



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

*“EXPRESIÓN DE CASPASA-3 Y CAMBIOS  
MICROSCÓPICOS EN EL CARTÍLAGO DE  
SEGMENTOS TRAQUEALES  
LIOFILIZADOS Y UTILIZADOS COMO  
BIOPRÓTESIS EN REPARACIÓN QUIRÚRGICA”*

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**JUAN ANTONIO MORALES TIBURCIO**



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dra. María del Carmen Durán Domínguez

Vocal: M. en C. Aída Navas Pérez

Secretario: Dra. Avelina Sotres Vega

1er. Suplente: Dr. Óscar Armando Pérez Méndez

2do. Suplente: M. en C. Mario Adán Moreno Eutimio

Sitio donde se desarrolló el tema:

Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER).

Asesor del tema:  
Dra. Avelina Sotres Vega

---

Supervisor técnico:  
Dr. José Alfredo Santibáñez Salgado

---

Sustentante:  
Juan Antonio Morales Tiburcio

---

## ***Agradecimientos***

A Dios por su gran bendición, ya que me permitió los medios para llevar a buen termino este trabajo de tesis.

A mi mamá Sra. Juana Tiburcio Sierra (vochito) por su comprensión, apoyo, cariño, consejos, cuidados y atenciones. Muchísimas gracias.

A mi papá Antonio y mis hermanos Estela, Karina y Alejandro, por su apoyo y comprensión, pero sobre todo por que se que cuento con ustedes.

A la Dra. Avelina Sotres Vega, por su tiempo, paciencia, comprensión y enseñanzas académicas y también valores como la honestidad, la entereza y la perseverancia.

Al Dr. Jaime Villalba, Lourdes Espinoza, Matilde Baltazares y Alfredo Santibáñez por su apoyo, palabras de aliento y motivación.

A la Dra. Carmen Durán, M. en C. Aída Navas, Dr. Óscar Pérez y M. en C. Adán Moreno por su tiempo, consejos y observaciones.

A Lupita Iriart, Erika Monterrubio, Miguel Gaxiola, Sergio y Beto por las facilidades brindadas.

A mi compañera pero también amiga Miriam Mendoza, pues contribuyo a darme cuenta que la recreación-responsabilidad es de las mejores combinaciones.

A la máxima casa de estudios del país Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por abrirme sus puertas y brindarme el conocimiento, a través de su gente, para consolidarme como profesional de la Química.

Este proyecto se realizó en la Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” bajo la dirección y asesoría de los investigadores en Ciencias Médicas: Dra. Avelina Sotres-Vega, Dr. Alfredo Santibáñez-Salgado, Dr. Jaime Villalba-Caloca, Q.F.B. Matilde Baltazares-Lipp y Dr. Miguel Gaxiola-Gaxiola.

## ÍNDICE

Relación de figuras .....	viii
Relación de tablas .....	xii
Glosario .....	xiv
Resumen .....	xviii
<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Anatomía del aparato respiratorio .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Tráquea .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.1. Fisiología .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.2. Irrigación .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.3. Histología .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.3.1. Mucosa .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.3.2. Submucosa .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.3.3. Cartílago hialino .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.3.4. Adventicia .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3. Complicaciones traqueales .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4. Liofilización .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5. Trasplante .....</b>	<b>15</b>
<b>1.6. Apoptosis .....</b>	<b>16</b>
<b>1.6.1. Fase de iniciación .....</b>	<b>17</b>
<b>1.6.2. Fase de ejecución .....</b>	<b>17</b>
<b>1.6.3. Fase de eliminación .....</b>	<b>20</b>
<b>1.6.4. Técnicas para determinar apoptosis .....</b>	<b>21</b>
<b>1.7. Tinciones histológicas .....</b>	<b>23</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>26</b>

<b>3.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>28</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>4.1.</b>	<b>Objetivo general</b>	<b>29</b>
<b>4.2.</b>	<b>Objetivos particulares</b>	<b>29</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>30</b>
<b>5.1.</b>	<b>Recursos</b>	<b>30</b>
<b>5.2.</b>	<b>Animales de experimentación</b>	<b>30</b>
<b>5.3.</b>	<b>Criterios de inclusión</b>	<b>30</b>
<b>5.4.</b>	<b>Criterios de exclusión</b>	<b>30</b>
<b>5.5.</b>	<b>Consideraciones éticas</b>	<b>30</b>
<b>5.6.</b>	<b>Técnica quirúrgica / Procuración de la tráquea</b>	<b>31</b>
<b>5.7.</b>	<b>Obtención de los segmentos traqueales</b>	<b>32</b>
<b>5.8.</b>	<b>Preparación del anillo traqueal pre-preservación</b>	<b>33</b>
<b>5.9.</b>	<b>Liofilización de los segmentos traqueales</b>	<b>33</b>
<b>5.10.</b>	<b>Obtención del anillo traqueal post-preservación</b>	<b>34</b>
<b>5.11.</b>	<b>Obtención del anillo traqueal pos-trasplante / Fin del estudio</b>	<b>35</b>
<b>5.12.</b>	<b>Técnica quirúrgica del receptor</b>	<b>35</b>
<b>5.13.</b>	<b>Evaluaciones de los segmentos traqueales</b>	<b>36</b>
<b>5.13.1.</b>	<b>Macroscópica</b>	<b>36</b>
<b>5.13.2.</b>	<b>Microscópica</b>	<b>36</b>
<b>5.13.2.1.</b>	<b>Cartílago hialino</b>	<b>36</b>
<b>5.13.2.2.</b>	<b>Estudio histológico</b>	<b>38</b>
<b>5.13.2.3.</b>	<b>Estudio inmunohistoquímico de caspasa-3</b>	<b>38</b>
<b>5.13.2.4.</b>	<b>Técnica inmunohistoquímica para determinar caspasa-3</b>	<b>39</b>
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>42</b>
<b>6.1.</b>	<b>Generales</b>	<b>42</b>

<b>6.2.</b>	Evaluación macroscópica del segmento traqueal .....	42
<b>6.3.</b>	Cartílago hialino .....	44
<b>6.3.1.</b>	Evaluación macroscópica pre-liofilización y post-liofilización (n=18 segmentos traqueales) .....	44
<b>6.3.2.</b>	Evaluación microscópica pre-liofilización, post-liofilización y de fin del estudio (n=6 segmentos traqueales) .....	51
<b>6.3.3.</b>	Integridad y degeneración celular .....	57
<b>6.3.4.</b>	Tinción con hematoxilina-eosina .....	61
<b>6.3.5.</b>	Tinción tricrómica de Masson .....	63
<b>6.3.6.</b>	Epitelio: Tinciones con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson .....	63
<b>6.3.7.</b>	Fibras de colágena y de músculo liso: Tinciones con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson .....	65
<b>6.3.8.</b>	Evaluación de caspasa-3 .....	65
<b>6.3.9.</b>	Tiempo de sobrevida .....	66
<b>7.</b>	DISCUSIÓN .....	67
<b>8.</b>	CONCLUSIONES .....	72
<b>9.</b>	PERSPECTIVAS .....	74
<b>10.</b>	REFERENCIAS .....	75

## Relación de figuras

Figura 1.	Aparato respiratorio y zona de intercambio gaseoso .....	1
Figura 2.	Imagen de la tráquea en donde se ilustra un corte transversal de uno de los anillos cartilagosos .....	2
Figura 3.	Epitelio traqueal visto al microscopio óptico (Tinción aminoetilcarbazol-hematoxilina) (Imagen, Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental, INER) .....	4
Figura 4.	Glándulas en la submucosa de la tráquea vistas al microscopio óptico (Tinción tricrómica de Masson, 40X) (Imagen, Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental, INER) .....	4
Figura 5.	Cartílago hialino visto al microscopio óptico (Tinción tricrómica de Masson, 10X) (Imagen, Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental, INER) .....	6
Figura 6.	Condrocitos en el cartílago hialino vistos al microscopio óptico (Tinción con hematoxilina-eosina, 40X) (Imagen, Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental, INER) .....	6
Figura 7.	Condrocitos vistos al microscopio óptico (Tinción con hematoxilina-eosina, 40X) (Imagen, Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental, INER) .....	9
Figura 8.	Histología traqueal (Tinción tricrómica de Masson, 2.5X) (Imagen, Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental, INER) .....	9
Figura 9.	Estenosis traqueal .....	11
Figura 10.	Obstrucción de la luz traqueal por carcinoma adenoide quístico; tumoración traqueal .....	11
Figura 11.	Reducción de la luz traqueal por linfopitelioma; tumoración traqueal .....	11
Figura 12.	Ingeniería de tejidos .....	11

Figura 13.	Vía del receptor de muerte (extrínseca) y vía mitocondrial (intrínseca) de la apoptosis, FasL=Ligando de Fas, Fas=Miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral que se expresa sobre la superficie de los linfocitos T, FADD=Fas asociado a proteína con dominio de muerte, proteínas sólo BH3=proteínas que detectan de diversos agentes estresantes y también se pueden unir a diversas proteínas pro-apoptóticas como Bak y Bax y a diversas proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, regulando sus funciones, Bcl-2/Bcl-XL=proteínas anti-apoptóticas, Bax/Bak=proteínas pro-apoptóticas, Bid=proteína pro-apoptótica, Apaf-1=Factor 1 activador de proteasas, CAD=ADNasa activadora de caspasas .....	20
Figura 14.	a) Se observa un canino en posición decúbito dorsal previo a la intervención quirúrgica, además de los aparatos requeridos para registrar los signos vitales del animal, el ventilador y el vaporizador, b) Médicos cirujanos realizando la cirugía sobre el canino .....	31
Figura 15.	Disección de la tráquea .....	32
Figura 16.	Disección fina de la tráquea .....	32
Figura 17.	Segmento traqueal en forma previa a la liofilización .....	32
Figura 18.	Segmento traqueal montado sobre un soporte de polietileno y colocado dentro del matraz Erlenmeyer .....	34
Figura 19.	Liofilizadora Labconco .....	34
Figura 20.	Dispositivo montado en la Liofilizadora .....	34
Figura 21.	Segmento traqueal liofilizado, empaquetado y esterilizado listo para su rehidratación y utilización como bioprótesis en reparación quirúrgica .....	34
Figura 22.	Presentación del segmento traqueal liofilizado .....	35
Figura 23.	Resección y disección del segmento traqueal nativo para la colocación del segmento traqueal liofilizado y rehidratado .....	35

Figura 24.	Reemplazo traqueal concluido .....	35
Figura 25.	Anillo de cartílago traqueal en donde se realizó el conteo celular a lo largo de éste, las zonas encerradas en un círculo: extremo izquierdo, región central y extremo derecho, fueron tomadas en cuenta para evaluar el comportamiento de la integridad y degeneración celular .....	37
Figura 26.	Se muestran las cinco morfologías celulares analizadas en los anillos de cartílago traqueal .....	37
Figura 27.	Zonas del cartílago traqueal consideradas para la evaluación microscópica .....	38
Figura 28.	Condrocitos sin expresión de caspasa-3 en el cartílago traqueal (control negativo) .....	39
Figura 29.	Condrocitos con expresión positiva de caspasa-3 (condrocitos de color marrón) .....	39
Figura 30.	Evaluación macroscópica del segmento traqueal a) Inmediatamente después de ser procurado y lavado con solución glucosada, b) Durante el procedimiento de la liofilización, en donde se empiezan a observar cambios en la textura, consistencia y coloración (zonas blancas), c) Post-liofilizado, se observan los cambios en la textura, consistencia y coloración del segmento traqueal, d) Post-liofilizado / rehidratado / pre-trasplante, permanecen los cambios en la coloración y e) Aspecto que presentaron los segmentos traqueales necrosados .....	43
Figura 31.	Gráfica de los porcentajes promedio de las diferentes morfologías celulares evaluadas, en forma previa y posterior a la liofilización de los segmentos traqueales (pre y post - liofilización n=18 anillos), en todos los parámetros evaluados (ANDEVA: p<0.05) .....	50
Figura 32.	Gráfica de los porcentajes promedio de las diferentes morfologías celulares evaluadas, en forma previa y posterior a la liofilización, así	

	como al finalizar el estudio de los segmentos traqueales (pre y post-liofilización n=6 anillos, fin del estudio n=1 anillo) .....	55
Figura 33.	Gráfica del porcentaje de condrocitos sin y con alteraciones, analizados en los extremos derecho e izquierdo y en la región central de los anillos de cartílago, pre y post-liofilización .....	58
Figura 34.	Gráfica del porcentaje de condrocitos sin y con alteraciones, analizados en los extremos derecho e izquierdo y en la región central de los anillos de cartílago, pre y post-liofilización, así como al finalizar el estudio .....	60
Figura 35.	Resultados de la evaluación de la tinción con hematoxilina-eosina en los anillos de cartílago .....	63
Figura 36.	a) Tricrómica de Masson (aumento 40X), epitelio respiratorio conservado (pre y post-liofilización), b) Hematoxilina-eosina (aumento 40X), mínimo desprendimiento epitelial (pre y post-liofilización), c) Tricrómica de Masson (aumento 10X), glándulas en la submucosa conservadas (pre-liofilización) y d) Tricrómica de Masson (aumento 40 X), destrucción glandular por efecto de las condiciones de liofilización estudiadas .....	64
Figura 37.	a) Tricrómica de Masson (aumento 25X), fibras de colágena en la submucosa (pre-liofilización), b) Tricrómica de Masson (aumento 10X), fibras de músculo liso en la adventicia (pre-liofilización), c) Tricrómica de Masson (aumento 10X), fibras de colágena en la submucosa (post-liofilización) y d) Tricrómica de Masson (aumento 10X), fibras de músculo liso y de colágena en la adventicia (post-liofilización) .....	65
Figura 38.	Gráfica del tiempo de sobrevida para cada uno de los animales a los que se les practicó una reparación quirúrgica utilizando un segmento traqueal liofilizado de 10 anillos de longitud .....	66

## Relación de tablas

Tabla 1.	Temperatura de seguridad y tiempo de liofilización de algunos materiales .....	13
Tabla 2.	Se presentan los valores de los porcentajes de las cuatro evaluaciones realizadas en los 18 segmentos traqueales, 18 anillos de cartílago previos a la liofilización y 18 anillos de cartílago posteriores a la liofilización .....	44
Tabla 3.	Se presentan los valores de los promedios de cada uno de los 18 anillos de cartílago previos a la liofilización y 18 anillos de cartílago posteriores a la liofilización .....	47
Tabla 4.	Porcentajes promedio $\pm$ EE de las diferentes morfologías celulares analizadas, en forma previa y posterior a la liofilización de los segmentos traqueales (n=18 anillos) y su valor de significancia (ANDEVA: $p < 0.05$ ) .....	50
Tabla 5.	Se muestran los valores de los porcentajes de las cuatro evaluaciones realizadas en los 6 segmentos traqueales: 6 anillos de cartílago previos a la liofilización, 6 anillos de cartílago posteriores a la liofilización, así como 1 anillo de cartílago al finalizar el estudio .....	51
Tabla 6.	Se muestran los valores de los promedios de cada uno de los 6 anillos de cartílago previos a la liofilización, 6 anillos de cartílago posteriores a la liofilización y 1 anillo de cartílago al finalizar el estudio .....	53
Tabla 7.	Porcentajes promedio $\pm$ EE de las diferentes morfologías celulares analizadas, en forma previa y posterior a la liofilización de los segmentos traqueales y al finalizar el estudio (pre y post-liofilización: n=6 anillos, fin del estudio: n=1 anillo) .....	55

Tabla 8.	Valores de significancia (p) para cada una de las comparaciones realizadas de las morfologías analizadas, (pre y post-liofilización: n=6 anillos, fin del estudio n=1 anillo, ANDEVA + Tukey: $p < 0.05$ ) ..... 56
Tabla 9.	Porcentaje de condrocitos sin alteraciones y con alteraciones, en los extremos izquierdo y derecho y región central de los anillos de cartílago, pre y post-liofilización, así como su valor de significancia (ANDEVA: $p < 0.05$ ) ..... 57
Tabla 10.	Porcentaje de condrocitos sin alteraciones y con alteraciones, en los extremos izquierdo y derecho y región central de los anillos de cartílago, previos a la liofilización, posteriores a la liofilización, así como al finalizar el estudio ..... 59
Tabla 11.	Valores de significancia (p) para cada una de las comparaciones realizadas entre condrocitos sin alteraciones y condrocitos con alteraciones en tres zonas de los anillos de cartílago (pre y post-liofilización: n=6 anillos, fin del estudio: n=1 anillo, ANDEVA + Tukey: $p < 0.05$ ) ..... 60
Tabla 12.	Resultados de la tinción con hematoxilina-eosina de los anillos de cartílago ..... 62
Tabla 13.	Tiempo de sobrevida que presentaron los animales de experimentación, a los que se les practicó una reparación quirúrgica, utilizando un segmento traqueal liofilizado ..... 66

