pleura parietal del sitio en el que se llevó a cabo la toracotomía.

Ninguna de las arterias pulmonares liofilizadas o criopreservadas utilizadas como aloinjertos presentaron fracturas o algún cambio macroscópico aparente, inmediatamente después de haber sido rehidratadas o descongeladas.

Al concluir el tiempo de estudio, en el grupo I el 100% de los animales (n=6) presentaron buena cicatrización tanto de la adventicia como del endotelio de la arteria pulmonar, sin presencia de estenosis, dehiscencia o infección, ni aneurismas.

En el grupo II el 100% de los casos (n=6) la adventicia se mostró bien cicatrizada, al igual que el endotelio (Figura 12a), la luz del injerto liofilizado se apreció permeable en su totalidad y sin presencia de trombos, ni aneurismas (Figura 12b).

Macroscópicamente 2 de los animales (33.3%) del grupo III al final del estudio mostraron adherencias difíciles de despegamiento de la adventicia con el lóbulo pulmonar craneal izquierdo (Figura 13a), además presentaron obstrucción total de la luz del injerto criopreservado por presencia de un trombo y tejido fibroso alrededor de éste (Figura 13b).

En los 4 animales (66.6%) restantes de este grupo la luz del injerto se observó bien cicatrizada y completamente permeable, así como su cara externa. Tampoco en ningún animal de este grupo se observaron aneurismas.

9. Hallazgos microscópicos.

Microscópicamente el 100% de las arterias pulmonares liofilizadas después de ser rehidratadas y antes de ser utilizadas como aloinjertos mostraron su estructura histológica normal. Mientras que solo el 66.6% (4 arterias) después de ser descongeladas mostraron su arquitectura normal, las otras 2 arterias restantes (33.33%) presentaron zonas de pérdida de la continuidad del endotelio.

Al finalizar el estudio, el 100% (n=6) de las biopsias del grupo I presentaron la arquitectura del endotelio, íntima y adventicia con apariencia normal (Cuadro 1), cicatrización adecuada caracterizada por el desarrollo moderado (Cuadro 2) de fibras de colágena

delgadas con organización grado 3 ya que su alineación fue horizontal al borde de la anastomosis y perpendiculares a los vasos sanguíneos de neoformación (Cuadro 3) (Figura 14). Además ninguna de estas muestras presento inflamación (Cuadro 4), trombos (Cuadro 5) o calcificación (Cuadro 6) (Figura 15). Tampoco presentó proliferación de la íntima. (Figura 16).

En el grupo II el estudio histológico del 100% de los animales mostraron buena integración tisular con preservación de la arquitectura normal del endotelio, íntima y adventicia tanto en las anastomosis proximales como distales (Cuadro 1), las cuales se observaron con adecuada cicatrización con escasa formación de fibras de colágena en 3 de los perros operados (50%) y moderada en los 3 animales restantes (50%) (Cuadro 2). Mientras que la organización de las mismas fue grado 2 (ligero desarreglo en las fibras de colágeno) en 3 animales (50%) y en los otros 3 perros (50%) fue grado 3, moderado desarreglo de las fibras de colágeno (Cuadro 3) (Figura 16). Dos animales presentaron proliferación (Figura 18) de la íntima e inflamación (1 escasa y otro moderada) a base de linfocitos. (Figura 19) En ningún caso se observó la presencia de trombos (Cuadro 5) o calcificaciones (Cuadro 6).

En el Grupo III, 4 de los animales (86.6%) de experimentación a los que se les colocó injerto de arteria pulmonar criopreservada mostraron una escasa ligera hiperplasia de la íntima en las anastomosis distales, aunque las anastomosis proximales se observaron de apariencia normal. En dos animales (33.3%) de este grupo se observó hiperplasia abundante de la íntima (formación de neoíntima) en ambas anastomosis (Figura 20), sin embargo la reacción hiperplásica fue mayor en el extremo distal (Cuadro 1).

La cicatriz formada en 4 animales (86.6%) mostró fibrosis moderada de la íntima (Cuadro 2) con organización grado 3 (Figura 21 y Cuadro 3). Los otros 2 animales (33.3%) de este grupo desarrollaron una cicatriz fibrótica a nivel de la anastomosis distal con abundante presencia de fibras de colágena con organización grado 4 en todas las capas del vaso (principalmente en la íntima). Sin embargo la anastomosis proximal se observó de apariencia normal.

En este grupo 3 perros (50%) mostraron inflamación escasa, 1 (16.6%) moderada con presencia de fibroblastos y 2 (33.3%) abundante a base de linfocitos y fibroblastos (Figura 22 y Cuadro 4).

Dos animales (33.3%) desarrollaron un trombo y calcificación del 100% en la porción distal del injerto (Cuadro 5 y 6).

10. DISCUSIÓN.

En este trabajo se evaluó la utilidad y funcionalidad de los aloinjertos de arteria pulmonar liofilizada y criopreservada.

La resolución de algunas patologías de la arteria pulmonar (neoplasias, aneurismas, trombosis, estenosis, infecciones o traumatismos) es quirúrgica mediante la sustitución del vaso dañado, como lo señalaron Dorantes *et al.*⁹ en 1997 y Milnos *et al.*¹⁰ en 1980; sin embargo el éxito de la cirugía depende de la permeabilidad a largo plazo de los injertos utilizados.

El reemplazo de segmentos arteriales ha sido uno de los grandes problemas de la cirugía vascular debido principalmente al rechazo de los injertos, a la falta de un método de preservación adecuado que permita obtener un vaso sanguíneo que mantenga su arquitectura y funcionalidad igual a la del tejido sano, que no sea trombogénico y susceptible de sufrir infección, que no se calcifique, ni estenose, que tenga capacidad de crecimiento, además que se encuentren disponibles cuando se necesiten como lo mencionan Dalmau *et al.*⁴⁹ en 2002 y Shinoka *et al.*⁵⁰ en 1998.

Se sugiere que la técnica de liofilización resuelve el problema de rechazo, desarrollo de trombosis e hiperplasia de la íntima en el tejido del receptor, mejorando a los materiales sintéticos, si bien éstos solucionaron en parte el problema de rechazo, pero no el desarrollo de trombosis e hiperplasia de la íntima, como lo refiere Faggioli *et al.*⁵¹ en 1994.

Además las arterias pulmonares liofilizadas, gracias a sus características físicas y de manejo quirúrgico, permitieron mantener la continuidad de un vaso sanguíneo a largo plazo evitando que la arteria pulmonar se trombose, infecte y calcifique. Mientras que los aloinjertos vasculares en fresco, mantienen la continuidad del vaso sanguíneo, pero solo a corto plazo, debido a que a largo plazo actúan como un material extraño que se trombosa, infecta, calcifica y finalmente termina con la falla del injerto, como lo describen Shinoka *et al.*⁵⁰ en 1998 y Mayer *et al.*⁵² en 1995.

Hopkins *et al.*⁵³ en 2005 y Herreros *et al.*⁵⁴ en 2006 han utilizado con éxito las técnicas de liofilización y criopreservación, principalmente para la preservación de injertos valvulares y de vasos de alta presión, sin embargo no existen reportes de su uso para la preservación de vasos de baja presión como la arteria pulmonar. En este estudio la técnica de criopreservación no fue del todo exitosa, ya que en algunas arterias la pérdida del endotelio durante la criopreservación favoreció la respuesta inflamatoria de la íntima, formación de una neoíntima, destrucción de las células endoteliales, cambios fibróticos en la matriz extracelular de los injertos y formación de trombos.

En el presente estudio los cultivos microbiológicos de los injertos tanto liofilizados como criopreservados, fueron negativos, debido a que en ambos grupos (II y III) durante su preparación se les adicionaron antibióticos, los liofilizados para su almacenamiento fueron esterilizados con óxido de etileno y los criopreservados se almacenaron en nitrógeno líquido (-196°C), lo que en conjunto impidió el desarrollo de algún microorganismo en los injertos. Estos hallazgos coinciden con lo descrito por los bancos de tejidos en diferentes países, quienes mencionan que no se presentan infecciones después de colocar los injertos gracias a la adición de antibióticos durante la preparación de los injertos valvulares.⁵⁴⁻⁵⁸

En relación al manejo quirúrgico, solo existen reportes con el uso de injertos criopreservados y lo observado en este trabajo coincide con lo descrito por otros cirujanos que han utilizado este tipo substitutos arteriales.⁵⁹ Aunque no existen reportes del uso y manejo quirúrgico de los injertos de arteria pulmonar liofilizada, de acuerdo a lo observado durante la realización del procedimiento quirúrgico de esta investigación, se pudo constatar que son de cómodo manejo quirúrgico, tienen alta capacidad hemostática y excelente respuesta hemodinámica en el posoperatorio inmediato.

Clínicamente todos los perros sometidos a cirugía de trasplante de arteria pulmonar, mostraron una evolución satisfactoria en el postoperatorio inmediato debido a que el procedimiento quirúrgico se llevó a cabo con todas las reglas de cirugía vascular en anastomosis de vasos sanguíneos y de cirugía de tórax. En los 2 animales del grupo III que al final del estudio presentaron obstrucción del injerto y aunque hemodinámicamente desarrollaron hipertensión pulmonar, estos no presentaron ningún signo clínico como consecuencia de ésta, lo que puede hacer suponer que los animales operados son

clínicamente sanos, el pulmón contra lateral compensó la función del pulmón afectado. Además es probable, que el tiempo de estudio sea corto para producirles daño cardiopulmonar severo que comprometa la vida, como lo menciona Kittleson *et al.*²⁷ en 2000.

También lo han reportado Tidholm *et al.*⁶⁰ en 1997 y Bussadori *et al.*⁶¹ en 2001; quienes han trabajado con el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades cardiacas congénitas y mencionan que los animales con obstrucciones pulmonares leves son habitualmente asintomáticos en comparación con los casos severos, los cuales presentan signos relacionados con bajo gasto cardíaco, tales como intolerancia al ejercicio, síncope y a menudo fallo cardíaco derecho, además de que a la auscultación torácica revelan un soplo sistólico (sobre el foco de la válvula pulmonar que irradia dorsalmente) o si existe regurgitación tricuspídea se escucha un soplo holosistólico en el hemitórax derecho (sobre el foco tricuspídeo).

Radiológicamente en todos los perros inmediatamente después de la cirugía, se apreció la presencia de neumotórax leve, el cual empezó a disminuir a partir del tercer día y desapareció en el quinto día posquirúrgico, esto puede explicarse por que el aire observado dentro de la cavidad, era aire residual que entró en ésta durante la intervención quirúrgica y como no había ninguna lesión del parénquima pulmonar, se reabsorbió en este lapso de tiempo y estos hallazgos coinciden con los observado por Fossum *et al.*⁶² en 1997 después de realizar diversos procedimientos quirúrgicos de tórax.

Con respecto a la posición y estructura anatómica normal de la silueta cardiaca que se observó durante todo el tiempo de estudio en los 2 animales que mostraron obstrucción del injerto, se puede pensar que esto fue debido al tiempo que duró el estudio (4 semanas) ya que no es suficiente para provocar en estos animales agrandamiento del corazón y arteria pulmonar. Esto concuerda con lo descrito por Ristic *et al.*⁶³ en 2001 y Fernández *et al.*⁶⁴ en 2002, quienes han estudiado las estenosis pulmonares en perros y describen que en los casos leves y de poco tiempo de evolución no se observan cambios radiográficos en el corazón y arteria pulmonar, a diferencia de los casos severos y crónicos en los que se presentan varios grados de agrandamiento del ventrículo derecho, tronco de la arteria pulmonar prominente y los pulmones hipoperfundidos.

En este trabajo también se confirmó que tanto los estudios angiográficos como ecocardiográficos son 2 pruebas de imagen que permiten la evaluación preoperatoria y controles posoperatorios adecuados de las estructuras reconstruidas ya sea con autoinjerto u homoinjerto pulmonares y predecir la evolución a largo plazo, como lo describen Stutzbach *et al.*⁶⁵ en 2002, Michel *et al.*⁶⁶ en 2000 y Segura *et al.*⁶⁷ en 2005. Ya que estos estudios permitieron diagnosticar y cuantificar la obstrucción del injerto de arteria pulmonar colocado en 2 de los animales del grupo III, así como la completa permeabilidad sin presencia de aneurismas de las anastomosis del grupo control, de los injertos liofilizados y de los otros 4 criopreservados. Además de permitir observar la anatomía normal de todas las estructuras del corazón y el adecuado flujo sanguíneo en las arterias permeables, pero no en las obstruidas. Estos hallazgos de la apreciación de la obstrucción e incremento en el flujo de la arteria pulmonar contralateral correlacionan con los vistos por otros autores cuando han diagnosticado estenosis de la arteria pulmonar,^{60,63,64} sin embargo no coincide con lo descrito por ellos cuando han observado obstrucción del 100% de ésta, como la observada en este estudio, ya que ninguno de los animales en los que se obstruyó el injerto, se presentó hipertrofia ventricular concéntrica, movimiento septal paradoxal y reducido tamaño de atrio y ventrículo izquierdo, ni dilatación del tronco de la arteria pulmonar (distal a la obstrucción y cerca de la bifurcación). No obstante como ya se mencionó el tiempo de estudio al que fueron sometidos estos animales fue muy corto y por eso no se encontraron esos cambios anatómicos en estos exámenes de laboratorio.

La ausencia de cambios hemodinámicos y gasométricos en los animales que mantuvieron permeable la arteria pulmonar durante todo el tiempo de estudio después de haberles realizado la anastomosis termino-terminal de la arteria o colocado el injerto liofilizado o criopreservado, fue porque se permitió el paso adecuado de sangre y el correcto intercambio gaseoso, como lo reporta Guyton *et al.*⁶⁸ en 2005.

El incremento observado en las presiones sistémicas, el cual no rebasó los parámetros fisiológicos de referencia, pudo deberse a que durante la ventilación, la presión positiva ejercida por el ventilador aumenta la presión en la arteria pulmonar y produce valores más elevados (mientras que en la respiración espontánea, la presión intratorácica negativa la disminuye y da una medición más baja), o quizás también pudo ser originado por que la presión no fue leída al final de la espiración (que es punto más estable del ciclo respiratorio), como lo indican Guyton *et al.*⁶⁸ en 2005 y Vázquez *et al.*⁶⁹ en 2006.

El incremento significativo en las presiones pulmonares y la resistencia vascular pulmonar en 2 animales del grupo III, fue originado por la obstrucción del injerto que disminuyó el diámetro del vaso, el cual es el principal determinante de la presión y de la resistencia al flujo sanguíneo. Esto puede explicarse de la siguiente manera: cuando hay vasoconstricción (menor luz del vaso sanguíneo) la presión se eleva para mantener el flujo sanguíneo a través de los vasos estrechados y a su vez a medida de que el flujo se hace menor la resistencia vascular se incrementa, como lo describe Guyton et al.⁶⁸ en 2005. A pesar de esto en los animales no se observó ninguna otra alteración clínica debido a que el tiempo de estudio fue muy corto y no permitió que se desarrollara una hipertensión pulmonar severa y falla ventricular derecha como la descrita en humanos por obstrucción tromboembólica proximal o distal de arterias pulmonares (ambas secundarias a trombos organizados en las arterias pulmonares mayores), como lo indican Jaimeson et al.⁷⁰ en 2003, Moser et al.⁷¹ en 1990 y Rosa et al.⁷² en 2006.

Ya que animales incluidos en el estudio eran clínicamente sanos, se apreció que la gravedad del compromiso hemodinámico, es decir, el desarrollo de hipertensión arterial pulmonar (HAP) está determinado por varios factores entre los que se encuentra la presencia en el paciente de enfermedad cardiopulmonar previa (principalmente hipertrofia ventricular derecha), lo cual concuerda con lo descrito por McNeil et al.⁷³ en 2003 y Wood et al.⁷⁴ en 2002.

En todos los grupos de estudio, la formación de adherencias del pulmón hacia la pleura parietal del sitio en el que se llevó a cabo la toracotomía, pudo ser ocasionada por que durante la realización del procedimiento quirúrgico se provoca daño de los tejidos por la gran incisión que se realiza y por la manipulación de los mismos, lo que ocasiona reacción inflamatoria severa tanto en la pleura como en el pulmón, la cual estimula la producción de exudado fibrinoide y la formación de adherencias.^{75,76} Estas observaciones tienen similitud con los citadas por Olmos et al.⁷⁷ en 2002, quien estudió la formación de adherencias después de realizar toracotomías y toracoscopías en perros.

Actualmente no se ha descrito la adaptación macroscópica de los injertos liofilizados o criopreservados como sustituto de arteria pulmonar. Aunque Kadoba K. et al.⁷⁸ en 1990, así como Simeón et al.⁷⁹ en 1998, han reportado su uso en arterias sistémicas y observaron que estos desarrollaban dilataciones, aneurismas o pseudoaneurismas a nivel

de las anastomosis, provocados por las altas presiones que tienen estos vasos o por mala realización de la técnica quirúrgica para la colocación del injerto.

En este estudio se apreció que los dos tipos de injertos tuvieron buena integración con la arteria nativa, caracterizada por buena cicatrización, sin presentar este tipo de complicaciones postquirúrgica y se puede pensar que fue debido a que se colocaron en la circulación pulmonar, la cual tiene presiones bajas y a que la técnica quirúrgica de colocación del injerto fue bien realizada. Además, cómo lo describe Botney *et al.*⁸⁰ en 1999, no hubo daño endotelial, ni cambios en la hemodinámica que pudieran provocar la formación de trombos.

A diferencia de los animales del grupo III que mostraron obstrucción del injerto, en los que probablemente hubo daño endotelial y con los cambios que se produjeron en la hemodinámica, se produjo un patrón vascular de remodelación con engrosamiento de la misma por proliferación fibrosa, así como la formación de trombos en el aloinjerto y posiblemente una reacción a cuerpo extraño. Estos hallazgos se relacionan con lo observado por Miro *et al.*⁵⁵ en 2002 y Cleveland *et al.*⁸¹ en 1992, quienes mencionan que la principal causa de reoperación por disfunción de los homoinjerto utilizados en la cirugía de cardiopatías congénitas, es la obstrucción del mismo a nivel de las anastomosis por la proliferación fibrosa neointimal y formación de trombos, tanto en los injertos biológicos como en los tubos de Dacrón, así como en la válvula. También concuerdan con lo descrito por Botney *et al.*⁸⁰ en 1999, quien observó en las ratas que mostraban daño endotelial e hipertensión pulmonar, desarrollaban lesión neointimal y trombos.

El mantenimiento de la arquitectura normal observado macroscópica e histológica en las arterias pulmonares liofilizadas antes de ser utilizadas como injertos, se debió a dicha fue la adecuada, aunado a la rehidratación por 10 minutos del aloinjerto, tiempo suficiente para que el injerto tome sus características semejantes a la del tejido normal, como lo han descrito Sotres, Olmos y Jasso quienes han trabajado tanto con vasos como con otros tejidos liofilizados.^{77,82,83}

Por otro lado el mantenimiento de la arquitectura histológica normal en 4 de las arterias criopreservadas evaluadas antes de ser injertadas, posiblemente se debió a que no sufrieron daño mecánico durante la procuración y preservación, además de una

descongelación lenta y secuencial como lo han descrito otros autores que ya utilizan de forma clínica vasos sanguíneos de alta presión criopreservados y que mencionan que el descongelar de esta manera evita la formación de cristales de hielo que son los encargados de producir las fracturas de las paredes del vaso ^{84,85} Mientras que la pérdida de la integridad del endotelio en 2 arterias criopreservadas fue ocasionada probablemente porque se produjo daño mecánico durante la procuración, el procesamiento de las arterias para su criopreservación o durante su descongelación, lo que provocó cambios degenerativos en la pared arterial y correlaciona con lo observado por Pegg *et al.*⁸⁴ en 1997 y Herreros *et al.*⁸⁶ en 2006.