## Glosario

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Apaf-1	Factor 1 activador de proteasas apoptóticas, apoptotic protease activating factor-1, por sus siglas en inglés
ATP	Adenosina trifosfato, adenosine triphosphate, por sus siglas en inglés
Bak	Antagonista 1 del asesino Bcl-2, Bcl-2 antagonist killer 1, por sus siglas en inglés, proteína pro-apoptótica que altera la integridad de la membrana mitocondrial externa
Bax	Proteína x asociada a Bcl-2, Bcl-2 associated x protein, por sus siglas en inglés, proteína pro-apoptótica que altera la integridad de la membrana mitocondrial externa
Bcl-2	Proteína 2 del linfoma de linfocitos B, B-cell lymphoma protein 2, por sus siglas en inglés, proteína anti-apoptótica que reside en la membrana mitocondrial externa donde contribuye a la estabilidad mitocondrial
Bcl-X <sub>L</sub>	Isoforma larga de la proteína relacionada con Bcl-2, Bcl-2 related protein, long isoform, por sus siglas en inglés, proteína anti-apoptótica que reside en la membrana mitocondrial externa donde contribuye a la estabilidad mitocondrial
BH3	Proteína que actúa como detector de diversos agentes estresantes, también se puede unir a diversas proteínas pro-apoptóticas como Bak y Bax y a diversas proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, regulando sus funciones
Bid	Agonista del dominio de muerte interactuando con BH3, BH3 interacting domain death agonist, por sus siglas en inglés, proteína pro-apoptótica
CAD	ADNasa activadora de caspasas, caspase-activated DNase, por sus siglas en inglés

DED	Dominio efector de muerte, death effector domain, por sus siglas en inglés
DISC	Complejo de señalización de inducción de muerte, death-inducing signaling complex, por sus siglas en inglés
dUTP	Desoxiuridina trifosfato, deoxyuridine triphosphate, por sus siglas en inglés
Epítipo	Porción específica de un antígeno macromolecular a la que se une un anticuerpo. En el caso de un antígeno proteínico reconocido por un linfocito T, un epítipo es la porción peptídica que se fija a una molécula del CPH para su reconocimiento por el receptor de linfocitos T
FADD	Fas asociado a proteína con dominio de muerte, Fas associated death domain, por sus siglas en inglés
Fas	Sintetasa de ácidos grasos, fatty acid synthetase, por sus siglas en inglés, es un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral que se expresa sobre la superficie de los linfocitos T y en otros tipos de células, el cual pone en marcha una cascada señalizadora que conduce a la muerte de la célula por apoptosis.
FasL	Ligando de la sintetasa de ácidos grasos, fatty acid synthetase ligand, por sus siglas en inglés, es una proteína de membrana que pertenece a la familia proteínica del factor de necrosis tumoral y se expresa sobre los linfocitos T activados. El ligando de Fas se une a Fas, lo que estimula una vía señalizadora que conduce a la muerte por apoptosis de la célula que expresa Fas
FiO <sub>2</sub>	Fracción inspirada de oxígeno
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, fluorescein isothicyanate, por sus siglas en inglés

Frecuencia respiratoria	Es el número de respiraciones que efectúa un ser vivo en un lapso específico que suele expresarse en respiraciones por minuto (resp/min)
Granzima B	Enzima serina-proteasa presente en los gránulos de los linfocitos T y las células “asesinas naturales”, que se libera por exocitosis y penetra en las células elegidas para degradar y activar las caspasas por vía proteolítica que, a su vez escinden varios sustratos e inducen la apoptosis de la célula en cuestión
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”
Linfocito T	Tipo de célula que interviene en las respuestas inmunitarias celulares del sistema inmunitario adaptativo. Los linfocitos T maduran en el timo, circulan por la sangre, pueblan los tejidos linfáticos secundarios y resultan atraídos hacia los lugares periféricos de exposición a los antígenos.
LSCM	Microscopía confocal de barrido laser, laser scanning confocal microscopy, por sus siglas en inglés
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad, major histocompatibility complex, por sus siglas en inglés, es una región génica que poseen todos los mamíferos y cuyos productos son los principales causantes del rechazo rápido de los injertos entre individuos diferentes y de la transmisión de señales entre linfocitos y las células que expresan antígenos
Presión atmosférica	Presión que ejerce la atmósfera sobre todos los objetos inmersos en ella. Su valor normal a nivel del mar es de 760 mmHg o 1013 mbar
REVCO	Marca comercial de congeladores de ultra-baja temperatura
“Stent”	Dispositivo médico de forma tubular, que se coloca dentro de una arteria, vaso sanguíneo u otro conducto como la tráquea, con el fin de mantener la estructura abierta

Survivina	Proteína miembro de la familia de inhibidores de la apoptosis
TBST	Solución salina amortiguada tris con Tween 20, tris buffered saline with Tween 20, por sus siglas en inglés
TCR	Receptor de linfocitos T, T-cell receptor, por sus siglas en inglés, es una molécula de unión a un antígeno que se expresa en la superficie de las células T
Tris	Nombre abreviado del compuesto orgánico 2-amino-2-hidroximetil propano-1, 3-diol, utilizado en bioquímica y biología molecular para preparar soluciones amortiguadas
TdT	Enzima, terminal deoxinucleotidil transferasa, enzyme terminal deoxynucleotidil transferase, por sus siglas en inglés
TUNEL	Ensayo de TUNEL (Terminal dUTP Nick End-Labeling, corte etiquetado al final de un dUTP terminal, por sus siglas en inglés) identifica células apoptóticas <i>in situ</i> debido a la fragmentación característica de su ADN
Tween 20	Nombre comercial del polisorbato 20, el cuál es un surfactante con baja toxicidad y estabilidad usado como detergente en aplicaciones científicas, domésticas y farmacológicas
Volumen corriente	Es el volumen de aire que circula entre una inspiración y una espiración normal sin realizar un esfuerzo adicional, cuyas unidades se expresan el mL/kg de masa corporal.
“Western blot”	Técnica inmunológica para determinar la presencia de una proteína en una muestra biológica por inmunoelectrotransferencia. El método consiste en la separación de las proteínas de la muestra por electroforesis, la transferencia de esta serie de proteínas desde el gel de electroforesis a una membrana de sostén por acción capilar (adsorción) y, por último, la detección de la proteína mediante la unión de un anticuerpo específico para que esté marcado con una enzima

## Resumen

Diferentes patologías traqueales como estenosis, malacias y tumores obstruyen el libre paso del aire hacia y desde los pulmones, provocando en el paciente insuficiencia respiratoria. La solución a este tipo de lesiones es exclusivamente quirúrgica. El tratamiento de elección incluye resección del segmento traqueal dañado con anastomosis (quitar el segmento dañado y volver a unir la tráquea). Sin embargo, este procedimiento únicamente tiene utilidad cuando las lesiones traqueales miden menos de 7cm de longitud, lo que excluye a pacientes portadores con lesiones de mayor extensión, en los que es necesario tratar de paliar la insuficiencia respiratoria mediante la aplicación de procedimientos recurrentes y no definitivos como traqueotomías, aplicación de rayo láser, dilataciones traqueales o colocación de diferentes tipos de “stents”. Actualmente, no existen opciones quirúrgicas definitivas para la reparación de lesiones traqueales mayores de 7cm, a pesar de numerosos intentos realizados con prótesis sintéticas, tejidos autólogos y trasplante traqueal. Con ninguna de ellas ha sido posible realizar una reconstrucción funcional, principalmente por alteraciones relacionadas con la consistencia del cartílago, estenosis, necrosis y la falta de una adecuada vascularización. Esto demanda la búsqueda de una estrategia quirúrgica definitiva para los pacientes portadores de extensas lesiones en los que no existe la posibilidad de realizar una resección traqueal, pero que debe resolverse la insuficiencia respiratoria que les provoca complicaciones funcionales e infecciosas. De esta manera, el objetivo de este trabajo de tesis, se basó en evaluar los cambios microscópicos que ocurren en el cartílago, así, como la participación de la muerte celular por apoptosis (a través de la expresión de caspasa-3) en segmentos traqueales que fueron liofilizados y utilizados como bioprótesis en la reparación quirúrgica de gran longitud utilizando un modelo experimental canino.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Anatomía del aparato respiratorio

El aparato respiratorio comprende la nariz, la faringe (conducto muscular membranoso que ayuda a que el aire fluya hacia las vías aéreas inferiores), la laringe (órgano de la voz, cuya función principal es la filtración del aire inspirado), la tráquea (vía de conducción del aire hacia y desde los pulmones), los bronquios y los pulmones.<sup>2</sup>

El aparato respiratorio se puede clasificar tanto estructuralmente como funcionalmente:

De acuerdo con su *estructura*, el aparato respiratorio se divide en 1) el aparato respiratorio superior, que comprende la nariz y la faringe y 2) el aparato respiratorio inferior que incluye la laringe, la tráquea, los bronquios y los pulmones.

De acuerdo con su *función*, el aparato respiratorio se divide en: 1) la zona de conducción, que consiste en una serie de tubos interconectados fuera y dentro de los pulmones que incluyen la nariz, la faringe, la laringe, la tráquea, los bronquios y los bronquiolos, los cuales en conjunto filtran, calientan y humidifican el aire y lo conducen a los pulmones y 2) la zona respiratoria, ubicada dentro de los pulmones, en donde tiene lugar el intercambio gaseoso entre el aire y la sangre e incluye, los bronquiolos, los conductos alveolares y los alvéolos (Figura 1).<sup>2</sup>

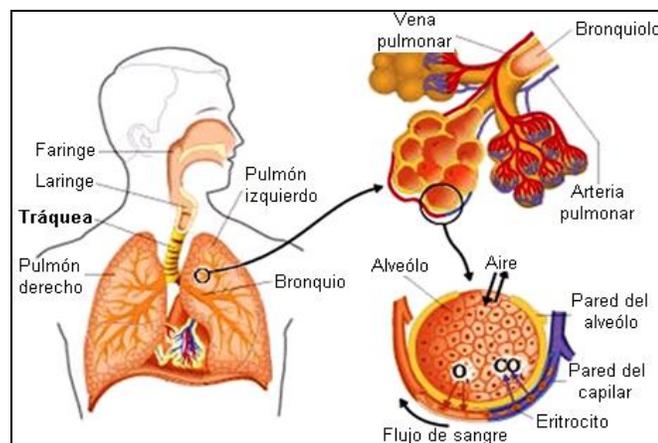


Figura 1. Aparato respiratorio y zona de intercambio gaseoso

## 1.2. Tráquea

La tráquea es un órgano de forma tubular, semirrígido y flexible, que en el adulto mide aproximadamente 12 cm de largo x 2.5 cm de diámetro. Contiene entre 18 y 22 anillos cartilagosos en forma de "C" y tiene como función principal, conducir el aire inspirado desde la nariz o la boca hacia las zonas de intercambio gaseoso y desde los pulmones hacia el ambiente exterior. La tráquea se localiza por delante del esófago y se extiende desde la laringe hasta el borde superior de la quinta vértebra torácica, en donde se divide en los bronquios primarios izquierdo y derecho (Figura 2).<sup>2-4</sup>

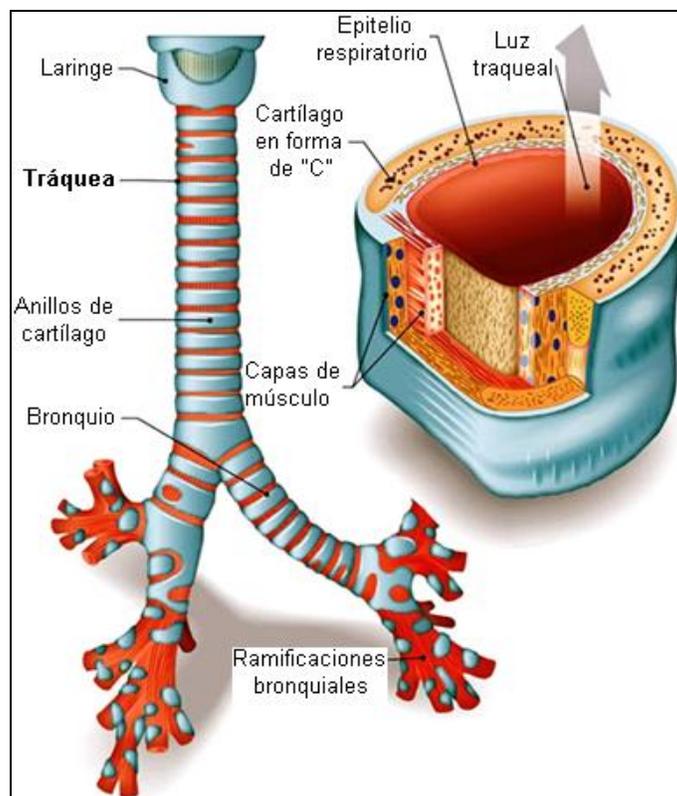


Figura 2. Imagen de la tráquea en donde se ilustra un corte transversal de uno de los anillos cartilagosos

### 1.2.1. Fisiología

La tráquea es una vía aérea de conducción, su función es permitir el paso del aire hacia y desde los pulmones, lo acondiciona a una temperatura adecuada y participa en la depuración del mismo, además, también posee función mucociliar e interviene en la protección de las vías respiratorias inferiores.<sup>3,4</sup>

### **1.2.2. Irrigación**

La tráquea recibe irrigación de las arterias tiroidea inferior, de la subclavia, de la intercostal superior, de la mamaria y de la arteria bronquial media. Estas arterias originan anastomosis paralelas a la tráquea, de estas anastomosis emergen vasos que ingresan a la tráquea en el tejido intercartilaginoso, estos vasos transversales junto con los longitudinales originan una red que nutre a la mucosa traqueal. Las arterias esofágicas son las que irrigan la parte membranosa de la tráquea.<sup>1</sup>

### **1.2.3. Histología**

La tráquea está compuesta de las siguientes capas (de adentro hacia fuera): 1) La mucosa (epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado y una lámina propia fibroelástica), 2) La submucosa (tejido conectivo), 3) El cartílago hialino y 4) La adventicia (tejido conjuntivo laxo).<sup>4</sup>

#### **1.2.3.1. Mucosa**

El recubrimiento mucoso de la tráquea está compuesto por epitelio respiratorio y una lámina basal, que permite la separación entre la mucosa y la submucosa subyacente.<sup>4</sup>

La clasificación del epitelio se basa en la disposición y morfología celular. De esta manera, el epitelio respiratorio se clasifica como epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado. Es pseudoestratificado, debido a que todas las células están en contacto con la lámina basal, pero sólo algunas llegan a la superficie del epitelio. Es cilíndrico y ciliado, debido a la presencia de un tipo de células que reciben el nombre de células cilíndricas ciliadas. Los cilios que forman parte del epitelio respiratorio de la tráquea, se encargan mediante oscilaciones rítmicas, de propulsar el moco y sustancias de desecho que quedan atrapadas sobre la superficie epitelial hasta la faringe, en donde pueden deglutirse o expectorarse.<sup>4,6</sup>

Es importante mencionar que el epitelio no se encuentra vascularizado, de tal manera, que necesita recibir los nutrientes adecuados de otra parte. De esto se

encargan los vasos sanguíneos que se encuentran en el tejido conectivo subyacente, los cuales proporcionan a través de difusión de la lamina basal, los nutrientes y oxígeno que se requieren para el mantenimiento del tejido epitelial (Figura 3).<sup>4,5</sup>

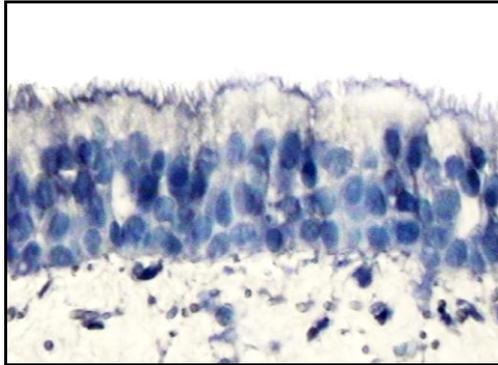


Figura 3. Epitelio traqueal visto al microscopio óptico (Tinción aminoetilcarbazol-hematoxilina, 40X)  
(Imagen, Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental, INER)

#### 1.2.3.2. Submucosa

La submucosa traqueal, está constituida por tejido fibroelástico denso que contiene glándulas seromucosas y mucosas, cuyos conductos perforan la lámina basal para desembocar en la superficie epitelial. Esta región también presenta vasos sanguíneos y linfáticos cuyas ramas más pequeñas tienen contacto con la lámina basal. Las células epiteliales dan origen a las glándulas debido a que van internalizándose a través del tejido conectivo subyacente (Figura 4).<sup>4,5,7</sup>

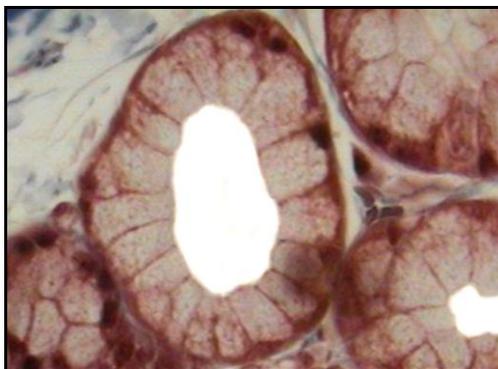


Figura 4. Glándulas en la submucosa de la tráquea vistas al microscopio óptico (Tinción tricrómica de Masson, 40X)  
(Imagen, Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental, INER)