Los estudios microscópicos del grupo I, demostraron una cicatrización de arquitectura en la zona de la lesión más parecida a la de una arteria sana, debido a que en realidad era un tejido sano que tuvo un proceso cicatrizal normal con formación de fibras de colágena homogéneas y alineadas horizontalmente con respecto al plano del borde de la lesión.

En relación a la buena cicatrización observada en las arterias liofilizadas y las criopreservadas, las que no formaron trombos, se puede pensar que se adaptaron bien a las arterias nativas, ya que no provocaron una reacción a cuerpo extraño y el endotelio vascular se preservó en buen estado. Hallazgos que coinciden por lo descrito por Kirklin *et al.*⁸⁷ en 1993 y Sayk *et al.*⁸⁸ en 2005.

La obstrucción del injerto observada en 2 de los casos en los que se utilizaron arterias pulmonares criopreservadas, pudo ser originada por formación de la neoíntima producida por el daño endotelial y posiblemente por una respuesta inmunológica inducida por el injerto, ya que se ha observado que los injertos criopreservados preservan la viabilidad de las células endoteliales y fibroblastos, los cuales teóricamente puede permitir un crecimiento potencial de los injertos y menor actividad trombogénica. Sin embargo la presencia de componentes viables en el aloinjerto puede permitir una respuesta inmune de rechazo, establecer calcificaciones y la subsecuente falla del injerto.^{50,87,89} Aunado a la formación de la neoíntima, la abundante presencia de linfocitos, fibroblastos y abundante cantidad de fibras de colágena, así como no haber administrado tratamiento con inmunosupresores, podría sugerir que en estos injertos tuvieron una reacción de rechazo agudo como lo describen varios autores, quienes han encontrado que los injertos criopreservados promueven una respuesta inflamatoria de la íntima principalmente a base

de infiltración linfocitaria, destrucción de las células endoteliales, cambios fibróticos en la matriz extracelular de los injertos, formación de trombos y calcificaciones.^{88,90-93}

Con respecto a la inflamación a base de linfocitos en la íntima y la formación moderada de fibras de colágena en los injertos pulmonares liofilizados y de acuerdo a lo descrito para los criopreservados, posiblemente en estos también se vaya a presentar un episodio de rechazo, sin embargo en la literatura no existen estudios que describan esto.

Otra cosa que nos impide definir si en realidad es un fenómeno de rechazo tanto en los injertos liofilizados como los criopreservados que se mantuvieron viables hasta el final del estudio, es el tiempo de evaluación, el cual solo fue de 4 semanas y no quita la oportunidad de valorar ésto, ya que existen reportes que mencionan que en algunos modelos animales los injertos criopreservados durante los primeros meses después de haber sido implantados, sufren de una reacción inflamatoria no específica, caracterizada por una infiltración de macrófagos, la cual concluye con una colonización de fibroblastos y trombos^{88,90,94} por lo que se puede pensar que a largo plazo, quizá se presente este fenómeno en las arterias pulmonares liofilizadas.

11.- CONCLUSIONES

Con base en lo anterior se puede concluir:

- El perro es un modelo experimental adecuado para la realización de técnicas quirúrgicas en las que se coloquen injertos en la arteria pulmonar, ya que permite una evaluación clínica, radiográfica, angio y ecocardiografica, así como macroscópica y microscópica, similar a la que se lleva a cabo en medicina humana para valorar el estado de las prótesis utilizadas para la reparación de enfermedades que afectan la arteria pulmonar.

- La liofilización es una técnica de preservación de tejidos que mantiene mejor que la criopreservación, la arquitectura normal y funcionalidad de las arterias pulmonares caninas después de su preservación, así como cuando son rehidratadas o descongeladas.

- La liofilización y la criopreservación evitan la proliferación de agentes infecciosos en las arterias pulmonares preservadas y facilitan su almacenamiento, lo que permite tener disponibles segmentos de la misma cuando es necesario.

- Las arterias pulmonares caninas liofilizadas o criopreservadas permiten mantener la continuidad de la misma cuando son utilizados como injertos para la sustitución de un segmento de este vaso, ya que poseen fácil manejo quirúrgico (similar al de un vaso sanguíneo sano), buena capacidad hemostática y muestran buena respuesta hemodinámica en el posoperatorio inmediato.

- El trauma quirúrgico producido durante la realización de la toracotomía y la manipulación del pulmón son los responsables de la producción de adherencias.

- Tanto las arterias pulmonares liofilizadas como las criopreservadas tienen buena integración y cicatrización con la arteria nativa.

- Las arterias pulmonares liofilizadas son menos trombogénicas que las criopreservadas y mantienen las presiones y resistencias vasculares pulmonares dentro de sus valores normales.

- La ausencia de signos clínicos de hipertensión pulmonar severa en los animales en los que el injerto pulmonar criopreservado se obstruyó, se debió, a que el pulmón contralateral compensó la función del pulmón afectado y el tiempo de estudio fue muy corto.
- La pérdida del endotelio durante la criopreservación favorece la respuesta inflamatoria de la íntima, formación de una neoíntima, destrucción de las células endoteliales, cambios fibróticos en la matriz extracelular de los injertos y formación de trombos.
- En este estudio solo se valoró la factibilidad de la liofilización y la criopreservación para tener disponibles arterias caninas para ser utilizadas como sustitutos de la misma cuando sea necesario. Sin embargo se tienen que realizar más estudios en los que se evalúen los animales a más largo plazo y con la administración de inmunosupresores y estudios bioquímicos complementarios para valorar si la formación de trombos se debe o no a la presencia de rechazo del injerto.

11.- ANEXO I

FIGURAS



FIGURA 1. Fotografía que muestra la forma en la que la arteria pulmonar fue lavada en solución adicionada con antibióticos, antes de ser liofilizada o criopreservada.

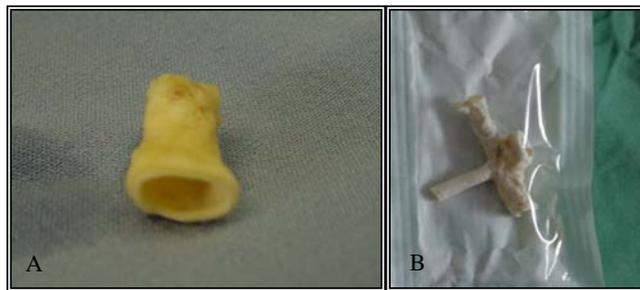


FIGURA 2. A Fotografía que muestra una arteria pulmonar liofilizada. B se observa la arteria pulmonar liofilizada, empaquetada y esterilizada con oxido de etileno para su almacenamiento

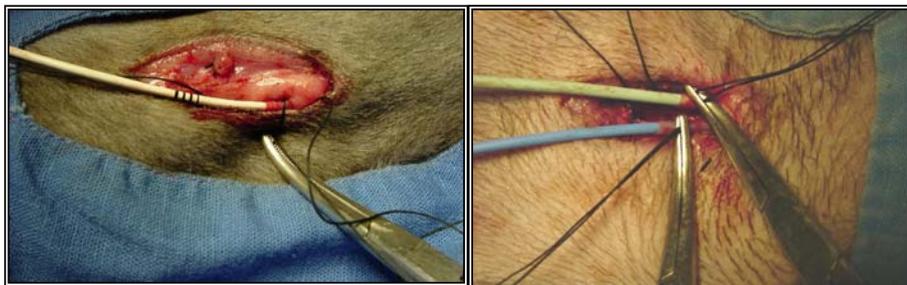


FIGURA 3. Fotografía que muestra la posición en la que fueron colocados los animales después de ser anestesiados, previo a la colocación de los catéteres para la medición de los parámetros hemodinámicos y gasométricos.



FIGURA 4. Fotografía que muestra la disección de la arteria pulmonar izquierda.



FIGURA 5. Fotografía que muestra la resección de la arteria pulmonar izquierda.

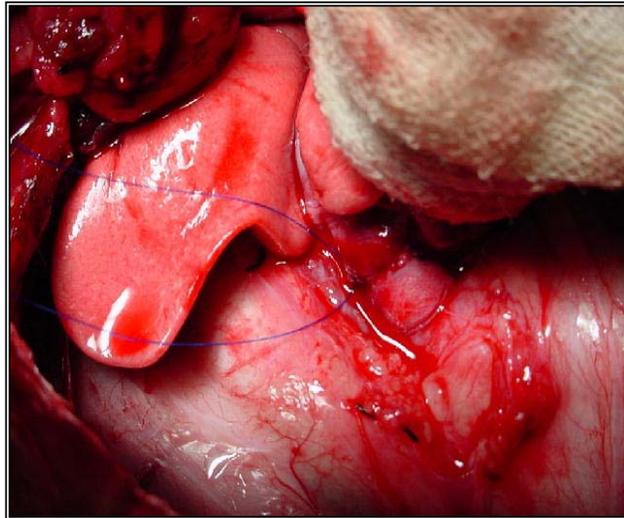


FIGURA 6. Fotografía que muestra la anastomosis de la arteria pulmonar izquierda.

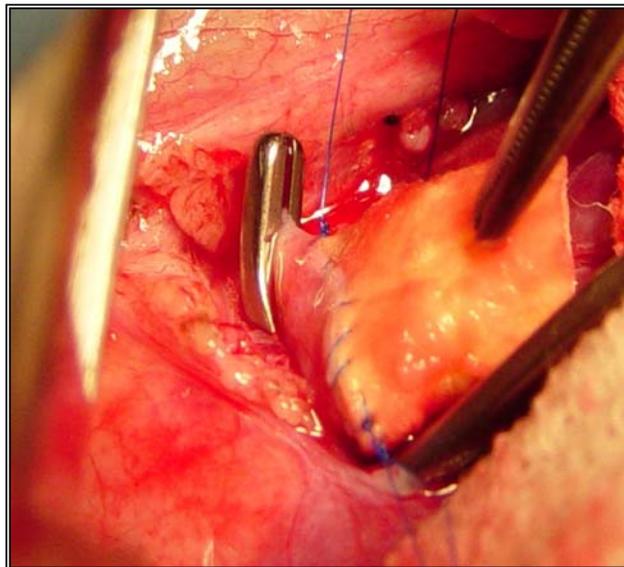


FIGURA 7. Fotografía que muestra la sustitución de la arteria pulmonar izquierda, por un aloinjerto liofilizado.

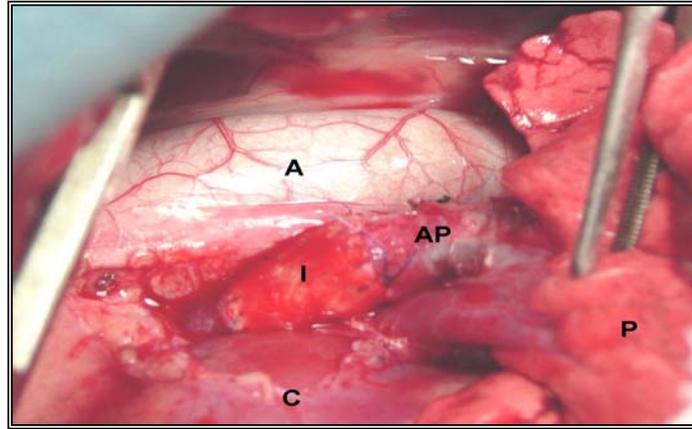


FIGURA 8. Fotografía que muestra la sustitución de la arteria pulmonar izquierda, por un aloinjerto criopreservado. Aorta (A), Injerto (I), Arteria Pulmonar (AP), Corazón (C), Pulmón (P).



FIGURA 9. Placa radiográfica VD, donde se aprecia la cavidad torácica con características anatómicas normales.



FIGURA 10. Angiografía donde se aprecia la Arteria Pulmonar con un flujo de sangre adecuado, indicada con la flecha, perteneciente a un animal del Grupo II.

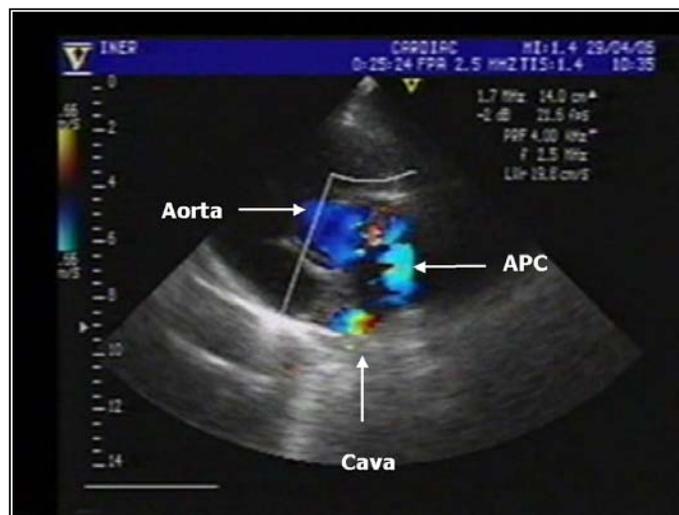


FIGURA 11. Ecocardiografía que muestra el flujo de sangre adecuado de la Arteria Pulmonar Criopreservada (APC), en un animal del Grupo III.

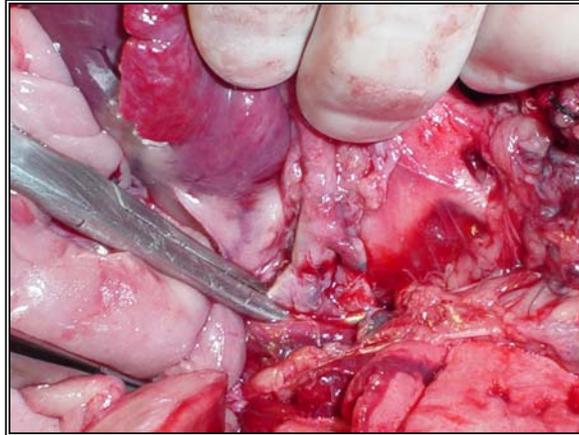


FIGURA 12a. Fotografía de un animal del grupo II con buena cicatrización del injerto al final del estudio.



FIGURA 12b. Fotografía al final del estudio en la que se observa el injerto liofilizado, permeable en su totalidad y sin presencia de trombos.

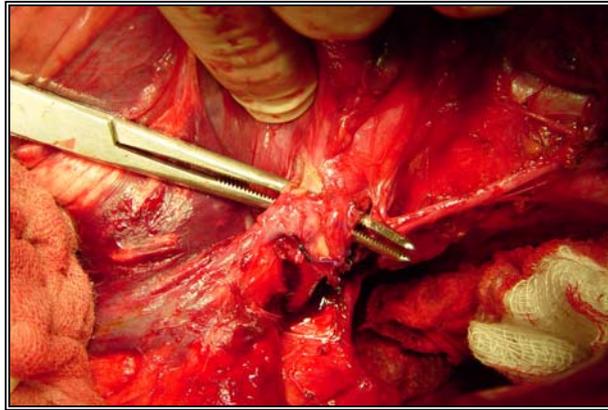


FIGURA 13a. Fotografía que muestra el injerto criopreservado con presencia de adherencias de difícil despegamiento hacia el lóbulo pulmonar craneal izquierdo.

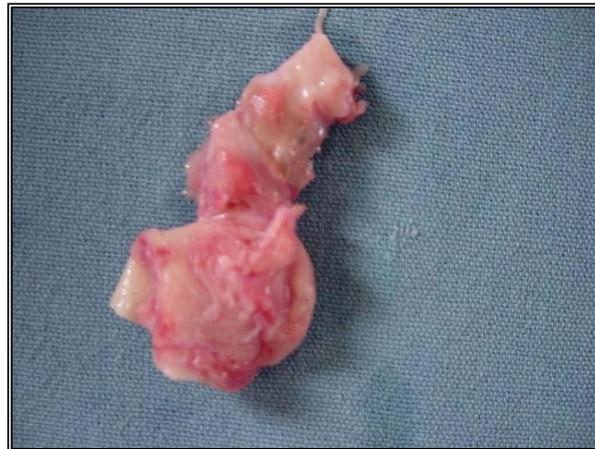


FIGURA 13b. Fotografía tomada al final del estudio de un animal del grupo III, al final del estudio con obstrucción total de la luz, por presencia de tejido fibroso.



FIGURA 14. Microfotografía de arteria pulmonar de un animal del grupo I, muestra alineación horizontal al borde de la lesión (flecha), tricómica de masson (100x)

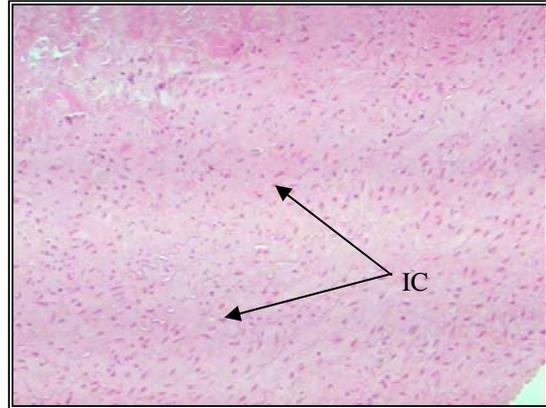


FIGURA 15. Microfotografía de arteria pulmonar de un animal del grupo I, muestra ligero infiltrado celular (IC), H y E (100x)

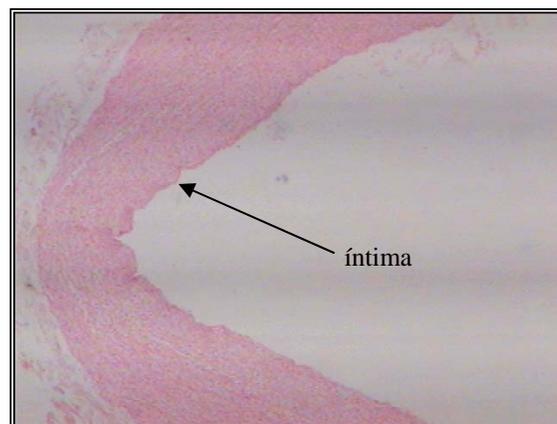


FIGURA 16. Microfotografía de arteria pulmonar de un animal del grupo I, muestra nula proliferación de la íntima, H y E (100x)

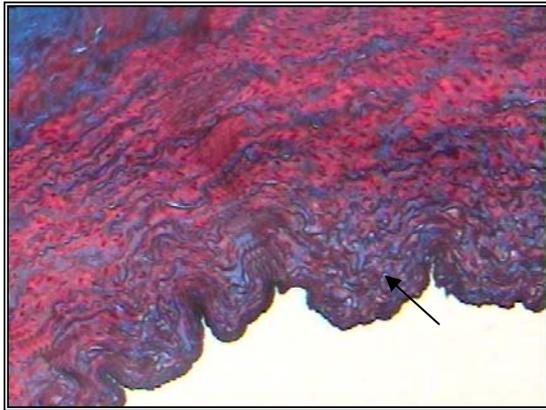


FIGURA 17. Microfotografía de arteria pulmonar liofilizada perteneciente a un animal del grupo II, muestra moderado desarreglo de las fibras de colágeno, tricómica de masson (100x)