### 1.2.3.3. Cartílago hialino

Estructuralmente, los anillos traqueales tienen forma de “C”. Están conformados por cartílago de tipo hialino y presentan las siguientes características.<sup>4,5</sup>

Las células mesenquimatosas que se localizan en la periferia del cartílago en desarrollo se diferencian para formar fibroblastos. Estas células a su vez, elaboran un tejido conectivo denso irregular colagenoso, denominado pericondrio, que permite el crecimiento y el desarrollo del cartílago, ya que éste no posee riego sanguíneo ni linfático.<sup>4,5</sup>

El pericondrio presenta dos capas: una capa fibrosa externa compuesta de colágena tipo I, fibroblastos, vasos sanguíneos (que proporcionan nutrientes a las células del cartílago) y una capa celular interna, compuesta por células condrogénicas que tienen la capacidad de dividirse y diferenciarse en condroblastos. Estos últimos elaboran y secretan los componentes de la matriz del cartílago. En ese sentido, el cartílago crece por adición en la periferia, proceso que recibe el nombre de crecimiento aposicional.<sup>4,5,8,10</sup>

Una vez que los condroblastos se rodean de matriz reciben el nombre de condrocitos. Un condrocito puede presentar dos o más divisiones celulares presentándose de esta manera un grupo isógeno.<sup>4,5,10</sup> Por su parte, los condrocitos del grupo isógeno, elaboran también componentes de la matriz, con lo que el cartílago incrementa su tamaño desde el interior, proceso que recibe el nombre de crecimiento intersticial.<sup>4,5,8,10</sup>

Cerca del pericondrio, los condrocitos presentan una morfología alargada con el eje mayor paralelo a la superficie y conforme se alejan de la periferia del cartílago, los condrocitos presentan una forma redondeada. El tejido cartilaginoso se retrae durante su procesamiento para un estudio histológico, de tal manera,

que los condrocitos presentan una forma estrellada y alejamiento de la cápsula (Figuras 5 y 6).<sup>4</sup>

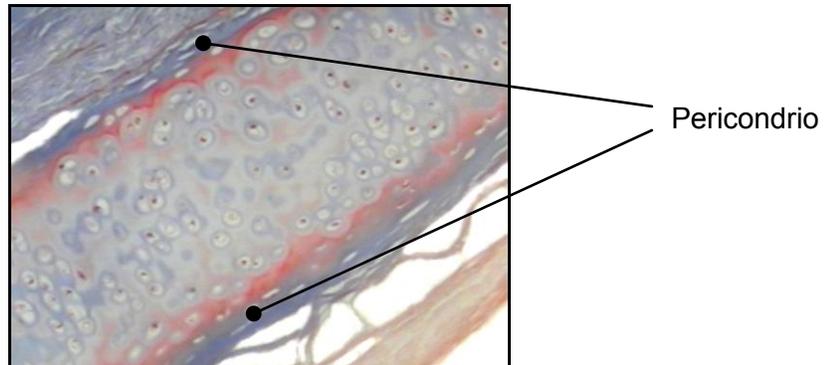


Figura 5. Cartílago hialino visto al microscopio óptico (Tinción tricrómica de Masson, 10X)  
(Imagen, Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental, INER)

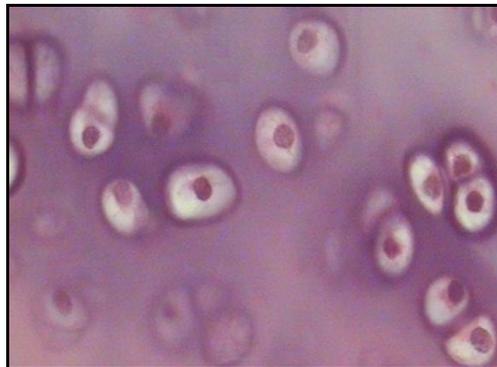


Figura 6. Condrocitos en el cartílago hialino vistos al microscopio óptico (Tinción con hematoxilina-eosina, 40X)  
(Imagen, Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental, INER)

Los condrocitos organizan su propio metabolismo para garantizar la renovación y organización tridimensional. Además de los condrocitos, el cartílago está compuesto por una matriz extracelular que a su vez está integrada por la sustancia fundamental, fibras de colágeno tipo II y una fracción líquida que es agua. Estos componentes en conjunto proporcionan al cartílago su forma y estabilidad. Las cavidades de la matriz que contienen a los condrocitos se denominan lagunas (Figura 7).<sup>4,5,9</sup>

La sustancia fundamental de la matriz del cartílago es un componente no fibrilar, constituido por proteoglicanos, glucosaminoglicanos y glucoproteínas de adhesión.

Los proteoglicanos son macromoléculas compuestas por un centro proteico al cual se unen de manera covalente los glucosaminoglicanos, a excepción del ácido hialurónico, el cual se enlaza mediante interacción iónica.

Los glucosaminoglicanos son polisacáridos largos, inflexibles y sin ramificaciones, que se componen de unidades repetidas de disacáridos. En ellos, uno siempre es un azúcar amino o hexosamina, ya sea N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina y el otro es un ácido urónico, siendo este idurónico o glucurónico. Debido a que el azúcar amino suele sulfatarse, los glucosaminoglicanos se pueden clasificar en sulfatados como es el ácido hialurónico y no sulfatados como son el sulfato de heparán, sulfato de queratán, sulfato de condroitina-4, sulfato de condroitina-6, sulfato de dermatán y heparina. En particular, los glucosaminoglicanos que se encuentran en el cartílago hialino son el sulfato de condroitina-4, sulfato de condroitina-6 y el ácido hialurónico. También estos azúcares presentan grupos carboxilo que se proyectan desde ellos presentando carga negativa, atrayendo de esta manera a cationes como el sodio. Estos, a su vez, atraen moléculas de agua provocando que la matriz del cartílago quede hidratada, lo que explica la capacidad del cartílago para resistir fuerzas de compresión. Los grupos ácidos presentes en los proteoglicanos hacen que estas moléculas se unan a residuos de aminoácidos básicos presentes en el colágeno, a través de enlaces electrostáticos. En consecuencia, componentes específicos de la sustancia fundamental y las fibras de colágena, forman una estructura molecular de enlace transversal que resiste las fuerzas de tensión.<sup>4,5,9,12</sup>

La sustancia fundamental también contiene glucoproteínas de adherencia, que son macromoléculas que presentan varios sitios de unión para los diferentes componentes de la matriz extracelular<sup>11</sup>, así que cuando menos, uno se une a

integrinas (proteínas de la superficie celular), una a fibras de colágeno y otro a proteoglicanos, lo cual quiere decir, que estas macromoléculas unen entre sí los diversos componentes de la matriz extracelular.<sup>4,5,9</sup>

La composición, organización y función de la matriz extracelular, varía según la distancia a la célula, por lo que se pueden distinguir tres regiones llamadas cápsula o región pericelular, matriz territorial y matriz interterritorial.<sup>4,9</sup>

La cápsula o región pericelular, es una región pequeña de la matriz que rodea inmediatamente las lagunas. Ésta muestra una fina red de fibras de colágeno tipo IV y presenta proteoglicanos.<sup>4,9</sup>

La matriz territorial, rodea la cápsula pericelular de los condrocitos e incluso a parejas o grupos de dichas células. Es abundante en sulfato de condroitina, lo que contribuye a su tinción basófila. Sus finas fibras de colágeno, simulan una adherencia a la cápsula pericelular y puesto que se cruzan en varios ángulos forman una especie de cesta fibrilar alrededor de la misma. Esta cesta de fibras cumple la función importante de ser una barrera física, lo que sugiere, una regulación del tránsito de moléculas y metabolitos desde la matriz extracelular al condrocito y viceversa (Figura 7).<sup>4,9,10</sup>

La matriz interterritorial constituye la mayor parte del volumen de la matriz. A diferencia de la matriz territorial, es abundante en colágeno tipo II, pero contiene menor cantidad de proteoglicanos (Figura 7).<sup>4,9</sup>

Los nutrientes que provienen de los vasos sanguíneos atraviesan el pericondrio, penetran en la matriz del cartílago y llegan hasta los condrocitos más profundos, principalmente por difusión a través del agua de solvatación de las macromoléculas y el bombeo producido por las fuerzas de compresión y descompresión que se ejercen sobre el cartílago.<sup>4</sup>

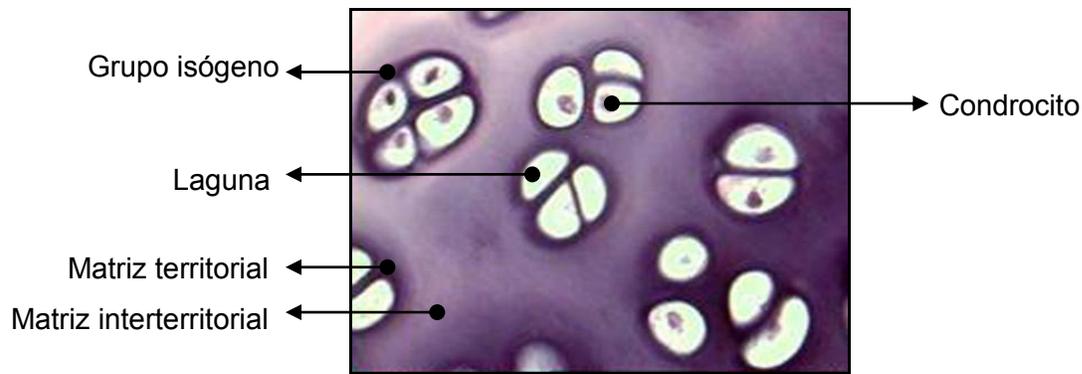


Figura 7. Condrocitos vistos al microscopio óptico  
(Tinción con hematoxilina-eosina, 40X)  
(Imagen, Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental, INER)

#### 1.2.3.4. Adventicia

Esta estructura se encarga de fijar la tráquea a las estructuras adyacentes como son el esófago y tejidos conectivos del cuello, de ahí su importancia.<sup>4</sup>

La Figura 8 muestra las diferentes capas de la tráquea descritas con anterioridad.

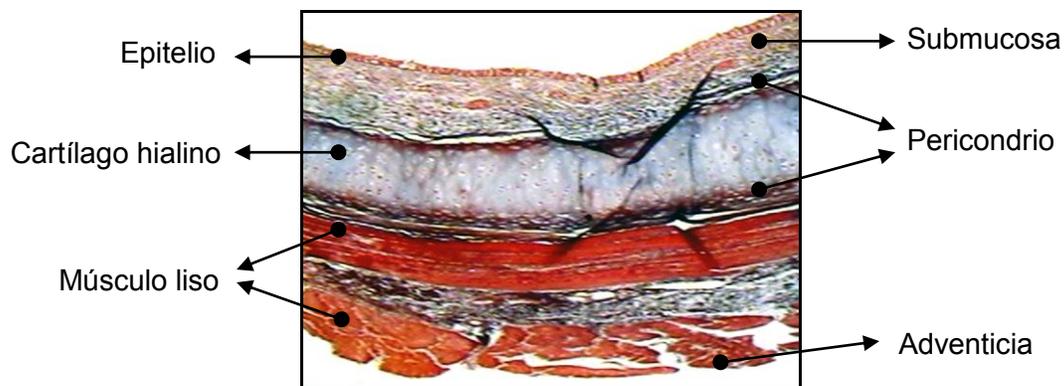


Figura 8: Histología traqueal  
(Tinción tricrómica de Masson, 2.5X)  
(Imagen, Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental, INER)

### 1.3. Complicaciones traqueales

La estenosis (Figura 9) es la patología traqueal más frecuente a nivel mundial, así como en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de la Ciudad de México. Consiste en un estrechamiento del diámetro de la tráquea ocasionado por diferentes factores como: tumoraciones traqueobronquiales<sup>13-15</sup> (Figuras 10 y 11), por una intubación traqueal prolongada en especial con

ventilación asistida o por traumatismos severos (generalmente ocasionados por accidentes automovilísticos).<sup>16</sup>

El tratamiento de elección para este tipo de patologías consiste en reseca el segmento traqueal dañado y volver a unir la tráquea. Sin embargo, este procedimiento es útil únicamente para lesiones traqueales menores de 7 cm de longitud. Para la reconstrucción de lesiones más extensas (> de 7 cm de longitud), no existe un tratamiento quirúrgico definitivo, a pesar de numerosos intentos encausados a solucionar este problema clínico, como han sido prótesis de forma tubular elaboradas con diferentes materiales sintéticos como acero inoxidable, alambre, vidrio y teflón, entre otros. Estas prótesis se han utilizado para tratar de reemplazar el segmento traqueal reseca generando complicaciones como migración y obstrucción de la luz traqueal con tejido de granulación en los extremos de la prótesis provocando estenosis.

Posteriormente y con el objeto de contrarrestar la falla común de las prótesis sólidas impenetrables, se incluyeron las prótesis porosas elaboradas con mallas de diferentes materiales como alambre de acero inoxidable forrado con dermis, dacrón y poliuretano. Sin embargo, cuando éstas se utilizaron para tratar de reparar lesiones quirúrgicas extensas, favorecieron la formación de tejido cicatrizal, seguido de colonización bacteriana. Es por eso que la investigación para tratar de solucionar este tipo de lesiones continúa desarrollándose.

Entre las opciones de tipo biológico encausadas a la solución de este problema, se han realizado ensayos con implantes de tejido traqueal cadavérico, colgajos de tejido autógeno vascularizado y trasplante traqueal con aloinjertos frescos desvascularizados, aloinjertos preservados desvascularizados e injertos vascularizados, incluyendo ingeniería de tejidos que contempla por ejemplo, la siembra de condrocitos colocados en un armazón de un polímero sintético biodegradable (Figura 12).<sup>19</sup>

Sin embargo, para fines prácticos ninguna de las alternativas quirúrgicas propuestas ha sido exitosa para la reconstrucción funcional, ya que todas ellas generan complicaciones como devascularización, estenosis, necrosis, dehiscencia, infección, reacciones inmunológicas y la formación de tejido de granulación.<sup>17</sup>



Figura 9. Estenosis traqueal



Figura 10. Obstrucción de la luz traqueal por carcinoma adenoide quístico; tumoración traqueal



Figura 11. Reducción de la luz traqueal por linfopitelioma; tumoración traqueal

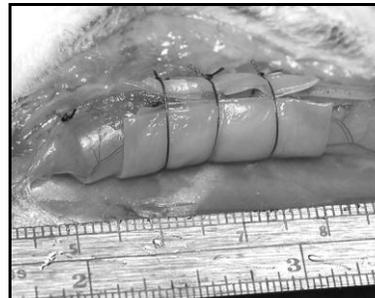
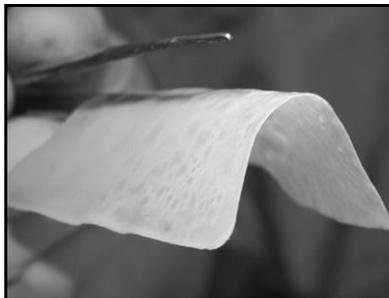


Figura 12. Ingeniería de tejidos

Los reportes que incluyen el uso de segmentos traqueales liofilizados como bioprótesis en la reparación de lesiones traqueales de gran extensión, son

escasos y continúan en fase experimental.<sup>17</sup> El reporte más reciente fue realizado por Lenot y col.<sup>18</sup> Los autores realizaron reparaciones quirúrgicas con segmentos traqueales liofilizados, montados sobre un “stent” de acero inoxidable, con resultados desfavorables debido a necrosis.

#### **1.4. Liofilización**

La liofilización es un proceso de deshidratación que consiste en congelar un producto húmedo y posteriormente sublimar el hielo, consiguiendo de esta manera que la fracción líquida sea eliminada. Esta tecnología ha demostrado tener utilidad en la conservación de productos químicos, alimenticios, farmacéuticos, medico-quirúrgicos, microbiológicos y biológicos, por periodos prolongados de tiempo y mantenidos a temperatura ambiente, sin alterar las propiedades y cualidades originales, ofreciendo de esta manera un producto final de buena calidad y una post-rehidratación relativamente fácil.<sup>20</sup>

Con base en los tres estados del agua (sólido, líquido y gaseoso), en el proceso de liofilización, el agua es eliminada de las muestras previamente congeladas con la finalidad de transformar el agua que se congeló en vapor, sin que en este proceso conocido como sublimación pase por la fase líquida.

La liofilización se lleva a cabo en tres etapas: congelación, secado primario y secado secundario. Durante la etapa de congelación, la mayoría del agua es convertida en hielo. Entonces, la presión del sistema es reducida utilizando una bomba de vacío y la temperatura se eleva para facilitar la sublimación del hielo durante el secado primario. En esta operación unitaria, la presión de la cámara está por abajo del punto triple del agua, por lo que el hielo es transferido de la muestra al condensador por sublimación. Este vapor se condensa fuera de la cámara de secado. En la segunda etapa de secado, la temperatura se eleva para remover más eficientemente el agua que no se congeló para proporcionar un bajo contenido de agua residual, generalmente menos del 1%.<sup>21-24</sup>

El proceso de sublimación que se lleva a cabo en la liofilización consiste en: la absorción de calor de la muestra congelada para vaporizar el agua, el uso de una bomba de vacío para mantener la presión abajo del punto triple, mejorando la eliminación del vapor de agua de la superficie de la muestra, la transferencia y depósito del vapor de agua en un condensador, la eliminación de calor debido a la formación de hielo desde el condensador a través de un sistema de refrigeración. En esencia, el proceso de liofilización es un balance entre el calor absorbido por la muestra para vaporizar el agua y el calor removido del condensador para convertir el vapor de agua en hielo.<sup>21</sup>

A continuación se muestra en la Tabla 1 el tiempo aproximado de liofilización de algunos productos.