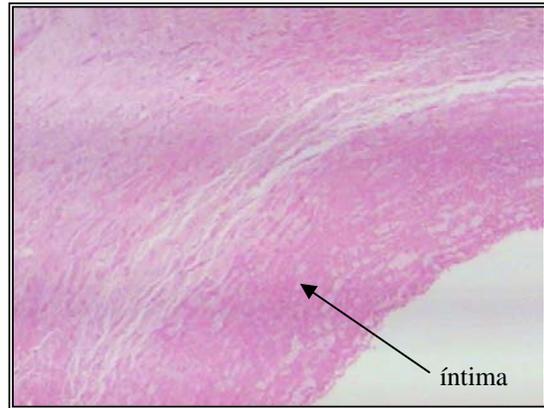


FIGURA 18. Microfotografía de arteria pulmonar liofilizada perteneciente a un animal del grupo II, muestra proliferación intimal, tricómica de masson (100x)

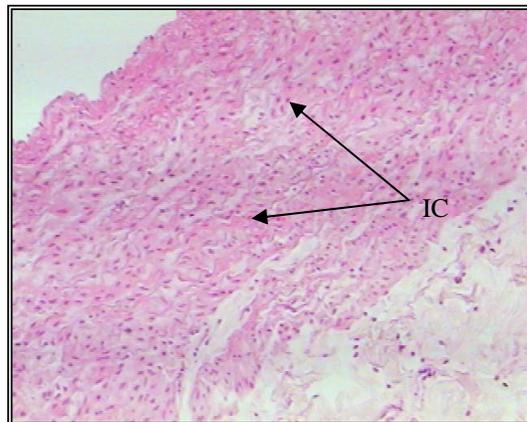


FIGURA 19. Microfotografía de arteria pulmonar de un animal del grupo II, muestra moderado infiltrado celular (IC), H y E (100x)

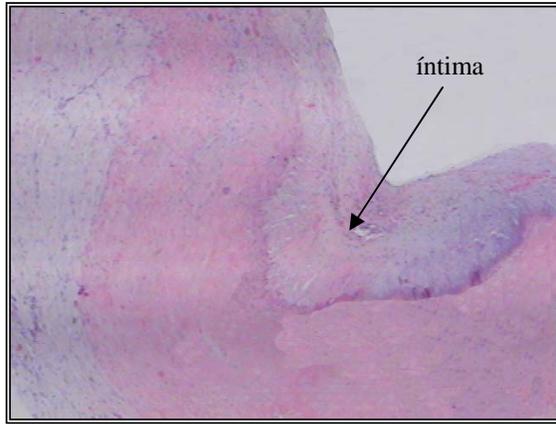


FIGURA 20. Microfotografía de arteria pulmonar criopreservada de un animal del grupo III, muestra hiperplasia abundante de la íntima, HyE (100x)

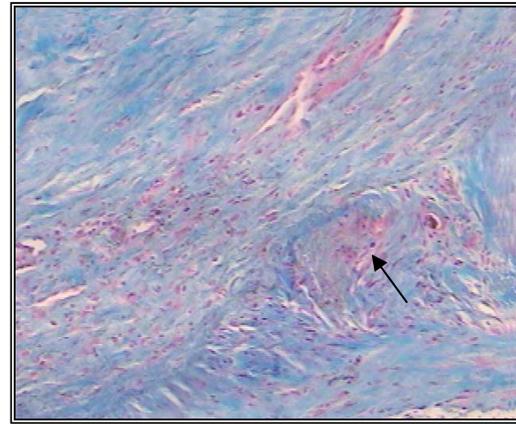


FIGURA 21. Microfotografía de arteria pulmonar criopreservada de un animal del grupo III, muestra desarreglo moderado de las fibras de colágeno (flecha), Tricómica de Masson (100x)

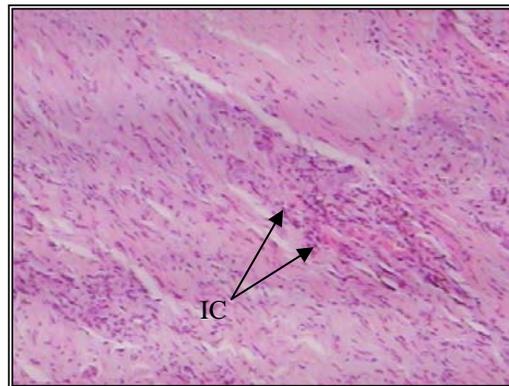
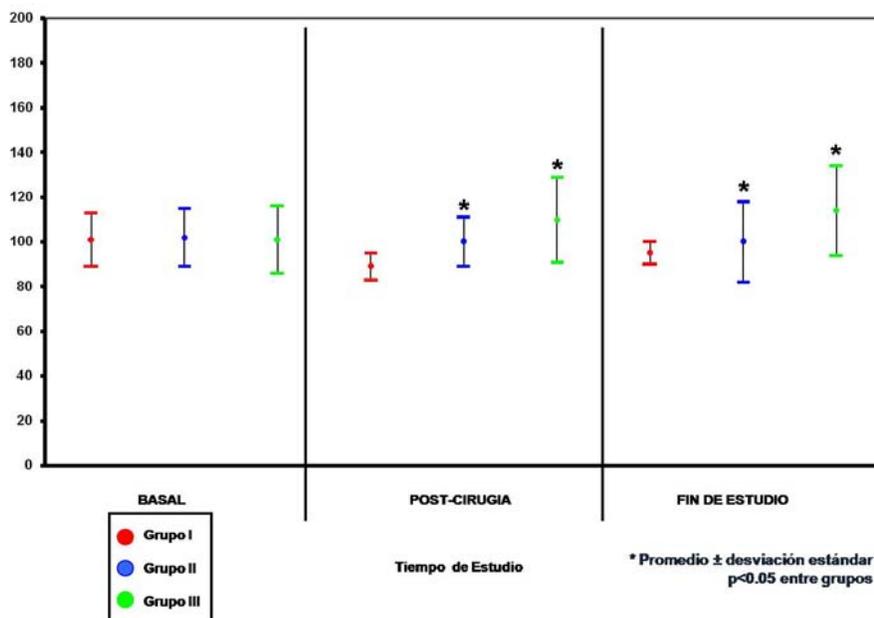


FIGURA 22. Microfotografía de arteria pulmonar criopreservada de un animal del grupo III, muestra presencia de abundantes células inflamatorias, HyE (100x)

12. ANEXO II

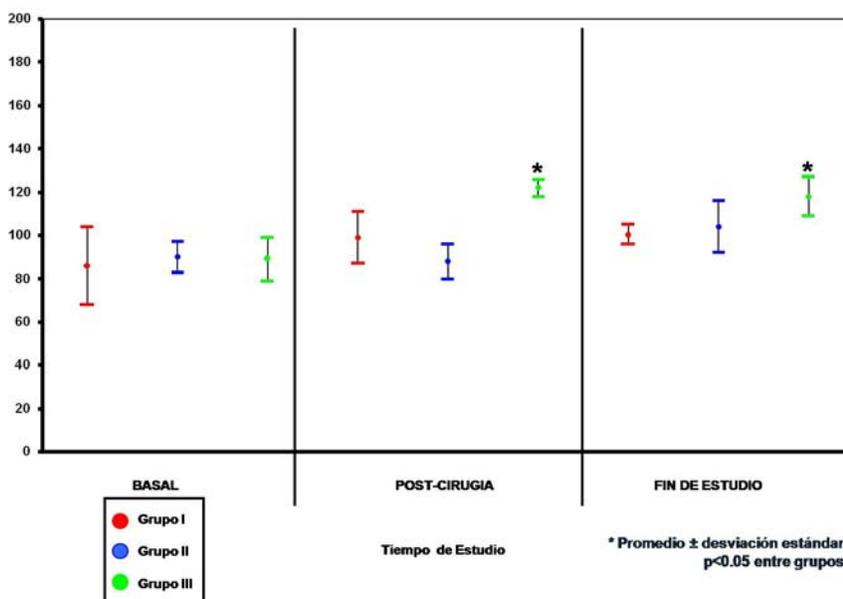
GRÁFICAS

GRÁFICA 1
Presión Arterial Sistémica Sistólica

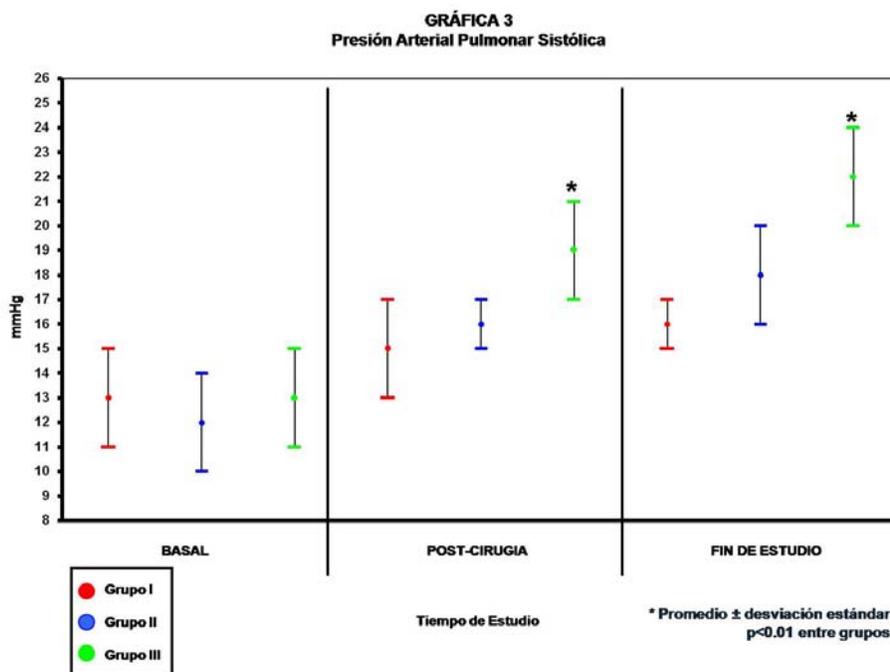


Gráfica 1. Muestra el incremento estadísticamente significativo del Grupo II y III de la presión arterial sistémica sistólica en el post-quirúrgico inmediato y al final del estudio comparados con el Grupo I.