Tabla 1. Temperatura de seguridad y tiempo de liofilización de algunos materiales<sup>21</sup>

Material 10 mm de grosor	Temperatura de seguridad °C	Temperatura de condensación °C	Horas (aprox)
Leche	-5	-40	10
Urea	-7	-40	10
Plasma sanguíneo	-10 a -25	-40	16
Suero	-25	-40	18
Vacunas	-30 a -40	-50	22
Tejido humano	-30 a -40	-50	48
Tejido vegetal	-50	-80	60

El calor de sublimación es generalmente absorbido de un lado de la muestra congelada y debe viajar a través de la capa congelada para vaporizar el agua a la otra superficie. Además, conforme la muestra se liofiliza, el vapor de agua debe transferirse a través de la capa de material seco.<sup>21</sup>

Con el fin de que la liofilización se produzca, el hielo debe ser removido de la muestra congelada a través de sublimación, esto se logra mediante el condensador y la bomba de vacío. El condensador debe estar por lo menos de 10°C a 15°C más frío que la temperatura de fusión de la muestra. La presión de

vapor en el condensador es menor que la de la muestra y el flujo de vapor de agua es de la muestra al condensador. Dado que el proceso de difusión del vapor se produce muy lentamente bajo condiciones atmosféricas normales, se requiere de un vacío de  $133 \times 10^{-3}$  mbar para que la liofilización se lleve a cabo.<sup>21-24</sup>

En general, la mayoría de las soluciones o las muestras biológicas tendrán una temperatura de fusión de  $-10$  a  $-25^{\circ}\text{C}$ , no así, las muestras animales o vegetales cuya temperatura de fusión puede ser tan baja como  $-30$  a  $-50^{\circ}\text{C}$ .<sup>21</sup>

En el caso de segmentos traqueales, es necesario evaluar las condiciones ideales para deshidratar el tejido ya que no están descritas en la literatura. En forma previa a la liofilización y considerando que se trata de un segmento de tejido de longitud considerable, los segmentos traqueales fueron congelados de manera gradual tal y como se recomienda para la criopreservación de los mismos, con la finalidad de maximizar el área superficial y reducir su espesor. En comparación con otros productos como los biofarmacéuticos los segmentos traqueales contienen volúmenes considerables de agua.<sup>21</sup> Con la intención de conservar la estructura del cartílago los segmentos traqueales se congelaron colocando los matraces que los contenían dentro de una caja de unicel perfectamente sellada. Éstas fueron almacenadas en un congelador REVCO con el objeto de disminuir de manera gradual la temperatura a razón de  $(1^{\circ}\text{C}/\text{minuto})$  hasta alcanzar una temperatura de  $(-70^{\circ}\text{C})$ . Bajo estas condiciones, el tiempo promedio necesario para que un segmento traqueal de 12 anillos alcance una temperatura de  $(-70^{\circ}\text{C})$  partiendo de la temperatura ambiente es de 90 minutos. Una vez alcanzada esta temperatura, los segmentos traqueales se mantienen almacenados en el congelador REVCO durante 24 horas.

Es importante mencionar que en la criopreservación de segmentos traqueales está establecido que disminuir la temperatura de manera gradual durante la congelación del tejido disminuye la presencia de fracturas cuando estos

son descongelados, hallazgo importante si se considera que se trata de un segmento de tejido que será utilizado como bioprótesis en una reconstrucción.<sup>40</sup>

Así mismo, la temperatura utilizada para realizar el proceso de liofilización de tejidos traqueales fue de  $-55^{\circ}\text{C}$ , ya que los tejidos biológicos presentan una temperatura de fusión entre  $-30^{\circ}\text{C}$  y  $-50^{\circ}\text{C}$ , temperatura que es importante tomar en cuenta pues es uno de los factores que determinan la eficiencia del proceso. Una vez que se conoce la temperatura de fusión de la muestra, se recomienda trabajar con una temperatura del condensador de 10 a  $15^{\circ}\text{C}$  más baja que la temperatura de fusión de la muestra. Es por eso que se eligió una temperatura de  $-55^{\circ}\text{C}$ , para llevar a cabo el proceso de liofilización.<sup>21,22</sup>

Una vez que los segmentos traqueales fueron liofilizados, se esterilizaron con óxido de etileno. Este procedimiento asegura que el porcentaje de contaminantes bacterianos en muestras deshidratadas sea nulo o tan bajo como 0.001%<sup>25</sup> y ha sido utilizado con éxito en biomateriales como pericardio bovino<sup>26</sup>, arteria pulmonar<sup>27</sup> y arteria aorta.<sup>28</sup>

## 1.5. Trasplante

En la práctica clínica los órganos son trasplantados con el objetivo de corregir un déficit funcional. Los antígenos del injerto inducirán una respuesta inmunitaria de rechazo, así que para disminuirlo, se utilizan fármacos inmunosupresores con el objetivo de inducir tolerancia frente a los tejidos injertados.<sup>29,30</sup>

Las células principalmente involucradas en las reacciones de rechazo son los linfocitos T, debido a que reconocen a través de su receptor llamado “receptor de linfocitos T” (TCR, por sus siglas en inglés), a los antígenos asociados a moléculas del “complejo principal de histocompatibilidad” (MHC, por sus siglas en inglés) procedentes del donante.<sup>29</sup>

En condiciones normales, la hendidura de las moléculas del MHC, se encuentra ocupada por péptidos que proceden de componentes celulares normales producto de la degradación intracelular, pero cuando estos péptidos son de origen ajeno, ya sea que se deban a una infección o a un trasplante, estos son reconocidos por los linfocitos T como ajenos, provocando que se desencadene la reacción de rechazo.<sup>29</sup>

## 1.6. Apoptosis

La apoptosis proviene de los vocablos griegos “*apo*”, que quiere decir separación o derivación y “*ptosis*”, que significa caída, por lo que el término alude a la “caída natural de las hojas de los árboles en otoño”. La apoptosis es un tipo de muerte celular caracterizada por cambios morfológicos que incluyen la pérdida de los contactos celulares, turgencia debida a la salida de iones y líquido intracelular, traslocación de la fosfatidilserina de la capa interna de la membrana plasmática a la capa externa, condensación y fosforilación de la cromatina, desensamble de la lámina nuclear, fragmentación del núcleo y la formación de vesículas llamadas cuerpos apoptóticos, que contienen organelos intactos y fragmentos de cromatina que son fagocitados por macrófagos o células vecinas sin la ocurrencia de inflamación. A nivel bioquímico, la apoptosis se caracteriza por la activación de proteasas específicas denominadas caspasas, que pueden activar la nucleasa llamada “ADNasa activadora de caspasas” (CAD, por sus siglas en inglés), la cual se encarga de fragmentar el ácido desoxirribonucleico (ADN), generando al final del proceso de fragmentación, multímeros de nucleosomas (Figura 13).<sup>31,32</sup>

El proceso apoptótico se divide en tres etapas: la primera de ellas es “*la etapa de iniciación*”, en donde la célula recibe el estímulo que la condiciona para iniciar los eventos apoptóticos. La segunda etapa, llamada “*de ejecución*”, concentra la mayor parte de los cambios morfológicos y bioquímicos. La última etapa, llamada “*de eliminación*”, incluye la degradación de los restos celulares por los macrófagos y las células adyacentes.<sup>31</sup>

### 1.6.1. Fase de iniciación

Las señales que desencadenan la muerte celular por apoptosis pueden ser debido a factores tanto intracelulares como extracelulares.<sup>31</sup> Las señales intracelulares activan la vía intrínseca de la apoptosis, en donde está involucrada la liberación del citocromo c de la mitocondria, mientras que las señales extracelulares, desencadenan la vía extrínseca activada por los receptores de muerte localizados en la célula blanco. La naturaleza de los inductores de muerte celular por apoptosis puede ser fisiológica (hormonas, citocinas), biológica (virus, bacterias, parásitos), química (fármacos) o física (radiaciones).<sup>31</sup>

### 1.6.2. Fase de ejecución

En esta etapa, la célula que ha sido señalada para llevar a cabo el proceso apoptótico, pierde contacto con las células vecinas y el citoplasma se contrae, lo que provoca que el tamaño celular se vea disminuido. Aún así, los organelos permanecen intactos. Posteriormente, la cromatina se condensa manteniéndose alrededor de la envoltura nuclear y luego sufre fragmentación. Finalmente se lleva a cabo la formación de cuerpos apoptóticos, los cuales son vesículas rodeadas por la membrana celular, que varían en tamaño y que pueden contener parte de la cromatina y organelos de la célula.<sup>31,32</sup>

Sin importar la vía de inducción, el evento apoptótico provoca la activación de la maquinaria enzimática responsable de los cambios que presenta la célula. Esta maquinaria la constituyen principalmente las caspasas, que son proteasas de cisteína que cortan proteínas inmediatamente después del ácido aspártico. Esta particularidad también la presenta la serinproteasa granzima B<sup>32</sup>, la cual está involucrada en la vía de muerte celular por apoptosis llamada perforina/granzima. En esta vía mediada por linfocitos T, la granzima B activa particularmente a la procaspasa-10, mediante un corte proteolítico después del ácido aspártico, posteriormente la caspasa-10 activará a la procaspasa-3. Las caspasas tienen la particularidad de ejercer el corte proteolítico sobre sí mismas (auto catálisis) o

bien, una caspasa iniciadora lleva a cabo el corte sobre una caspasa efectora.<sup>30,31,33,37</sup>

Las caspasas se encuentran normalmente en las células como zimógenos inactivos constituidos por tres dominios: un prodominio N-terminal, un dominio que genera una subunidad grande (p20) y un dominio que genera una subunidad pequeña (p10). Cuando se inicia el proceso apoptótico, las caspasas se activan a través de uno o dos cortes proteolíticos que fragmentan a la procaspasa (péptido precursor), en las subunidades grande y pequeña. Después de un arreglo conformacional, se forma uno de los dos heterodímeros que conformarán el heterotetrámero o caspasa activa, la cual contará con dos sitios activos.<sup>31,32,34,36</sup> El prodominio N-terminal permite clasificar a las caspasas en iniciadoras, si el prodominio es grande y en efectoras, si el prodominio es pequeño. Las caspasas -2, -8, -9 y -10 son categorizadas como iniciadoras, las caspasas -3, -6 y -7 como efectoras y las caspasas -1, -4 y -5 como inflamatorias.<sup>32,34,37</sup>

Cuando los receptores de muerte son activados por su ligando, se presentan tres etapas distintas: la trimerización del receptor, el reclutamiento de proteínas intracelulares asociadas al receptor, que funcionan como adaptadoras y la iniciación de la activación de las caspasas.

Para ilustrar de mejor manera lo anterior, se tiene el caso del receptor de muerte Fas, con el cual también se ejemplifica la vía extrínseca de la apoptosis. El receptor de muerte Fas se trimeriza al unirse con su ligando (ligando de Fas, FasL). En su región citoplasmática, Fas presenta un dominio de muerte, el cual recluta a una proteína adaptadora denominada “Fas asociado a proteína con dominio de muerte” (FADD, por sus siglas en inglés). Esta proteína también presenta un dominio de muerte en la región C-terminal, de tal manera que la interacción entre Fas y esta proteína, ocurre a través de sus respectivos dominios de muerte. Esta proteína adaptadora además cuenta con un “dominio efector de muerte” (DED, por sus siglas en inglés) en su dominio N-terminal, a través del

cual, interactúa particularmente con la procaspasa-8. Una vez que ha sido reclutada la procaspasa-8, se forma el complejo de señalización de inducción de muerte (DISC, por sus siglas en inglés), una vez formado se lleva a cabo la autoactivación de la procaspasa-8. Una vez activa ahora como caspasa-8, procesa los cimógenos de las caspasas efectoras como son la procaspasa-3, la procaspasa-6 y la procaspasa-7, lo cual quiere decir que el proceso apoptótico se lleva a cabo a través de una cascada de proteólisis (Figura 13).<sup>32</sup>

Varios estímulos apoptóticos provocan que la vía mitocondrial se active. Para llevar a cabo este proceso, son necesarias tres proteínas: el citocromo c, el “Factor 1 activador de proteasas apoptóticas” (Apaf-1, por sus siglas en inglés) y en particular para esta vía la procaspasa-9. El citocromo c es liberado al citoplasma, debido a que alguno de los diversos estímulos que activan esta vía provocó que la membrana interna de la mitocondria abriera un poro eventual de permeabilidad. Una vez en el citoplasma, el citocromo c se une a Apaf-1, para dar lugar al complejo Apaf-1/citocromo c el cual tiene la capacidad de reclutar a la procaspasa-9. Una vez reclutada, se forma el complejo denominado apoptosoma. Posteriormente, la procaspasa-9 se activa por autocatálisis y se libera del apoptosoma para procesar y activar a las caspasas-3, -6 y -7 (Figura 13). Cabe mencionar que la caspasa-3 es la caspasa efectora común a las vías intrínseca, extrínseca y perforina/granzima de la apoptosis.<sup>31-33,35,37</sup>

Las caspasas son proteasas extremadamente selectivas, ya que sólo procesan determinados componentes clave, tanto del citoesqueleto como del núcleo. Por ejemplo, las caspasas activan por proteólisis a la nucleasa CAD, la cual fragmenta el ADN en multímeros de nucleosomas, característica distintiva de la apoptosis. Esta nucleasa fragmenta el ADN en pedazos de 50 a 300 kilobases y, posteriormente estos fragmentos vuelven a ser procesados para obtener pequeños fragmentos de 180 a 200 pares de bases que son característicos de los nucleosomas.<sup>34-36</sup>

### 1.6.3. Fase de eliminación

La muerte celular por apoptosis, ocurre de manera constante en un organismo y los fagocitos son las células responsables de retirar las células apoptóticas. Para asegurar la remoción adecuada y eficiente de las células que sufrieron apoptosis y evitar que las células liberen el contenido citoplasmático, uno de los mecanismos es la pérdida de la asimetría de la membrana celular. Esto genera una exposición de las moléculas de fosfatidilserina (que de manera normal, están restringidas a la parte interna), lo cual es una señal para los fagocitos cercanos de eliminar dicha célula.<sup>31</sup>

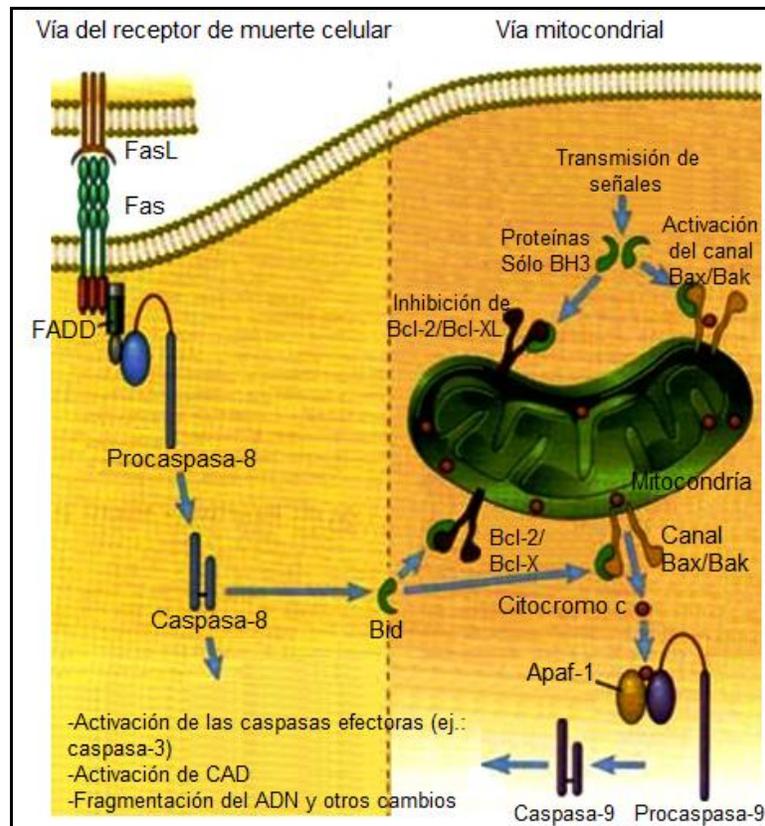


Figura 13. Vía del receptor de muerte celular (extrínseca) y vía mitocondrial (intrínseca), de la apoptosis, FasL=Ligando de Fas, Fas=Miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral que se expresa sobre la superficie de los linfocitos T, FADD=Fas asociado a proteína con dominio de muerte, proteínas sólo BH3=proteínas que detectan diversos agentes estresantes y también se pueden unir a diversas proteínas pro-apoptóticas como Bak y Bax y a diversas proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, regulando sus funciones, Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub>=proteínas anti-apoptóticas, Bax/Bak=proteínas pro-apoptóticas, Bid=proteína pro-apoptótica, Apaf-1=Factor 1 activador de proteasas, CAD=ADNasa activadora de caspasas

La apoptosis y la necrosis son dos procesos que pueden ocurrir independientemente, secuencialmente o bien, simultáneamente. En algunos casos el tipo y grado de estímulo determina si la célula muere por apoptosis o necrosis. A dosis baja una variedad de estímulos dañinos como el calor, la radiación, la hipoxia o los fármacos anti-cancerígenos pueden inducir apoptosis, pero esos mismos estímulos a dosis altas, resultan en necrosis.<sup>37</sup>

Hay evidencias que indican que la apoptosis y la necrosis representan una red de cambios bioquímicos compartidos descrita como apoptosis-necrosis continúa. Por ejemplo, dos factores que pueden convertir un proceso apoptótico en curso en un proceso necrótico incluye la disminución de la viabilidad de las caspasas y la adenosina trifosfato (ATP, por sus siglas en inglés) intracelular. Si la célula muere por necrosis o apoptosis depende en parte de la naturaleza de la señal de muerte sobre la célula, del tipo de tejido, el estado de desarrollo del tejido y del medio fisiológico.<sup>37</sup>

Algunos de los cambios morfológicos que ocurren con la necrosis incluyen: formación de vacuolas citoplasmicas, distensión del retículo endoplasmico, condensación, hinchazón o ruptura de la mitocondria, disgregación y desprendimiento de los ribosomas y ruptura de la membrana celular. La pérdida de la integridad de la membrana celular, resulta en la liberación del contenido citoplasmico en los alrededores del tejido, mandando señales quimiotácticas con el eventual reclutamiento de células inflamatorias. También es importante hacer notar que la picnosis y la cariorexis no son exclusivas de la apoptosis y puede ser parte del espectro de cambios morfológicos que ocurren con la necrosis.<sup>37</sup>

#### **1.6.4. Técnicas para determinar la apoptosis**

En la actualidad, se utilizan varias técnicas que permiten detectar la muerte celular por apoptosis, con base en la ocurrencia de determinados eventos, por lo que la técnica que se elige, depende del modelo de estudio, del tipo de muestra y,

por supuesto, de la infraestructura disponible. Con base en esto, la determinación del fenómeno apoptótico puede realizarse en:<sup>31,37</sup>

1. Alteraciones citomorfológicas: en donde los cortes de tejido son teñidos con la tinción hematoxilina-eosina, para visualizar al microscopio óptico las células apoptóticas.<sup>37</sup>

2. Fragmentación del ácido desoxirribonucleico: con esta técnica se pueden visualizar los fragmentos de ADN producidos por acción de la endonucleasa CAD sobre un gel de agarosa, o mediante el método de TUNEL (Terminal dUTP Nick End-Labeling), en donde los productos de degradación de la endonucleasa CAD, son analizados por vía enzimática al etiquetar el final de la hebra de ADN rota. Las hebras rotas de DNA se detectan enzimáticamente, marcando el extremo libre 3'-OH con nucleótidos modificados. Estos nuevos extremos de ADN son generados debido a la fragmentación del mismo y se encuentran típicamente localizados en núcleos identificables morfológicamente y cuerpos apoptóticos, los cuales pueden ser detectados por microscopía óptica, microscopía de fluorescencia y citometría de flujo, contrastando con los núcleos sin alteraciones (que no sufrieron apoptosis), los cuales contienen números relativamente insignificantes de extremos 3'-OH y por lo tanto no son detectados.<sup>37</sup>

3. Detección de las caspasas: la activación de las caspasas puede ser detectada por una variedad de formas incluyendo "Western blot", inmunoprecipitación e inmunohistoquímica, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales y policlonales, disponibles para detectar ya sea procaspasas o caspasas activas. La reacción antígeno-anticuerpo, se lleva a cabo mediante la unión de un epítipo localizado en la muestra y un anticuerpo, el cual tiene una configuración específica para ese epítipo. Una vez que se lleva a cabo esta unión, es necesario visualizarlo, por lo que se utilizan colorantes para revelar la reacción antígeno-anticuerpo.<sup>37</sup>

4. Alteraciones de la membrana: la externalización de los residuos de fosfatidilserina a la membrana plasmática externa de las células apoptóticas, puede ser detectada vía Anexina-V en diferentes tejidos. La Anexina-V es una proteína recombinante que se une específicamente a residuos de fosfatidilserina, los cuales se encuentran expuestos en la cara externa de la membrana plasmática, por lo que funciona como un biomarcador efectivo en la identificación de células apoptóticas. La Anexina-V, puede conjugarse con una variedad de fluorocromos como el isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés), una vez que las células apoptóticas están enlazadas con FITC-marcado con Anexina-V, es posible la visualización por microscopía de fluorescencia.<sup>37,38</sup>

5. Detección de apoptosis mediante colorantes: los colorantes como el naranja de acridina, el sulfato de azul nilo y el rojo neutro, poseen carácter acidófilo, por lo que se concentran en zonas de alta actividad lisosomal y fagocítica, con lo que la apoptosis puede ser visualizada en diferentes tejidos.<sup>37</sup>

6. Ensayos mitocondriales: en este caso, un análisis mitocondrial y la liberación del citocromo c, permite la detección de cambios al inicio de la fase intrínseca, lo cual se puede lograr con microscopía confocal de barrido laser (LSCM, por sus siglas en inglés), creando delgadas rebanadas submicrónicas ópticas, utilizando monitores para la detección de los eventos mitocondriales en células a través del tiempo.<sup>37</sup>

### **1.7. Tinciones histológicas**

Para realizar un estudio histológico mediante microscopía óptica, los cortes de tejido se deben teñir. Para esto, hay técnicas de tinción que establecen diferencias entre los diversos componentes de los tejidos.<sup>5</sup> Existe una variedad de colorantes para observar los componentes celulares que pueden agruparse de la siguiente manera:

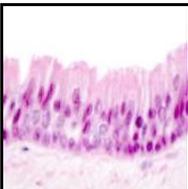
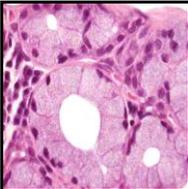
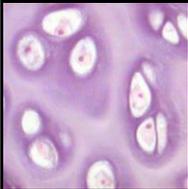
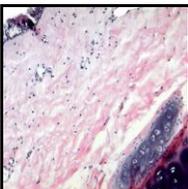
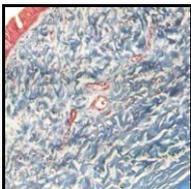
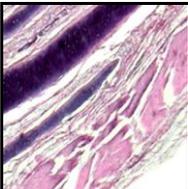
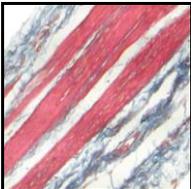
- Colorantes que diferencian los componentes ácidos y básicos de la célula.

- Colorantes especializados que distinguen los componentes fibrosos de la matriz extracelular.
- Sales metálicas que se precipitan y depositan en los tejidos.

Los colorantes empleados con más frecuencia en histología son: la hematoxilina y la eosina.

La hematoxilina actúa como colorante básico por lo que presenta densidad de carga positiva y se asocia a iones con carga negativa (sulfatos, fosfatos y carboxilos) contenidos en la cromatina, en los nucleolos y en los componentes del cartílago como son los proteoglicanos y los glucosaminoglicanos, tiñéndolos de color morado. La eosina es un compuesto ácido, que tiñe los componentes básicos de la célula, como son los gránulos de secreción, proteínas citoplásmicas, y las fibras de colágeno de color rosado. Existen otras técnicas de tinción que se emplean habitualmente. Una de ellas es la de los tricrómicos, por ejemplo, el de Masson, que define bien el núcleo de color negro, el citoplasma, las fibras de músculo y la fibrina de color rojo y, las fibras de colágeno de color azul.<sup>4,5,39</sup>

La tinciones con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson se clasifican como topográficas, porque permiten obtener una visión general de las estructuras contenidas en un tejido y fueron utilizadas para evaluar la continuidad y el desprendimiento del epitelio respiratorio a lo largo de la mucosa traqueal, la estructura de las glándulas seromucosas, los anillos de cartílago, las fibras de colágena y las fibras musculares, así como el porcentaje de condrocitos sin alteraciones y con alteraciones. En el Cuadro 1 se ilustran las tinciones utilizadas para realizar la evaluación histológica, con base en las cuatro capas histológicas que componen la pared de la tráquea y las coloraciones correspondientes.<sup>40</sup>

Estructura	Tinción h-e	Tinción tricrómica de Masson
<i>Epitelio pseudoestratificado</i> <b>(Mucosa)</b>	 <p data-bbox="781 512 927 575">Cilios (rosa) Citoplasma (rosa) Núcleo (azul)</p>	
<i>Glándulas</i> <b>(Submucosa)</b>	 <p data-bbox="781 800 927 863">Crestas (rosa) Citoplasma (rosa) Núcleo (azul)</p>	
<b>Cartílago hialino</b>	 <p data-bbox="781 1085 927 1169">Matriz extracelular (violeta-púrpura) Núcleo (azul) Citoplasma (rosa)</p>	
<i>Fibras de colágena</i> <b>(Submucosa y adventicia)</b>		
<i>Fibras de músculo liso</i> <b>(Adventicia)</b>	 <p data-bbox="781 1604 927 1688">Fibras de colágena (rosa) Fibras de músculo liso (rosa)</p>	 <p data-bbox="1005 1604 1151 1688">Fibras de colágena (azul) Fibras de músculo liso (rojo)</p>

Cuadro 1. Tinciones utilizadas para la evaluación microscópica del tejido traqueal (Imagen, Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental, INER)

## 2. JUSTIFICACIÓN

La reparación de lesiones traqueales de gran longitud es un problema clínico importante sin resolver, que demanda como solución potencial la búsqueda de una bioprótesis funcional: a) que sea de tamaño suficiente para realizar la reparación, b) que mantenga rigidez estructural, c) que presente una adecuada vascularización, d) que permita la cobertura del lumen con epitelio respiratorio y e) que asegure estabilidad mecánica.

La liofilización es un método que ha demostrado tener utilidad en el mantenimiento estructural y funcional de diferentes productos químicos, alimenticios, farmacéuticos, medico-quirúrgicos, microbiológicos, biológicos y de diferentes biomateriales.

En 1951, Marrangoni<sup>17</sup> realizó los primeros ensayos con tráqueas liofilizadas y observó que los aloinjertos traqueales caninos liofilizados, perdieron el cartílago que fue reemplazado con tejido cicatrizal. Tres años después (1954), Pacheco<sup>17</sup> y colaboradores describieron destrucción y fibrosis de aloinjertos frescos y estenosis del aloinjerto preservado en alcohol o solución salina o cuando fueron liofilizados. Estos hallazgos fueron confirmados en 1958 por Bjork y Rodriguez<sup>17</sup> y fue el último ensayo documentado, hasta 1993 cuando Lenot y colaboradores<sup>18</sup> retomaron los ensayos experimentales utilizando un modelo experimental porcino, para reparaciones quirúrgicas con segmentos traqueales liofilizados combinados con una endoprótesis de acero inoxidable utilizada como “stent”, pero los resultados no fueron favorables.

Recientemente, en el Departamento de Investigación en Cirugía Experimental, el Dr. Jaime Villalba<sup>1</sup> realizó un trabajo doctoral en el que evaluó la utilidad de los segmentos traqueales liofilizados como bioprótesis en una reconstrucción traqueal de gran longitud, así como el efecto que ejerce la inmunosupresión y el factor de crecimiento del endotelio vascular. Esta última investigación aunada a los numerosos intentos realizados con prótesis sintéticas,

tejidos autólogos y trasplante traqueal, encausados a encontrar una estrategia quirúrgica definitiva para la reparación de lesiones traqueales mayores de 7 cm, no han sido exitosos, ya que generan complicaciones como desvascularización, estenosis, necrosis, dehiscencia, infección, reacciones inmunológicas de rechazo y formación de tejido de granulación. Es por eso que continúa la búsqueda de una estrategia quirúrgica definitiva para los pacientes portadores de extensas lesiones, en los que no existe la posibilidad de realizar una resección traqueal, pero debe resolverse la insuficiencia respiratoria que les provoca complicaciones funcionales e infecciosas.

Del trabajo de tesis realizado por Villalba<sup>1</sup>, derivó la necesidad de evaluar los cambios microscópicos relacionados con muerte celular que ocurren en el cartílago traqueal por efecto del fenómeno deshidratación-rehidratación inherente al proceso de la liofilización, bajo condiciones específicas del proceso, sin optimizarlo. En este proyecto de investigación se evaluó la muerte celular por apoptosis a través de la expresión de caspasa-3 y los cambios microscópicos que ocurren en el cartílago, en forma previa y posterior a la liofilización de segmentos traqueales. Así mismo, se estudiaron los fenómenos que ocurren en forma posterior a su utilización en una reparación quirúrgica de diez anillos traqueales, utilizando un modelo experimental canino.

### **3. HIPÓTESIS**

El proceso de deshidratación inherente a las condiciones específicas en las que se realizó la técnica de liofilización provocará un incremento en el índice de muerte celular en el cartílago de segmentos traqueales.

Mientras mayor sea la expresión de caspasa-3 en el cartílago menor será la utilidad del segmento traqueal liofilizado para la reconstrucción.

Las propiedades y cualidades originales de los segmentos traqueales no se modificarán por efecto de la liofilización.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

- ✓ Evaluar el efecto que ejercen las condiciones específicas de la operación de liofilización establecidas en este proyecto sobre los cambios microscópicos relacionados con muerte celular por apoptosis en el cartílago traqueal, en forma previa y posterior al procedimiento de liofilización, así como en forma posterior a su utilización en la reparación quirúrgica.

### **4.2. Objetivos particulares**

- ✓ Evaluar los cambios macroscópicos que ocurren en los segmentos traqueales por efecto de la operación de liofilización y después de que éstos fueron utilizados en la reparación quirúrgica.
- ✓ Evaluar los cambios microscópicos que ocurren en los segmentos traqueales por efecto de la operación de liofilización y después de que éstos fueron utilizados en la reparación quirúrgica.
- ✓ Evaluar la expresión de caspasa-3 que ocurre en los segmentos traqueales por efecto de la operación de liofilización y después de que éstos fueron utilizados en la reparación quirúrgica.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1. Recursos**

Tanto los recursos humanos, como los materiales, empleados para el desarrollo de este protocolo, fueron financiados por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) "Ismael Cosío Villegas". En la realización de este trabajo colaboraron investigadores y técnicos de la Unidad de Transplante Pulmonar Experimental y del Departamento de Cirugía Experimental de dicho Instituto.

### **5.2. Animales de experimentación**

Se utilizaron 17 perros mestizos (11 donadores de un segmento traqueal + 6 receptores / donadores), clínicamente sanos, con una masa corporal entre 15 y 25 kg, sin importar edad ni sexo, con edad variable y no relacionados entre sí.

### **5.3. Criterios de inclusión**

Se incluyeron animales clínicamente sanos que no presentaron antecedentes de alguna enfermedad respiratoria desde su llegada al Bioterio del INER y antes de que se les practicara el procedimiento quirúrgico.

### **5.4. Criterios de exclusión**

Los animales que presentaron cuadros clínicamente patológicos durante su estancia en el Bioterio del INER y previos al procedimiento quirúrgico o con antecedentes de alguna cirugía de tórax fueron excluidos del estudio.

### **5.5. Consideraciones éticas**

Los animales fueron mantenidos en condiciones habituales de bioterio y manejados con base en los lineamientos establecidos en las Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (DOF, 1999)<sup>54</sup> y en la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos.<sup>55</sup> El protocolo fue

revisado y aprobado por el Comité de Bioética y el Comité Científico del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

### 5.6. Técnica quirúrgica / Procuración de la tráquea

Previo a la obtención de la tráquea, los animales se prepararon con 24 horas de ayuno para sólidos y con 12 horas de ayuno para líquidos. Se colocaron sobre la mesa de cirugía en posición decúbito dorsal, fueron intubados con una sonda orotraqueal y se conectaron a un ventilador (Harvard, Apparatus) con un vaporizador (Isotec 3, Ohmeda), manteniendo una frecuencia respiratoria de 20 resp/min, un volumen corriente de 15 mL/kg y una  $FiO_2$  del 100%. La anestesia se mantuvo con isoflurano al 2.0% durante todo el acto quirúrgico (Figura 14).

A los animales, se les realizó tricotomía, asepsia y antisepsia de la zona del cuello, con límite proximal en la región de la mandíbula y con límite distal en la región supraesternal que se delimitó con campos quirúrgicos. Se realizó disección de los planos superficiales hasta llegar a la tráquea que en el caso del primer donador, se disecó en toda su longitud y circunferencia utilizando las técnicas quirúrgicas convencionales (Figura 15). Sobre una charola de mayo apoyada en una cámara de hielo, se realizó una disección fina de la tráquea (Figura 16). Cada uno de los 6 animales a los que se les practicó la reparación quirúrgica fue donador de un segmento traqueal y receptor de un segmento traqueal liofilizado.