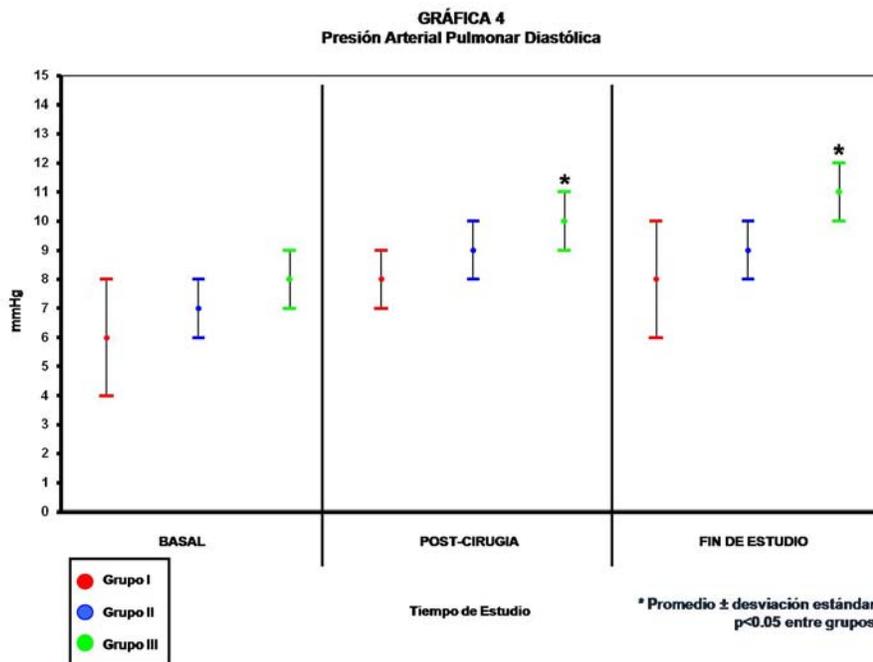
GRÁFICA 2
Presión Arterial Sistémica Diastólica



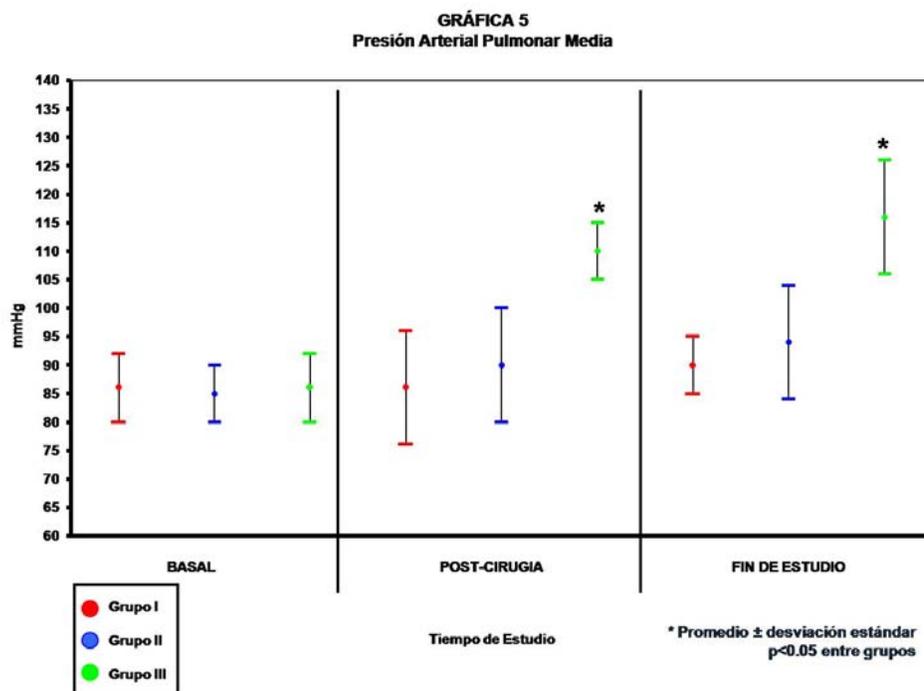
Gráfica 2. Se observa la presión arterial sistémica diastólica, durante las tres fases del estudio en las que fue evaluada, con un incremento estadísticamente en el Grupo III al final del estudio comparado con el Grupo I y II.



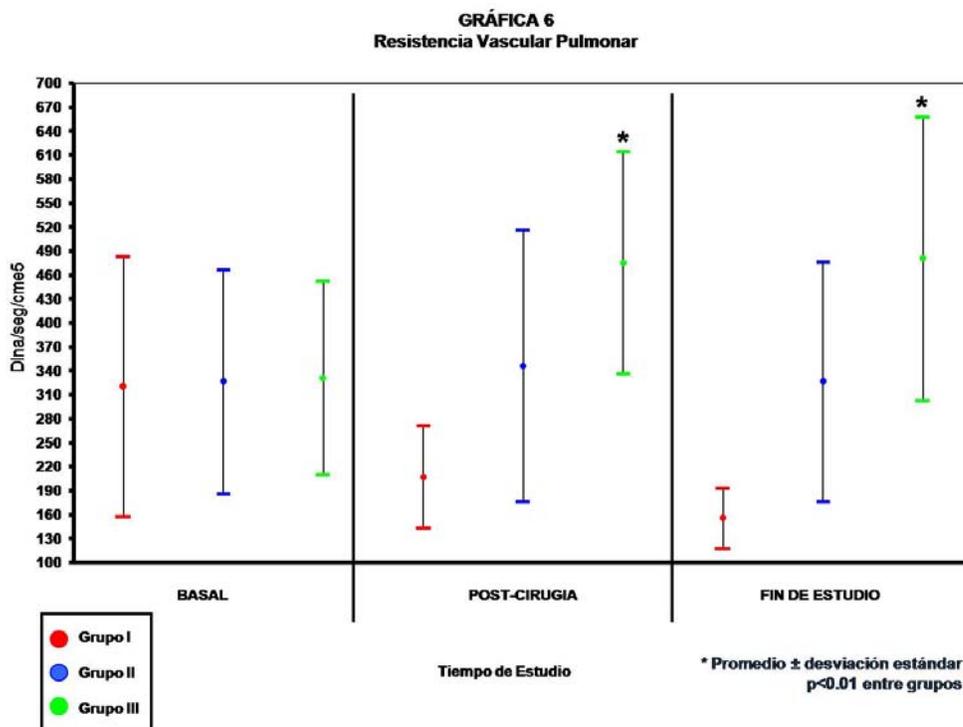
Gráfica 3. Se aprecia el incremento estadísticamente significativo en el Grupo III de la presión arterial pulmonar sistólica al final del estudio en comparación con los Grupos I y II.



Gráfica 4. Muestra el incremento estadísticamente significativo en el Grupo III de la presión arterial pulmonar diastólica al final del estudio en comparación con los Grupos I y II.



Gráfica 5. Se observa el incremento estadísticamente significativo en el Grupo III de la presión arterial pulmonar media al final del estudio en comparación con los Grupos I y II.



Gráfica 6. Se aprecia el incremento estadísticamente significativo en el Grupo III de la resistencia vascular pulmonar al final del estudio en comparación con los Grupos I y II.

4. ANEXO III

HOJA DE REGISTRO

Protocolo: INJERTO DE ARTERIA PULMONAR CRIOPRESERVADA

Fecha cirugía:

Fecha Fin de estudio

No Registro Animal

No Experimento

Peso:

	Basal	Basal	Basal	Post Cirugia	Post Cirugia	Post Cirugia	Fin de Estudio	Fin de Estudio	Fin de Estudio
FC									
PAS									
PAD									
PAM									
PSAP									
PDAP									
PMAP									
Pcuña									
PVC									
GC									
RVP									
RVPi									
RVS									
RVSi									
DavO2									
Qs-Qx									
PaO2									
PaCO2									
ph art									
PvO2									
PvCO2									
ph ven									
SaO2%									
SvO2%									
PIM									
VcxPIM									

Hb _____ FiO2 _____ VC _____ FC _____

15. ANEXO IV

CUADROS

Cuadro 1. Integridad estructural			
GRADO	GRUPOS DE ESTUDIO		
	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
Ausente (0 -10 %)	0	0	0
Escasa (11 – 25 %)	0	0	4
Moderada (26 – 50 %)	0	0	0
Abundante (51 – 100 %)	6	6	2

Cuadro 1. Muestra el porcentaje de la integridad estructural observado histológicamente al final d el estudio en los injertos y anastomosis de arteria pulmonar.

Cuadro 2. Cuantificación de colágena			
GRADO	GRUPOS DE ESTUDIO		
	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
Ausente (0 -10 %)	0	0	0
Escasa (11 – 25 %)	0	3	0
Moderada (26 – 50 %)	6	3	4
Abundante (51 – 100 %)	0	0	2

Cuadro 2. Se observa la cantidad de colágena formada en las anastomosis de los injertos y arteria pulmonar, evaluadas histológicamente cuatro semanas después de haber sido operadas.

Cuadro 3. ORGANIZACIÓN Y DISPOSICIÓN DE FIBRAS DE COLAGENA			
GRADO	GRUPOS DE ESTUDIO		
	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
1	0	0	0
2	0	3	0
3	6	3	4
4	0	0	2

Cuadro 3. Se observa el grado de organización y disposición de las fibras de colágena desarrolladas en la cicatrización de las arterias pulmonares operadas.