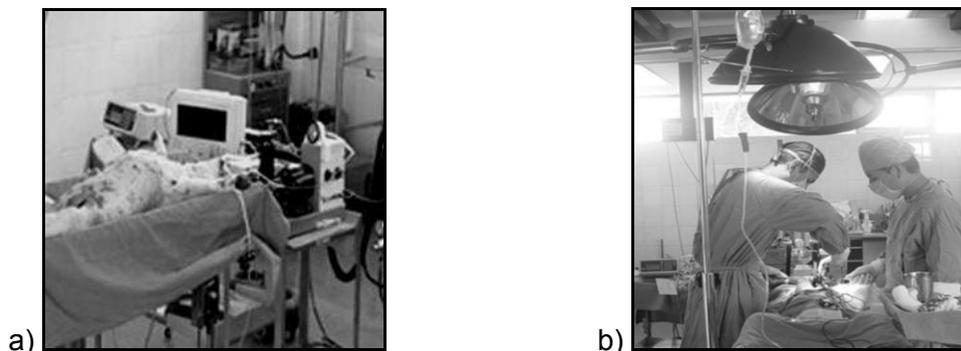


Figura 14. a) Se observa un canino en posición decúbito dorsal previo a la intervención quirúrgica, además de los aparatos requeridos para registrar los signos vitales del animal, el ventilador y el vaporizador, b) Médicos cirujanos realizando la cirugía sobre el canino



Figura 15. Disección de la tráquea



Figura 16. Disección fina de la tráquea

### 5.7. Obtención de los segmentos traqueales

Inmediatamente después, se realizó la resección del cartílago cricoides el cual fue eliminado del estudio. La tráquea del primer donador se cortó en segmentos de doce anillos (Figura 17) que al igual que los segmentos traqueales de 12 anillos de los perros restantes, se lavaron con una solución glucosada al 50% (Solución DX-50 PISA), adicionada con 20 mL de una solución de manitol al 20% (Manitol al 20% PISA), 5000U de heparina (Inhepar, PISA), 1g de estreptomina (Sulfastrep, PISA), 1000000U de penicilina (PISA) y 0.1 mL de una solución antibiótica y antimicótica (Ab-Am, SIGMA, A5955) por cada litro de solución.

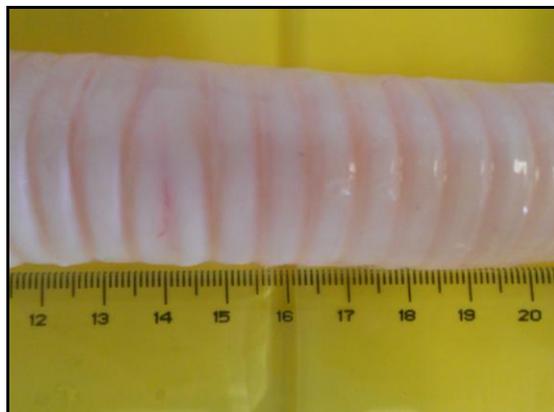


Figura 17. Segmento traqueal en forma previa a la liofilización

### 5.8. Preparación del anillo traqueal pre-preservación

De cada uno de los segmentos traqueales de 12 anillos y con ayuda de un bisturí se separó el anillo de uno de los extremos. Este anillo se sumergió en una solución de formaldehído amortiguado al 10% durante 24 horas y fue utilizado para las evaluaciones, microscópica e inmunohistoquímica, realizadas en forma previa a la liofilización.<sup>41-43</sup> De esta manera quedaron segmentos traqueales de once anillos que fueron sometidos a una preservación mediante liofilización.

### 5.9. Liofilización de los segmentos traqueales

Inmediatamente después de separar el anillo pre-liofilización, los segmentos traqueales se colocaron sobre un soporte de polietileno (Figura 18) y posteriormente, se introdujeron en un matraz Erlenmeyer que se selló mediante la colocación de un tapón de polipropileno cubierto con papel parafilm. De acuerdo con lo que menciono en el inciso 1.4 una vez que el matraz se encontró perfectamente sellado, se almacenó dentro de un congelador (REVCO), en el que se mantuvo a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de congelación, el matraz se colocó en una liofilizadora (Labconco) a una temperatura de  $-55^{\circ}\text{C}$  y una presión de  $1.33 \times 10^{-6}$  kPa durante 24 horas (Figura 19). Con estas condiciones de liofilización los segmentos traqueales estuvieron bajo los lineamientos sugeridos para tejidos biológicos.<sup>21</sup> Concluido el tiempo de liofilización, los injertos traqueales se desmontaron del soporte de polietileno y se empaquetaron para su esterilización con óxido de etileno (Figura 20). Las muestras a esterilizar son enviadas a la unidad C.E.Y.E. ubicada dentro del INER, en donde los técnicos responsables se encargan de procesarlas. La esterilización con óxido de etileno se lleva a cabo en un esterilizador de gas Areador Steri-Vac-5XL durante una hora en una atmósfera de 736 mg de óxido de etileno / litro de aire, con un tiempo de aireación de 12 horas. Los injertos traqueales así liofilizados y esterilizados se almacenaron en los mismos recipientes donde se empaquetaron para su esterilización, a temperatura ambiente ( $T=20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante 60 días (Figura 21).

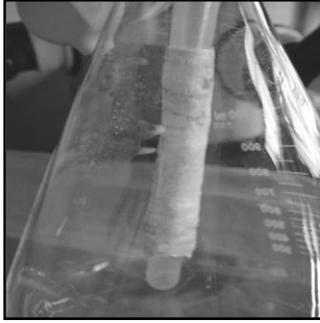


Figura 18. Segmento traqueal montado sobre un soporte de polietileno y colocado dentro del matraz Erlenmeyer



Figura 19. Liofilizadora Labconco



Figura 20. Dispositivo montado en la liofilizadora

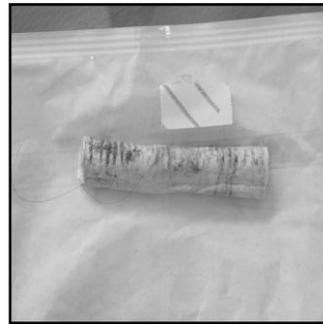


Figura 21. Segmento traqueal liofilizado, empaquetado y esterilizado listo para su rehidratación y utilización como bioprótesis en reparación quirúrgica

### 5.10. Obtención del anillo traqueal post-preservación

Previo a la reconstrucción traqueal, los segmentos se rehidrataron en solución salina fisiológica mantenida en hielo (0.9% de NaCl, alrededor de 4°C), durante 30 minutos.<sup>26,27</sup> La inmersión en esta solución busca la recuperación de los fluidos de las células de los segmentos traqueales, de los cuales el agua fue eliminada durante el proceso de liofilización. Se consideró con base en la literatura<sup>26,27</sup>, que un tiempo de 30 minutos es necesario y suficiente para rehidratar el tejido. Concluida la rehidratación, con ayuda de un bisturí se separó el anillo de uno de los extremos. Este anillo se sumergió en una solución de formaldehído amortiguado al 10% durante 24 horas y fue utilizado para las evaluaciones, microscópica e inmunohistoquímica realizadas en forma posterior a la liofilización.<sup>41-43</sup> El resto del segmento se utilizó para realizar una reconstrucción traqueal de 10 anillos.

### 5.11. Obtención del anillo traqueal post-trasplante / Fin del estudio

Inmediatamente después de practicar la eutanasia, se procuró el segmento traqueal liofilizado utilizado en la reparación quirúrgica, procediendo conforme a las técnicas quirúrgicas convencionales. Con ayuda de un bisturí se retiró el anillo de uno de los extremos (anillo de fin del estudio) y se sumergió en una solución amortiguada de formaldehído al 10% durante 24 horas y fue utilizado para las evaluaciones, microscópica e inmunohistoquímica, realizadas en forma posterior al reemplazo traqueal.<sup>41-43</sup>

### 5.12. Técnica quirúrgica del receptor

Previo a la reconstrucción traqueal, los animales se prepararon de la misma forma descrita previamente para los donadores. Empleando las técnicas quirúrgicas convencionales, se disecó y resecó un segmento de tráquea de 12 anillos, que fue reemplazado por un segmento liofilizado y rehidratado de 10 anillos de longitud (Figuras 22-24).



Figura 22. Presentación del segmento traqueal liofilizado



Figura 23. Resección y disección del segmento traqueal nativo para la colocación del segmento traqueal liofilizado y rehidratado



Figura 24. Reemplazo traqueal concluido

### **5.13. Evaluaciones de los segmentos traqueales**

#### **5.13.1. Macroscópica**

Los segmentos traqueales fueron evaluados: 1) en forma previa a la liofilización, inmediatamente después de que fueron lavados con la solución glucosada, 2) en forma posterior a la liofilización y rehidratación (previa a la realización de la cirugía) y 3) al concluir el estudio, después de que fueron utilizados como bioprótesis. Cada una incluyó un registro de la integridad estructural del segmento traqueal, mediante apreciación visual de los cambios de coloración en los anillos de cartílago, la ocurrencia de fracturas y la posible pérdida de la continuidad estructural de los anillos.

#### **5.13.2. Microscópica**

En todos los grupos de estudio, la evaluación microscópica se realizó en forma inmediata posterior a las evaluaciones macroscópicas (pre-liofilización, post-liofilización-rehidratación y al finalizar el estudio). Los anillos traqueales obtenidos en cada uno de los eventos fueron sumergidos en una solución amortiguada de formaldehído al 10%, para su fijación durante 24 horas, inclusión en bloques de parafina y obtención de cortes de 2 y 4 $\mu$  de grosor para las tinciones con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson y para la determinación inmunohistoquímica de caspasa-3.

##### **5.13.2.1. Cartílago hialino**

Con ayuda de un contador manual (THOMAS SCIENTIFIC, 3297R20) y empleando un microscopio óptico (OLYMPUS optical, CH30) se hizo un conteo celular en cada laminilla, de la siguiente manera:

El conteo celular se realizó a lo largo de toda el área del anillo de cartílago traqueal, utilizando las laminillas teñidas con hematoxilina-eosina, desde el extremo derecho hasta el extremo izquierdo (Figura 25). En particular, para evaluar el comportamiento de la integridad y degeneración celular, el conteo celular se realizó tomando en cuenta sólo tres zonas del anillo de cartílago, las

cuales fueron: el extremo izquierdo, el extremo derecho y la región central. Este conteo incluyó el porcentaje de condrocitos sin alteraciones aparentes, condrocitos con alteraciones (picnosis, cariorexis y cariólisis) y de lagunas vacías (Figura 26). Este conteo se repitió cuatro veces y fue posible obtener un promedio para cada una de las morfologías convenidas. El análisis estadístico de los datos incluyó la prueba de análisis de varianza (ANDEVA) con Tukey y, t-student sólo para la evaluación de la tinción con hematoxilina-eosina. El tratamiento de los resultados se realizó mediante el programa estadístico SPSS versión 12.0 para Windows.<sup>51-53</sup>

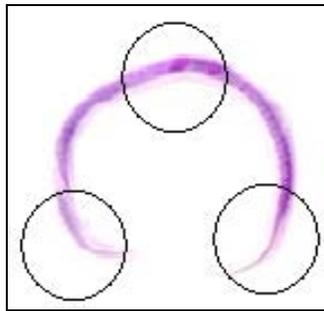


Figura 25. Anillo de cartílago traqueal en donde se realizó el conteo celular a lo largo de éste, las zonas encerradas en un círculo, extremo derecho, región central y extremo izquierdo, se tomaron en cuenta para evaluar el comportamiento de la integridad y degeneración celular

<b>Morfología celular</b>				
Condrocitos sin alteraciones aparentes	Condrocitos con picnosis	Condrocitos con cariorexis	Condrocitos con cariólisis	Lagunas vacías
				

Figura 26. Se muestran las cinco morfologías convenidas analizadas en los anillos de cartílago traqueal

### 5.13.2.2. Estudio histológico

En cada uno de los anillos de cartílago, se evaluó el comportamiento de las cinco morfologías celulares, la continuidad y el desprendimiento del epitelio respiratorio a lo largo de la mucosa traqueal, la integridad de las glándulas, de las fibras de músculo liso y de las fibras de colágena, utilizando las laminillas teñidas con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson (Figura 27).

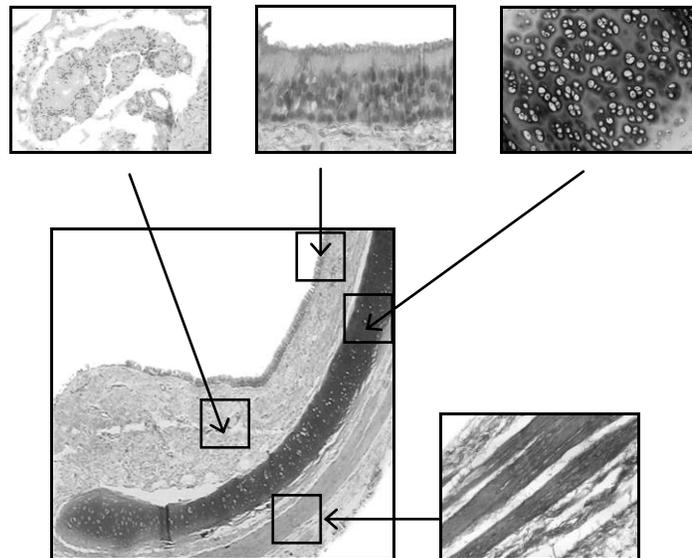


Figura 27. Zonas del tejido traqueal consideradas para la evaluación microscópica

### 5.13.2.3. Estudio inmunohistoquímico de caspasa-3

La determinación de caspasa-3 se realizó mediante la técnica inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo [Caspase 3 (CPP32) Ab-4, Rabbit Polyclonal Antibody, Neo Markers, Lab Vision, Co. RB-1197], el sistema biotina-avidina-peroxidasa, tinción con aminoetilcarbazol y contratinción con hematoxilina. En todos los ensayos se incluyeron como control negativo, una laminilla de tejido traqueal a la que no se le adicionó anticuerpo durante la determinación (Figura 28) y, como control positivo, una muestra de tejido traqueal con expresión positiva previamente identificada. Ambos controles siempre fueron los mismos y se incluyeron en todos los ensayos realizados. La expresión positiva para caspasa-3 en las células del cartílago se observa de color marrón (Figura 29).

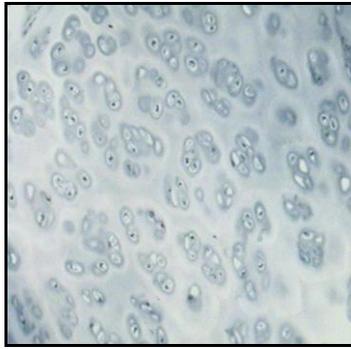


Figura 28. Condrocitos sin expresión de caspasa-3 en el cartílago traqueal (control negativo)

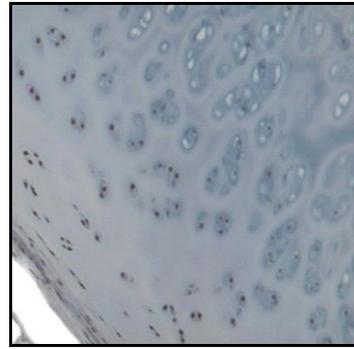


Figura 29. Condrocitos con expresión positiva de caspasa-3 (células color marrón)

#### 5.13.2.4. Técnica inmunohistoquímica para determinar caspasa-3

##### a) Preparación del tejido

Los cortes de tejido traqueal se colocaron en canastillas y se incubaron durante 20 minutos dentro de una estufa mantenida a una temperatura a 56°C para su desparafinación. Inmediatamente después, el tejido se rehidrató y clarificó mediante una inmersión seriada en xilol (10 minutos), etanol al 70% (2 minutos), etanol al 90% (2 minutos), etanol absoluto (2 minutos) y agua (10 minutos).<sup>41-43</sup>

##### b) Exposición y recuperación del antígeno

Concluida la preparación del tejido, las laminillas se colocaron en una caja de Coplin sumergidas en una solución amortiguadora de citratos a pH=6. La recuperación del antígeno se realizó colocando la caja de Coplin en baño María a una temperatura de 80°C durante 20 minutos. Estas condiciones de trabajo fueron estandarizadas en la Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias para manipular tejido traqueal. El cartílago de los anillos traqueales es muy lábil y tiende a desprenderse de las laminillas cuando la recuperación del antígeno se realiza utilizando olla express para inmunohistoquímica o mediante horno de microondas, a diferencia de otros tejidos que soportan cambios bruscos de temperatura. Una vez concluido el tiempo de recuperación del antígeno, la caja de Coplin se retiró del baño María y se dejó enfriar a temperatura ambiente.<sup>41-43</sup>

c) Eliminación de la peroxidasa endógena

Una vez alcanzada la temperatura ambiente, las laminillas se sometieron a tres lavados seriados de cinco minutos con solución salina amortiguada Tris con Tween 20 (TBST, por sus siglas en inglés), la cual se preparó con 50 mL de una solución amortiguadora Tris a pH=7.6, 100 mL de una solución de NaCl 3M y 1 mL de Tween 20, por cada litro de solución. Una vez terminados los lavados y con la finalidad de concentrar el área de reacción antígeno-anticuerpo, se delimitó el tejido traqueal con ayuda de un marcador (Mini Pap-Pen, Invitrogen). Las laminillas se colocaron dentro de una cámara de incubación húmeda mantenida a temperatura ambiente. Se adicionaron 100µL de una solución de peróxido de hidrógeno al 3% y transcurridos 15 minutos, se realizaron tres lavados seriados de cinco minutos cada uno con solución TBST.<sup>41-43</sup>

d) Bloqueo del pegado inespecífico / Primer anticuerpo

Se adicionaron 100µL de suero bloqueador y después de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados seriados de cinco minutos cada uno con solución TBST. Se adicionaron 100µL del primer anticuerpo (dilución 1:100 en TBST) complementado con suero bloqueador. Las laminillas se incubaron en un refrigerador (SANYO, Medicoool) a una temperatura de 4°C durante 24 horas.<sup>41-43</sup>

e) Reacción streptavidina-peroxidasa

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados seriados de cinco minutos cada uno con solución TBST. Se adicionaron 100 µL del anticuerpo biotilnado y después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados seriados de cinco minutos cada uno con solución TBST y se adicionaron 100 µL del conjugado streptavidina-peroxidasa. Después de 15 minutos de incubación, se realizaron tres lavados seriados de cinco minutos cada uno con solución TBST.<sup>41-43</sup>

f) Visualización de la reacción antígeno-anticuerpo

Se adicionaron 100 $\mu$ L de una solución acuosa de aminoetilcarbazol diluido en peróxido de hidrógeno y después de cinco minutos de incubación a temperatura ambiente, las laminillas se enjuagaron en agua corriente en forma previa a la adición de una gota de una solución de hematoxilina. Después de treinta segundos, las laminillas se enjuagaron con agua corriente en forma previa a la incorporación de 100 $\mu$ L de una solución saturada de carbonato de litio y se montaron en medio acuoso.<sup>41-43</sup>

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Generales**

Se liofilizaron 18 segmentos traqueales. De éstos, se utilizaron 6 como bioprótesis en seis animales a los que se les realizó una reparación quirúrgica de 10 anillos de longitud.