Cuadro 4. Inflamación			
GRADO	GRUPOS DE ESTUDIO		
	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
Ausente (0 -10 %)	6	3	0
Escasa (11 – 25 %)	0	1	3
Moderada (26 – 50 %)	0	1	1
Abundante (51 – 100 %)	0	0	2

Cuadro 4. Muestra el porcentaje de inflamación observado histológicamente al final del estudio en las muestras de los injertos y anastomosis de arteria pulmonar.

Cuadro 5. Trombosis de arteria pulmonar			
GRADO	GRUPOS DE ESTUDIO		
	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
Presencia	0	0	2
Ausencia	6	6	4

Cuadro 5. Muestra la formación de trombos observados histológicamente al final del estudio en las muestras de los injertos y anastomosis de arteria pulmonar.

Cuadro 6. Calcificación			
GRADO	GRUPOS DE ESTUDIO		
	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
Ausente (0 -10 %)	6	6	4
Escasa (11 – 25 %)	0	0	0
Moderada (26 – 50 %)	0	0	0
Abundante (51 – 100 %)	0	0	2

Cuadro 6. Muestra el porcentaje de calcificación observado histológicamente al final del estudio en las muestras de los injertos y anastomosis de arteria pulmonar.

16.- REFERENCIAS

- 1.- Latarjet RL. Anatomía Humana. 4ª ed. México: Medica Panamericana, 2004: 1053-1054, 1266-1277.
- 2.- Fernández Tresguerres, J.A. Fisiología humana. Madrid, España: Interamericana McGraw-Hill. 1999: 692-695.
- 3.- Wallace A.G., Wenger NK. The heart arteries and veins. New York, USA: McGraw Hill, 1986.
- 4.- Harrison T. Principles of internal Medicine, Vol II. 15 ed. Madrid, España: Interamericana McGraw-Hill, 2002; 1413.
- 5.- Moore K, Persaud TVN. Embriología Clínica. 6ª ed. México, D.F.: Interamericana McGraw Hill, 1999; 332, 343-345.
- 6.- Berne RM, Levy NM. Control of cardiac output: coupling of the Heart and the blood vessels. In: principles of physiology. 7ª ed. St Louis, USA: C.V. Mosby Company, 1990; 287-299.
- 7.- Guyton A.C. and Hall J.E. Tratado de fisiología. 10ª ed. México: McGraw-Hill, 2001.
- 8.- Universidad Católica de Chile. Apuntes de fisiopatología cardiovascular. Edición 2003. Chile: Departamento de Enfermedades Cardiovasculares, Escuela de Medicina 2003. 17-20.
- 9.- Dorantes S., Taboada C., Paredes R. La sangre y sus funciones. En: Fisiología. Células, órganos y sistemas. 1ra Ed. México, D.F.: Fondo de cultura económica, 1997; 185-231.
- 10.- Milnos WR. Normal circulation function. In Mountcastle V. Medical physiology. San Louis, USA: Ed. Mosby, 1980; 1033-1046.
- 11.- Friedman J.J. Microcirculation. In Selkurt, Physiology. Boston, USA: Little Brown & Company, 1976; 508-547.
- 12.- Visner GA, Staples ED, Chesrown SE, Block ER, Zander DS, Nick HS. Isolation and maintenance of human pulmonary artery endothelial cells in culture isolated from transplant donors. Am J Physiol. 1994; 267 (4 Pt 1): 406-13.
- 13.- Schwartz S, Shires T, Fischer J, Spencer F Gallogay A, Daly FG. Principios de cirugía. Vol I. 7ª ed. México, D.F.: McGraw Hill-Interamericana, 1999; 719-906.
- 14.- Olmos-Zúñiga 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. Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, 2005.

15.- Dennis DC. Non-cardiac surgical diseases of the thorax. The veterinary clinics of north america. Small animal practice 1987; 17: 398-400.

16.- Cerfolio R, Danielson G, Warnes C, Puga FJ, Scaf H, Anderson B, Ilstrup D. Results of fan autologous tissue reconstruction for replacement of obstructed extracardiac conduits. J Thor Cardiovasc Surg. 1995; 110: 1359-1368.

17. Octavio Narváez Porrás, Lillíán Reveles Zavala, Héctor Ismael Serna Secundino. Fibromixosarcoma de la arteria pulmonar. (Reporte de un caso). Rev Inst Nal Enf Resp 2002; 15 (4): 234-238.

18. Julio Pereira, José M Olivera, Pilar Durána, José M Mesa, José A Sobrinoa. Sarcoma primario de arteria pulmonar: diagnóstico mediante ecocardiograma transtorácico y transesofágico. Rev Esp Cardiol. 2000; 53: 142-144.

20. Juan Carlos Palma Nieto, Claudia Sciaccaluga Morelli, Joaquín Antón Martínez, Víctor Manuel Ramos del Amo. Aneurisma de la arteria pulmonar. Rev Esp Cardiol 1999; 52 (2).

21. Obon Azuara, B., Ferrer Gracia, M. C., Daga Calejero, B. *et al.* Aneurisma de arteria pulmonar izquierda. An. Med. Interna 2004, 21 (10).

22. Roca Torrent, J., Ruiz Manzano J. Enfermedades vasculares del pulmón. Tromboembolia Pulmonar. En Farreras-Rozman. Medicina Interna. 14.^a Edición. Madrid: Harcourt, 2000:954-968.

23.- Agarwal KC, Edwards WD, Feldt RH, Danielson GK, Puga FJ, McGoo DC. Clinicopathological correlatos of obstructed right-sided porcine valve extracardiac conduits. J Thorac Cardiovasc Surg. 1981; 81:591-601.

24.- 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.

25. Leonardo José Reyes, MD, Victor Monforte, MD, Carlos Bravo, MD, Joan Sole, MD, Mercedes Canela, MD, Antonio Román, MD, Ferran Morell, MD. Trombosis fatal de las venas pulmonares como complicación precoz post trasplante de pulmón. Revista colombiana de neumología 2002; 14 (1).

26. Ettinger S, Feldman E.C. Textbook of veterinary internal medicine. Vol. II. 4^a ed. USA of América: WB Saunders company, 1995.

27. Kittleson MD, Kienle, R.D. Medicina cardiovascular en pequeños animales. Barcelona España: Multimedica, 2000.

- 28.- Caywood DD, Lipowitz AJ. Surgical approaches and techniques for managing pulmonary disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1987; 17:449-467.
- 29.- Walter PA. Non-neoplastic surgical diseases of the lung and pleura. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1987; 17:359-385.
- 30.- Chanda J., Kuribayashi R and Abe T. New generation valved conduit: an experimental study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1997; 114: 218-223.
- 31.- Mayer JE, Shinoka T and Shumtim D. Tissue engineering of cardiovascular structures. *Curr Opin Cardiol.* 1997; 12: 528-532.
- 32.- Mayer J Jr. Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. *J. Thorac Cardiovasc Surg.* 1998; 115: 536-545.
- 33.- Rendina EA, Venuta F, De Giacomo T, Ciccone AM, Moretti M Ruvolo G and Coloni GF. Sleeve resection and prosthetic reconstruction of the pulmonary artery for lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 995-1002.
- 34.- Hernandez LF, Arango JE y Acosta JM. Pericardio heterólogo como material protésico en cirugía. *Rev Cubana Cardiol Cir Cardiovasc* 1996; 10.
- 35.- Ozawa T, Mickle DA, Weisel R, Koyama N and Ozawa S. Optimal biomaterial for creation of autologous cardiac grafts. *Circulation.* 2002; 106: 176- 191.
- 36.- 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.
- 37.- Zund G, Hoerstrup SP, Schoeberlein A et al. Tissue engineering: a new approach in cardiovascular surgery: seeding of human fibroblast followed by human endothelial cells on resorbable mesh. *Eur J. Cardiothorac Surg.* 1998; 13: 160-164.
- 38.- Bader A, Steinhoff G, Strobl K et al. Engineering of human vascular aortic tissue based on a xenogeneic starter matrix. *Transplantation.* 2000; 70: 7-14.
39. Thomas A. Jennings, Lyophilization Introduction and Basic Principles. USA: Interpharm/CRC, 1999.
40. Sostres-Vega, Villalba-Caloca, Jasso-Victoria, Santillán, *Journal of Investigative Surgery*, 19:125-135, 2006.
41. Ohkado A, Hachida M, Hoshi H et al. Problems in preservation of allogenic heart valves and vessels. *Transplantation proceedings.* 1999; 31:2047-2048.
- 42.- Molina JE, Edwards J, Bianco R, Crack R, Rasmussen T, Moss G, et al Growth of fresh-frozen pulmonary allograft conduit in growing lambs. *Circulation* 1989; 80: (suppl 1): 183-190.