### **6.2. Evaluación macroscópica del segmento traqueal**

En forma inmediata posterior a la procuración y lavado con solución glucosada, los 18 segmentos traqueales se observan de color rosado, se mantienen flexibles y viscosos al tacto (Figura 30a).

Una vez que los 18 segmentos traqueales fueron liofilizados, en ninguno se observó la presencia de fracturas, ni pérdida de la continuidad estructural entre los anillos. Sin embargo, todos presentaron cambios evidentes en la textura y en la consistencia del tejido por efecto de la liofilización que distan notablemente de la consistencia original de la tráquea, ya que éstos se observaron de color blanco, rígidos al tacto, con apariencia acartonada, pérdida de la flexibilidad y con retracción y plegamiento de la membrana (Figuras 30b y 30c). Estos cambios persisten hasta el momento de la rehidratación y con excepción de la coloración que permanece afectada en términos del color rosado original, ya que quedan blancuzcos, la consistencia del tejido traqueal tiende a recuperarse en forma posterior a la rehidratación (Figura 30d).

Al finalizar el estudio, el único segmento traqueal recuperado (procurado después de que utilizó en la reparación quirúrgica), se observó de color blanco y flexible al tacto. Los otros cinco segmentos traqueales liofilizados que fueron utilizados como bioprótesis sufrieron necrosis, por lo que resultó imposible realizar tanto la evaluación macroscópica como la evaluación microscópica de los mismos (Figura 30e).



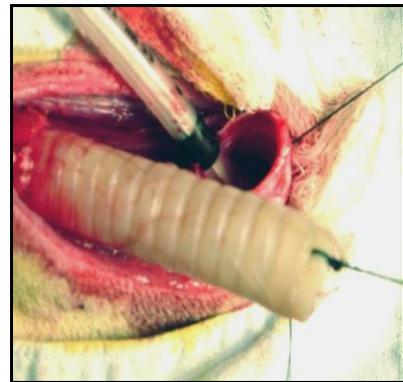
a)



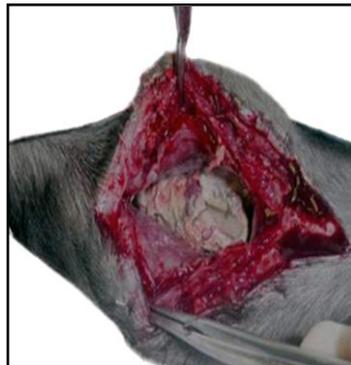
b)



c)



d)



e)

Figura 30. Evaluación macroscópica del segmento traqueal: a) Inmediatamente después de ser procurado y lavado con solución glucosada, b) Durante el procedimiento de la liofilización, en donde se empiezan a observar cambios en la textura, consistencia y coloración (zonas blancas), c) Post-liofilizado se observan los cambios en la textura, consistencia y coloración del segmento traqueal, d) Post-liofilizado/rehidratado/pre-trasplante, permanecen los cambios en la coloración y e) Aspecto que presentaron los segmentos traqueales necrosados

### 6.3. Cartílago hialino

#### 6.3.1. Evaluación microscópica, pre-liofilización y post-liofilización (n=18 segmentos traqueales)

Los porcentajes obtenidos de condrocitos: a) sin alteraciones aparentes, b) con picnosis, c) con cariorrexis, d) con cariólisis y e) de lagunas vacías, encontrados en las cuatro evaluaciones realizadas para cada uno de los 18 anillos de cartílago, obtenidos en forma previa y posterior a la liofilización de los segmentos traqueales, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Se presentan los valores de los porcentajes de las cuatro evaluaciones realizadas en los 18 segmentos traqueales: 18 anillos de cartílago previos a la liofilización y 18 anillos de cartílago posteriores a la liofilización

Pre-Liofilización						
Morfología celular						
Laminilla	Evaluación	Condrocitos sin alteraciones aparentes (%)	Condrocitos con picnosis (%)	Condrocitos con cariorrexis (%)	Condrocitos con cariólisis (%)	Lagunas vacías (%)
1	1	21.20	26.40	0.40	13.60	38.40
1	2	22.20	33.20	0.80	10.20	33.60
1	3	8.20	29.60	0.00	51.40	10.80
1	4	5.80	35.40	0.60	45.20	13.00
2	1	22.60	27.20	0.20	12.80	37.20
2	2	24.80	30.40	0.20	12.00	32.60
2	3	11.60	21.00	0.40	50.00	17.00
2	4	8.20	31.80	0.00	47.20	12.80
3	1	15.60	28.20	4.40	13.80	38.00
3	2	13.60	33.20	2.80	11.20	39.20
3	3	4.20	7.60	2.00	32.40	53.80
3	4	4.80	8.00	0.40	29.40	57.40
4	1	13.00	31.40	0.00	30.20	25.40
4	2	14.80	25.80	0.00	29.20	30.20
4	3	11.20	26.60	0.20	34.20	27.80
4	4	17.60	27.60	0.00	30.40	24.40
5	1	9.00	28.80	0.00	32.60	29.60
5	2	11.00	29.20	0.00	33.40	26.40
5	3	13.80	29.40	0.00	29.40	27.40
5	4	12.80	31.20	0.00	27.80	28.20
6	1	11.80	22.80	0.00	33.00	32.40
6	2	15.80	18.80	0.00	30.00	35.40

6	3	11.20	27.20	0.00	25.40	36.20
6	4	11.20	26.40	0.00	28.20	34.20
7	1	20.20	18.80	5.40	4.80	50.80
7	2	14.20	19.60	1.60	6.00	58.60
7	3	17.40	23.00	0.00	13.40	46.20
7	4	15.40	23.40	0.00	6.60	54.60
8	1	18.00	25.20	2.80	17.40	36.60
8	2	18.80	27.20	1.60	14.20	38.20
8	3	11.00	12.60	1.00	25.00	50.40
8	4	12.20	14.00	0.60	25.00	48.20
9	1	15.60	23.20	2.20	21.00	38.00
9	2	11.20	27.00	2.20	21.40	38.20
9	3	11.00	14.20	1.00	24.20	49.60
9	4	10.00	12.60	1.00	21.40	55.00
10	1	15.00	25.20	2.00	21.80	36.00
10	2	13.60	26.40	2.20	20.20	37.60
10	3	9.00	13.40	2.00	27.00	48.60
10	4	8.00	16.00	1.00	21.40	53.60
11	1	12.00	29.60	0.00	8.00	50.40
11	2	16.00	25.20	0.00	5.60	53.20
11	3	0.80	13.00	0.00	65.40	20.80
11	4	0.20	10.20	0.00	71.40	18.20
12	1	29.60	36.20	7.00	9.60	17.60
12	2	19.80	51.00	5.40	7.60	16.20
12	3	24.60	24.20	0.80	23.80	26.60
12	4	26.00	32.40	0.00	14.00	27.60
13	1	12.00	28.00	2.60	15.20	42.20
13	2	11.80	26.40	2.40	17.20	42.20
13	3	6.60	26.80	0.00	32.40	34.20
13	4	7.40	29.00	0.00	36.80	26.80
14	1	15.40	28.40	1.40	17.40	37.40
14	2	15.20	24.60	0.40	19.60	40.20
14	3	12.40	25.60	0.60	24.80	36.60
14	4	12.60	28.80	0.40	27.60	30.60
15	1	23.20	37.60	2.80	16.60	19.80
15	2	22.60	41.80	2.00	11.60	22.00
15	3	25.80	26.60	1.20	20.20	26.20
15	4	22.40	29.60	1.60	17.40	29.00
16	1	17.00	30.00	0.00	31.00	22.00
16	2	15.60	29.00	0.00	26.00	29.40
16	3	13.20	30.00	0.00	27.20	29.60
16	4	17.20	28.40	0.00	25.20	29.20
17	1	19.60	31.40	0.00	17.20	31.80
17	2	18.00	28.80	0.00	22.80	30.40
17	3	15.80	31.60	0.20	22.40	30.00
17	4	17.80	28.60	0.00	26.00	27.60
18	1	16.00	30.40	0.00	23.00	30.60
18	2	20.20	31.60	0.00	21.80	26.40
18	3	16.60	33.20	0.00	21.40	28.80
18	4	21.00	31.60	0.40	19.60	27.40

<b>Post-Liofilización</b>						
<b>Morfología celular</b>						
Laminilla	Evaluación	Condrocitos sin alteraciones aparentes (%)	Condrocitos con picnosis (%)	Condrocitos con cariorrexis (%)	Condrocitos con cariólisis (%)	Lagunas vacías (%)
19	1	4.00	16.20	2.80	23.20	53.80
19	2	3.60	12.00	2.20	22.20	60.00
19	3	0.40	5.40	0.00	75.40	18.80
19	4	2.20	4.60	0.00	82.60	10.60
20	1	3.40	13.40	1.00	29.20	53.00
20	2	3.20	13.80	1.00	26.20	55.80
20	3	3.20	9.80	0.00	63.80	23.20
20	4	3.40	11.80	0.40	69.40	15.00
21	1	1.60	25.80	0.00	4.60	68.00
21	2	3.60	22.40	0.00	5.60	68.40
21	3	0.40	4.20	0.00	52.00	43.40
21	4	0.60	7.40	0.00	36.60	55.40
22	1	2.20	10.20	0.00	45.80	41.80
22	2	2.60	10.60	0.00	39.80	47.00
22	3	1.80	10.00	0.00	38.00	50.20
22	4	2.40	12.00	0.00	38.80	46.80
23	1	2.40	15.00	0.00	33.20	49.40
23	2	5.40	14.00	0.00	34.20	46.40
23	3	3.80	14.20	0.00	32.60	49.40
23	4	3.80	15.00	0.00	31.80	49.40
24	1	2.40	11.80	0.00	36.40	49.40
24	2	2.60	11.80	0.00	40.00	45.60
24	3	1.20	11.40	0.00	40.60	46.80
24	4	2.40	15.00	0.00	33.80	48.80
25	1	15.60	17.40	0.40	17.80	48.80
25	2	14.20	20.40	0.20	18.40	46.80
25	3	14.60	18.60	0.00	15.40	51.40
25	4	11.40	15.60	0.00	18.20	54.80
26	1	9.20	27.60	1.20	14.00	48.00
26	2	7.40	26.40	0.40	9.40	56.40
26	3	0.00	6.00	0.00	72.80	21.20
26	4	0.00	8.20	0.00	65.20	26.60
27	1	1.60	25.80	0.00	4.60	68.00
27	2	3.60	22.40	0.00	5.60	68.40
27	3	0.40	4.20	0.00	52.00	43.40
27	4	0.60	7.40	0.00	36.60	55.40
28	1	4.20	17.80	0.00	43.00	35.00
28	2	3.00	18.00	0.00	36.20	42.80
28	3	3.80	15.00	0.00	42.80	38.40
28	4	2.60	17.80	0.00	37.60	42.00
29	1	11.40	24.60	0.80	11.20	52.00
29	2	12.00	24.20	0.80	11.60	51.40
29	3	6.60	14.00	0.00	50.40	29.00

29	4	7.80	12.60	0.00	57.00	22.60
30	1	19.20	33.00	0.60	12.20	35.00
30	2	18.20	30.60	0.40	15.80	35.00
30	3	0.40	0.40	0.00	78.80	20.40
30	4	0.60	1.40	0.20	84.20	13.60
31	1	3.00	15.60	0.00	41.40	40.00
31	2	4.00	15.40	0.00	35.80	44.80
31	3	2.40	19.60	0.00	34.00	44.00
31	4	0.40	19.40	0.00	35.20	45.00
32	1	3.80	16.80	0.00	34.40	45.00
32	2	3.00	16.80	0.00	34.40	45.80
32	3	3.40	14.60	0.00	38.00	44.00
32	4	5.60	18.40	0.00	32.40	43.60
33	1	4.00	19.80	0.00	34.20	42.00
33	2	4.60	19.20	0.00	28.80	47.40
33	3	2.80	17.00	0.00	35.60	44.60
33	4	5.20	17.40	0.00	34.00	43.40
34	1	5.80	18.20	0.00	33.40	42.60
34	2	8.00	16.40	0.00	34.60	41.00
34	3	8.40	15.20	0.00	31.80	44.60
34	4	7.80	19.80	0.00	27.00	45.40
35	1	6.20	21.00	0.00	31.60	41.20
35	2	7.00	15.00	0.00	32.80	45.20
35	3	5.00	18.40	0.00	31.60	45.00
35	4	4.60	17.60	0.00	33.40	44.40
36	1	3.80	20.20	0.00	32.60	43.40
36	2	5.20	17.60	0.00	31.40	45.80
36	3	2.80	20.20	0.00	33.80	43.20
36	4	2.80	19.60	0.00	33.80	43.80

Los promedios determinados por las cuatro evaluaciones realizadas en cada uno de los 18 anillos de cartílago en forma previa y posterior a la liofilización, se calcularon a partir de la Tabla 2 y se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Se presentan los valores de los promedios de cada uno de los 18 anillos de cartílago previos a la liofilización y 18 anillos de cartílago posteriores a la liofilización

Laminilla	Pre-Liofilización					Total (%)
	Morfología celular					
	Condrocitos sin alteraciones aparentes (%)	Condrocitos con picnosis (%)	Condrocitos con cariorrexis (%)	Condrocitos con cariólisis (%)	Lagunas vacías (%)	
1	14.35	31.15	0.45	30.10	23.95	100.00
2	16.80	27.60	0.20	30.50	24.90	100.00

3	9.55	19.25	2.40	21.70	47.10	100.00
4	14.15	27.85	0.05	31.00	26.95	100.00
5	11.65	29.65	0.00	30.80	27.90	100.00
6	12.50	23.80	0.00	29.15	34.55	100.00
7	16.80	21.20	1.75	7.70	52.55	100.00
8	15.00	19.75	1.50	20.40	43.35	100.00
9	11.95	19.25	1.60	22.00	45.20	100.00
10	11.40	20.25	1.80	22.60	43.95	100.00
11	7.25	19.50	0.00	37.60	35.65	100.00
12	25.00	35.95	3.30	13.75	22.00	100.00
13	9.45	27.55	1.25	25.40	36.35	100.00
14	13.90	26.85	0.70	22.35	36.20	100.00
15	23.50	33.90	1.90	16.45	24.25	100.00
16	15.75	29.35	0.00	27.35	27.55	100.00
17	17.80	30.10	0.05	22.10	29.95	100.00
18	18.45	31.70	0.10	21.45	28.30	100.00
<b>Post-Liofilización</b>						
<b>Morfología celular</b>						
Laminilla	Condrocitos sin alteraciones aparentes (%)	Condrocitos con picnosis (%)	Condrocitos con cariorrexis (%)	Condrocitos con cariólisis (%)	Lagunas vacías (%)	Total (%)
19	2.55	9.55	1.25	50.85	35.80	100.00
20	3.30	12.20	0.60	47.15	36.75	100.00
21	1.55	14.95	0.00	24.70	58.80	100.00
22	2.25	10.70	0.00	40.60	46.45	100.00
23	3.85	14.55	0.00	32.95	48.65	100.00
24	2.15	12.50	0.00	37.70	47.65	100.00
25	13.95	18.00	0.15	17.45	50.45	100.00
26	4.15	17.05	0.40	40.35	38.05	100.00
27	1.55	14.95	0.00	24.70	58.80	100.00
28	3.40	17.15	0.00	39.90	39.55	100.00
29	9.45	18.85	0.40	32.55	38.75	100.00
30	9.60	16.35	0.30	47.75	26.00	100.00
31	2.45	17.50	0.00	36.60	43.45	100.00
32	3.95	16.65	0.00	34.80	44.60	100.00
33	4.15	18.35	0.00	33.15	44.35	100.00
34	7.50	17.40	0.00	31.70	43.40	100.00
35	5.70	18.00	0.00	32.35	43.95	100.00
36	3.65	19.40	0.00	32.90	44.05	100.00

El porcentaje promedio  $\pm$  error estándar (EE) de condrocitos: a) sin alteraciones aparentes, b) con picnosis, c) con cariorrexis, d) con cariólisis y e) de lagunas vacías, se calculó a partir de los valores de los promedios de la Tabla 3, para así obtener el porcentaje total de las diferentes morfologías celulares

analizadas y, con esto, poder interpretar su comportamiento. Los resultados se muestran en los siguientes incisos,

**a) Condrocitos sin alteraciones aparentes**

El porcentaje promedio de condrocitos sin alteraciones aparentes fue de  $14.73 \pm 0.69$ , en forma previa a la liofilización y de  $4.73 \pm 0.45$ , en forma posterior a la liofilización. Estos resultados se muestran en la Tabla 4 y se ilustran en la Figura 31.