- 43.- Kirklin JK, Smith D, Novick W, Naftel DC, Kirklin JW, Pacifico A, et al. Long term function of cryopreserved aortic homografts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993; 106:154-166.
44. Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Estados Unidos Mexicanos. AFÍA. Diario Oficial de la Federación 6 dic, 1999.
- 45.- 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. National Institutes of Health U.S.A. Edición Mexicana Auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. México, D.F. 2002.
46. 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; 1996 october. Muenster, Germany. Academy of Surgical Research, 1996.
47. American Thoracic Society. Task Group on Screening For Respiratory Disease in Occupational Settings. *Am Rev Respir Dis.* 1982, 126: 952-56.
48. Veiga A, Rendal M, Matheu G, Andión C. Sánchez J, Segura R, Filgueira P, Pérttega S, Rodríguez M, Fernández R, Bermúdez T. Cambios histopatológicos en arterias humanas sometidas a procesos de isquemia fría y criopreservación. *Angiología* 2004; 56: 97-105.
49. Dalmau MJ, Cánovas M, Bueno M, Hornero F, Gil O, García R, Montero JA. Injertos arteriales. Nuestra experiencia en la revascularización miocárdica. *Cir Cardiovasc.* 2002; 9: 221-225.
50. Shinoka T, Shum D., X Ma P, Tanel R, Isogai N. Langer R. Vacanti J and Mayer J. Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998; 115: 536-546.
51. Faggioli G, Ricotta J. Cryopreserved vein homograft for arterial reconstruction. *Eur J Vasc Surg.* 1994; 8: 666-669.
52. Mayer JE Jr. Uses of homograft conduits for ventricle to pulmonary connection in the neonatal period. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 1995; 7: 130-132.
53. Hopkins RA. Tissue engineering of Herat valves. Decellularized Valve Scaffolds. *Circulation.* 2005; 111: 2712-2714.

54. Herreros JM, Mastrobuoni S, Ubilla M, Rábago G, Lorente Ruiz M, Rifón J, Hernández M. Trasplante de homoinjertos valvulares cardiacos y vasculares. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2006; 29 (Supl 2): 153-161.
55. Miro L. Injertos biológicos en la cirugía de las cardiopatías congénitas. *Anal Cir Card y Vasc.* 2002; 8:176-182.
56. Schamún C, Durán JC, González F, Rodríguez J.M., Santos V. Fiorini D. Creación de un banco de homoinjertos en el Instituto de Corazón. *Rev Arg de Cir Cardiovasc.* 2004; 2: 85-91.
57. Zhou W, Lin PH, Bush RL, Terramani T, Matsuura JH, Cox M, Peden E, Guerrero M, Silberfin E, Dardik A, Rosenthal D, Lumsden A. In situ reconstruction with cryopreserved arterial allografts for management of mycotic aneurysms or aortic prosthetic grafts infections: a mul-institutional experience. *Tex Heart Inst J.* 2006; 33: 14-18.
58. Rey L. Basic Aspects and Future Trenches in the Freeze-Drying of Pharmaceuticals. *Dev Biol Stand* 1992; 74:3-8.
59. Rosental CF, Micheli DC, Mori A, Schwint O, Vogelfang H, Capelli H. Homoinjertos en posición pulmonar: complicaciones posteriores al año del implante. *Rev. Arg Card.* 2002; 70: 457-462.
60. Tidholm A. Retrospective study of congenital heart defects in 151 dogs. *J Small Anim Pract,* 1997;38:94-98.
61. Bussadori C, DeMadron E, Santilli R. Balloon valvuloplasty in 30 dogs with pulmonic stenosis: effect of valve morphology and annular size on initial and 1-year outcome. *J Vet Intern Med,* 2001;15:553-558.
62. Fossum T.W. *Small animal surgery.* USA: Mosby-Year book, 1997.
63. Ristic JME, Baines EA, Hertage ME. Congenital pulmonic stenosis, a retrospective study of 24 cases seen between 1990-1999. *Vet Cardiol* 2001;3: 13-19.
64. Fernández MJ, Talavera J, Bayón A, Albert A. Prevalence of different types of congenital cardiac defects in 80 dogs: retrospective study. *Free Communications Book.* 27 WSAVA Congress, Vol II, 2002:172.
65. Stutzbach PG, Guevara E, Bustamante M, Gómez CB, Pérez de la Hoz R, Torino A, Favaloro R. Cirugía de Ross: Resultados de la metodología de estudio con eco-Doppler. *Rev. Arg Cardiol.* 2002; 70: 108:117.
66. Michel-Cherqui M, Ceddaha A, Liu N. Assessment of systematic use of intraoperative transesophageal echocardiography during cardiac surgery in adults: A prospective study of 203 patients. *J Cardiothorac Vasc. Anesth* 2000; 14: 45-50.

67. Segura RJ, Hernández I, Fernández JC. Disfunción del acceso vascular por estenosis Angiol.2000; 57 (Supl 2): 93-101.
68. Guyton AC. Overview of the circulation, and medical physics of pressure, flow and resistance. En Guyton AC, Hall JE. Medical physiology Philadelphia, 11th ed. USA: WB Saunders, 2005: 150-158.
69. Vázquez JC. Fisiología respiratoria. En Cano F, Ibarra C, Morales J. Enfermedades Respiratorias. Temas Selectos. 1ª ed. Madrid, España: Elsevier, 2006: 29-41.
70. Jaimeson SW, Kapelanski DP, Sakahibara N. Pulmonary endarterectomy: experience and lessons learned in 1500 cases. Ann Thorac Surg. 2003; 76: 1457-1464.
71. Moser KM, Auger WR, Fedullo PF. Chronic major vessel thromboembolic pulmonary hypertension. Circulation. 1990; 81: 1735-1743.
72. Rosa MJ, Campos R, Morales J. Clasificación clínica de la hipertensión arterial pulmonar. Neumo Cir Tor. 2006; 65 (Suppl 4): 19-27.
73. McNeil K, Dunning J, Marrell NW. The pulmonary circulation and right ventricular failure in the ITU. Thorax 2003; 58:157-162.
74. Wood K. Major Pulmonary Embolism : Review of a Pathophysiologic Approach to the Golden Hour of Hemodynamically Significant Pulmonary Embolism. Chest, 2002; 121: 877 - 905.
75. Espinosa G. Pleurodesis Química (Tesis de Licenciatura). México, DF: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 1996.
76. Anderson WA and Scotti TM. Synopsis of Pathology. 10th ed. St. Louis Missouri, USA:C. V. Mosby Company, 1985.
- 77 Olmos JR, Jasso R, Sotres A, Gaxiola O, Argote LM, Lara H, Santillan P. Evaluación de la utilidad del pericardio bovino en resecciones pulmonares no anatómicas en perros. Rev Invest Clin. 2002, 54: 334-341.
78. Kadoba K. Sawatari K, Jonas RA. Mechanical failure of pulmonary homografts at systemic pressure. J am Coll Cardiol. 1990; 15: 78A
- 79 Simeón JM, Serrano M, Mirallesc A, Riera S,Hernández E, Cairols MA, Capdevila JM. Homoinjertos arteriales criopresevados: experiencia clínica durante tres años. Angiol. 1998; 5:215-222.
80. Botney MD. Role of hemodynamics in pulmonary vascularremodeling. Implications for primary pulmonary hypertension. Am J Resp Crit Care Med. 1999; 159: 361-364.

81. Cleveland DC, Williams W, Razzoud AJ, Trusler GA, Rebeyka IM, Duffy L, Kan Z. Failure of cryopreserved homograft valved conduits in pulmonary circulation. *Circulation* 1992; 86 (suppl 2):150-153.
82. Sotres A, Olmos JR, Jasso R, Gutiérrez LM, Franco A, Santillán P. Arterias caninas preservadas como material didáctico para la realización de anastomosis vasculares. *Rev. Inst Nal Enf Res.* 2002; 15 (2): 78-83.
83. Jasso R, Olmos R, Gutierrez LM, Sotres A, Manjarez JR, Gaxiola M, Avila A, Avendaño G, Santillan P. Usefulness of bovine pericardium as interpositional graft in the surgical repair of nasal septal perforations (Experimental study). *J Invest Surg.* 2003; 16: 209-217.
84. Pegg DE, Wusteman MC, Boylan S. Fractures in cryopreserved elastic arteries. *Cryobiology* 1997; 34: 183-192
85. Herreros JM, Mastrobuoni S, Ubilla M, Rábago G, Lorente Ruiz M, Rifón J, Hernández M. Trasplante de homoinjertos valvulares cardiacos y vasculares. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2006; 29 (Supl 2): 153-161.
86. Veiga A, Rendal ME, Matheu G, Andino C, Sánchez J, Segura RJ, Filgueira P, Pértiga S, Rodríguez M, Fernández RO, Bermúdez T, Fiaño V, Vázquez M, Vázquez E. Cambios histopatológicos en arterias humanas sometidas a procesos de isquemia fría y criopreservación. *Angiol.* 2004; 56: 97-105.
87. Kirklin JK, Smith D, Novick W, Naftel DC, Kirklin JW, Pacifico A. Long-term function of cryopreserved aortic homografts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993; 106: 154-166.
88. Sayk F, Bos I, Schubert U, Wedel T, Sievers HH. Histopathologic Findings in a Novel Decellularized Pulmonary Homograft: An Autopsy Study. *Ann Thorac Surg.* 2005; 79: 1758-1760.
89. Molina JE, Edwards J, Bianco R, Clack R, Rasmussen T, Moss G. Growth of fresh-frozen pulmonary allograft conduit in growing lambs. *Circulation.* 1989; 80 (Suppl I): 183-190.
90. N. Solanes, M. Rigol, M. Castellà, E. Khabiri, J. Ramírez, J. Segalés, M. Roqué, E. Agustí, F. Pérez-Villa, E. Roig, J.L. Pomar, G. Sanz, and M. Heras. Cryopreservation Alters Antigenicity of Allografts in a Porcine Model of Transplant Vasculopathy. *Transplantation Proceedings* 2004; 36: 3288-3294.
91. Goffin YA, Narine KR, Alexander J-P, Van Goethem J, Daenen WJ. Histopathologic comparison of a pulmonary autograft and pulmonary homograft in a patient 17 months after a Ross procedure: an autopsy study. *J Heart Valve Dis* 1998;7:327-30.

92. Clarke DR, Bishop DA. Allograft degeneration in infant pulmonary valve allograft recipients. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993;7:365-70.
93. Mitchell RN, Jonas RA, Schoen FJ. Pathology of explanted cryopreserved allograft heart valves: comparison with aortic valves from orthotopic heart transplants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:118-27.
94. Elkins RC, Goldstein S, Hewitt CW, Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001;13:87-92.