**b) Condrocitos con picnosis**

El porcentaje promedio de condrocitos con picnosis fue de  $26.37 \pm 0.76$ , en forma previa a la liofilización y de  $15.78 \pm 0.48$ , en forma posterior a la liofilización. Estos resultados se muestran en la Tabla 4 y se ilustran en la Figura 31.

**c) Condrocitos con cariorrexis**

El porcentaje promedio de condrocitos con cariorrexis fue de  $0.94 \pm 0.13$ , en forma previa a la liofilización y de  $0.17 \pm 0.05$ , en forma posterior a la liofilización. Estos resultados se muestran en la Tabla 4 y se ilustran en la Figura 31.

**d) Condrocitos con cariólisis**

El porcentaje promedio de condrocitos con cariólisis fue de  $24.02 \pm 1.07$ , en forma previa a la liofilización y de  $35.45 \pm 1.26$ , en forma posterior a la liofilización. Estos resultados se muestran en la Tabla 4 y se ilustran en la Figura 31.

**e) Lagunas vacías**

El porcentaje promedio de lagunas vacías fue de  $33.93 \pm 1.25$ , en forma previa a la liofilización y de  $43.86 \pm 1.16$ , en forma posterior a la liofilización. Estos resultados se muestran en la Tabla 4 y se ilustran en la Figura 31.

Tabla 4. Porcentajes promedio  $\pm$  EE de las diferentes morfologías celulares analizadas, en forma previa y posterior a la liofilización de los segmentos traqueales (n=18 anillos) y su valor de significancia (ANDEVA:  $p < 0.05$ )

Morfología celular	Pre-Liofilización	Post-Liofilización	Significancia (p)
	Valores promedio $\pm$ EE (%)		
Condrocitos sin alteraciones aparentes	14.73 $\pm$ 0.69	4.73 $\pm$ 0.45	0.00
Condrocitos con picnosis	26.37 $\pm$ 0.76	15.78 $\pm$ 0.48	0.00
Condrocitos con cariorrexis	0.94 $\pm$ 0.13	0.17 $\pm$ 0.05	0.00
Condrocitos con cariólisis	24.02 $\pm$ 1.07	35.45 $\pm$ 1.26	0.00
Lagunas vacías	33.93 $\pm$ 1.25	43.86 $\pm$ 1.16	0.00
<i>Porcentaje total</i>	<i>100.00<math>\pm</math>0.64</i>	<i>100.00<math>\pm</math>0.68</i>	

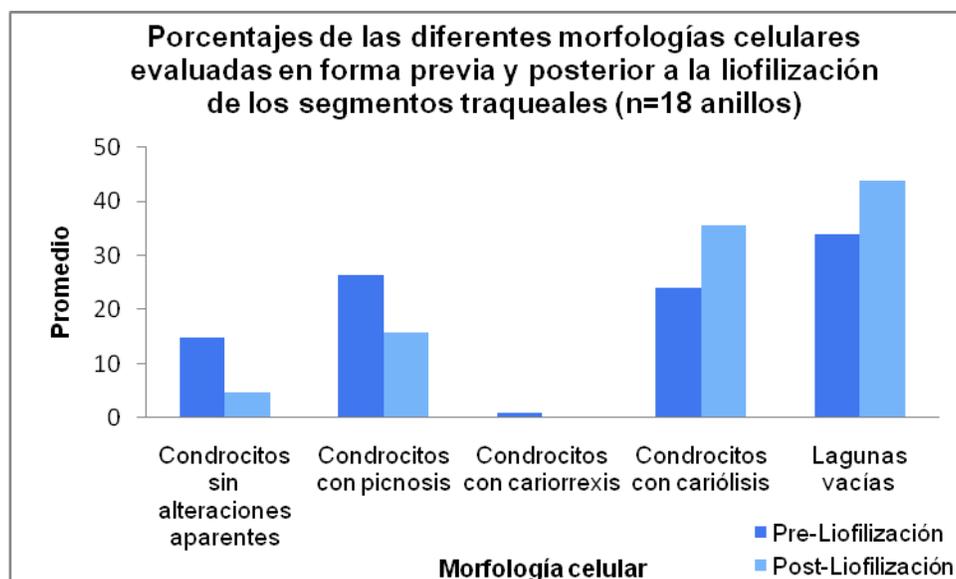


Figura 31. Gráfica de los porcentajes promedio de las diferentes morfologías celulares evaluadas en forma previa y posterior a la liofilización de los segmentos traqueales (pre y post-liofilización n=18 anillos), en todos los parámetros evaluados (ANDEVA:  $p < 0.05$ )

Al realizar la comparación entre los porcentajes obtenidos en forma previa y posterior a la liofilización de los segmentos traqueales (n=18 anillos), se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todas las morfologías analizadas (ANDEVA:  $p < 0.05$ ), como se observa en los valores de significancia (p) de la Tabla 3.

Se observó que el porcentaje de condrocitos sin alteraciones aparentes, con picnosis y con cariorrexis disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) por efecto de la liofilización y el porcentaje de condrocitos con cariólisis y de lagunas vacías, aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) después de la liofilización.

### 6.3.2. Evaluación microscópica pre-liofilización, post-liofilización y de fin del estudio (n=6 segmentos traqueales)

Los porcentajes obtenidos de condrocitos: a) sin alteraciones aparentes, b) con picnosis, c) con cariorrexis, d) con cariólisis y e) de lagunas vacías, encontrados en las cuatro evaluaciones realizadas para cada uno de los 6 anillos de cartílago, obtenidos en forma previa y posterior a la liofilización de los segmentos traqueales, así como al finalizar el estudio (después de que fueron utilizados como bioprótesis), se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Se muestran los valores de los porcentajes de las cuatro evaluaciones realizadas en los 6 segmentos traqueales: 6 anillos de cartílago previos a la liofilización, 6 anillos de cartílago posteriores a la liofilización, así como 1 anillo de cartílago al finalizar el estudio

<b>Pre-Liofilización</b>						
<b>Morfología celular</b>						
Laminilla	Evaluación	Condrocitos sin alteraciones aparentes (%)	Condrocitos con picnosis (%)	Condrocitos con cariorrexis (%)	Condrocitos con cariólisis (%)	Lagunas vacías (%)
7	1	20.20	18.80	5.40	4.80	50.80
7	2	14.20	19.60	1.60	6.00	58.60
7	3	17.40	23.00	0.00	13.40	46.20
7	4	15.40	23.40	0.00	6.60	54.60
8	1	18.00	25.20	2.80	17.40	36.60
8	2	18.80	27.20	1.60	14.20	38.20
8	3	11.00	12.60	1.00	25.00	50.40
8	4	12.20	14.00	0.60	25.00	48.20
9	1	15.60	23.20	2.20	21.00	38.00
9	2	11.20	27.00	2.20	21.40	38.20
9	3	11.00	14.20	1.00	24.20	49.60
9	4	10.00	12.60	1.00	21.40	55.00
10	1	15.00	25.20	2.00	21.80	36.00
10	2	13.60	26.40	2.20	20.20	37.60
10	3	9.00	13.40	2.00	27.00	48.60
10	4	8.00	16.00	1.00	21.40	53.60

11	1	12.00	29.60	0.00	8.00	50.40
11	2	16.00	25.20	0.00	5.60	53.20
11	3	0.80	13.00	0.00	65.40	20.80
11	4	0.20	10.20	0.00	71.40	18.20
12	1	29.60	36.20	7.00	9.60	17.60
12	2	19.80	51.00	5.40	7.60	16.20
12	3	24.60	24.20	0.80	23.80	26.60
12	4	26.00	32.40	0.00	14.00	27.60
<b>Post-Liofilización</b>						
<b>Morfología celular</b>						
Laminilla	Evaluación	Condrocitos sin alteraciones aparentes (%)	Condrocitos con picnosis (%)	Condrocitos con cariorrexis (%)	Condrocitos con cariólisis (%)	Lagunas vacías (%)
25	2	14.20	20.40	0.20	18.40	46.80
25	3	14.60	18.60	0.00	15.40	51.40
25	4	11.40	15.60	0.00	18.20	54.80
26	1	9.20	27.60	1.20	14.00	48.00
26	2	7.40	26.40	0.40	9.40	56.40
26	3	0.00	6.00	0.00	72.80	21.20
26	4	0.00	8.20	0.00	65.20	26.60
27	1	1.60	25.80	0.00	4.60	68.00
27	2	3.60	22.40	0.00	5.60	68.40
27	3	0.40	4.20	0.00	52.00	43.40
27	4	0.60	7.40	0.00	36.60	55.40
28	1	4.20	17.80	0.00	43.00	35.00
28	2	3.00	18.00	0.00	36.20	42.80
28	3	3.80	15.00	0.00	42.80	38.40
28	4	2.60	17.80	0.00	37.60	42.00
29	1	11.40	24.60	0.80	11.20	52.00
29	2	12.00	24.20	0.80	11.60	51.40
29	3	6.60	14.00	0.00	50.40	29.00
29	4	7.80	12.60	0.00	57.00	22.60
30	1	19.20	33.00	0.60	12.20	35.00
30	2	18.20	30.60	0.40	15.80	35.00
30	3	0.40	0.40	0.00	78.80	20.40
30	4	0.60	1.40	0.20	84.20	13.60
<b>Fin del estudio</b>						
<b>Morfología celular</b>						
Laminilla	Evaluación	Condrocitos sin alteraciones aparentes (%)	Condrocitos con picnosis (%)	Condrocitos con cariorrexis (%)	Condrocitos con cariólisis (%)	Lagunas vacías (%)
37	1	12.20	25.00	0.40	21.40	41.00
37	2	12.60	25.80	0.40	20.80	40.40
37	3	0.40	2.60	0.00	89.20	7.80
37	4	0.40	3.80	0.00	91.00	4.80

Los promedios determinados por las cuatro evaluaciones realizadas en cada uno de los 6 anillos de cartílago, en forma previa y posterior a la liofilización, así como al finalizar el estudio (después de que fueron utilizados como bioprótesis), se calcularon a partir de la Tabla 5 y se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Se muestran los valores de los promedios de cada uno de los 6 anillos de cartílago previos a la liofilización, 6 anillos de cartílago posteriores a la liofilización y 1 anillo de cartílago al finalizar el estudio

<b>Pre-Liofilización</b>						
<b>Morfología celular</b>						
Laminilla	Condrocitos sin alteraciones aparentes (%)	Condrocitos con picnosis (%)	Condrocitos con cariorrexis (%)	Condrocitos con cariólisis (%)	Lagunas vacías (%)	Total (%)
7	16.80	21.20	1.75	7.70	52.55	100.00
8	15.00	19.75	1.50	20.40	43.35	100.00
9	11.95	19.25	1.60	22.00	45.20	100.00
10	11.40	20.25	1.80	22.60	43.95	100.00
11	7.25	19.50	0.00	37.60	35.65	100.00
12	25.00	35.95	3.30	13.75	22.00	100.00
<b>Post-Liofilización</b>						
<b>Morfología celular</b>						
Laminilla	Condrocitos sin alteraciones aparentes (%)	Condrocitos con picnosis (%)	Condrocitos con cariorrexis (%)	Condrocitos con cariólisis (%)	Lagunas vacías (%)	Total (%)
25	13.95	18.00	0.15	17.45	50.45	100.00
26	4.15	17.05	0.40	40.35	38.05	100.00
27	1.55	14.95	0.00	24.70	58.80	100.00
28	3.40	17.15	0.00	39.90	39.55	100.00
29	9.45	18.85	0.40	32.55	38.75	100.00
30	9.60	16.35	0.30	47.75	26.00	100.00
<b>Fin del estudio</b>						
<b>Morfología celular</b>						
Laminilla	Condrocitos sin alteraciones aparentes (%)	Condrocitos con picnosis (%)	Condrocitos con cariorrexis (%)	Condrocitos con cariólisis (%)	Lagunas vacías (%)	Total (%)
37	6.40	14.30	0.20	55.60	23.50	100.00

El porcentaje promedio  $\pm$  error estándar (EE) de condrocitos: a) sin alteraciones aparentes, b) con picnosis, c) con cariorrexis, d) con cariólisis y e) de lagunas vacías, se calculó a partir de los valores de los promedios de la Tabla 6, para así obtener el porcentaje total de las diferentes morfologías celulares evaluadas. Los resultados se muestran en los siguientes incisos, tomando en cuenta para todos los casos, que de los 18 segmentos traqueales que fueron sometidos a liofilización, 6 fueron utilizados en una reparación quirúrgica.

#### **a) Condrocitos sin alteraciones aparentes**

El porcentaje de condrocitos sin alteraciones aparentes fue de  $14.57 \pm 1.48$  en forma previa a la liofilización, de  $7.01 \pm 1.10$  después de la liofilización y de  $6.40 \pm 2.54$  al finalizar el estudio. Estos resultados se muestran en la Tabla 7 y se ilustran en la Figura 32.

#### **b) Condrocitos con picnosis**

El porcentaje de condrocitos con picnosis fue de  $22.65 \pm 1.53$  en forma previa a la liofilización, de  $17.06 \pm 0.77$  después de la liofilización y de  $14.30 \pm 1.41$  al finalizar el estudio. Estos resultados se muestran en la Tabla 7 y se ilustran en la Figura 32.

#### **c) Condrocitos con cariorrexis**

El porcentaje de condrocitos con cariorrexis fue de  $1.66 \pm 0.23$  en forma previa a la liofilización, de  $0.21 \pm 0.06$  después de la liofilización y de  $0.20 \pm 0.12$  al finalizar el estudio. Estos resultados se muestran en la Tabla 7 y se ilustran en la Figura 32.

#### **d) Condrocitos con cariólisis**

El porcentaje de condrocitos con cariólisis fue de  $20.68 \pm 2.41$  en forma previa a la liofilización, de  $33.78 \pm 2.36$  después de la liofilización y de  $55.60 \pm 2.75$  al finalizar el estudio. Estos resultados se muestran en la Tabla 7 y se ilustran en la Figura 32.

### e) Lagunas vacías

El porcentaje de lagunas vacías fue de  $40.45 \pm 2.52$  en forma previa a la liofilización, de  $41.93 \pm 2.30$  después de la liofilización y de  $23.50 \pm 2.71$  al finalizar el estudio. Estos resultados se muestran en la Tabla 7 y se ilustran en la Figura 32.

Tabla 7. Porcentajes promedio  $\pm$  EE de las diferentes morfologías celulares analizadas, en forma previa y posterior a la liofilización de los segmentos traqueales y al finalizar el estudio (pre y post-liofilización:  $n=6$  anillos, fin del estudio:  $n=1$  anillo)

Morfología celular	Pre-Liofilización	Post-Liofilización	Fin del estudio
	Valores promedio $\pm$ EE (%)		
Condrocitos sin alteraciones aparentes	$14.57 \pm 1.48$	$7.02 \pm 1.10$	$6.40 \pm 2.54$
Condrocitos con picnosis	$22.65 \pm 1.53$	$17.06 \pm 0.77$	$14.30 \pm 1.41$
Condrocitos con cariorrexis	$1.66 \pm 0.23$	$0.21 \pm 0.06$	$0.20 \pm 0.12$
Condrocitos con cariólisis	$20.68 \pm 2.41$	$33.78 \pm 2.36$	$55.60 \pm 2.75$
Lagunas vacías	$40.45 \pm 2.52$	$41.93 \pm 2.30$	$23.50 \pm 2.71$
<i>Porcentaje total</i>	<i><math>100.01 \pm 1.63</math></i>	<i><math>100.00 \pm 1.32</math></i>	<i><math>100.00 \pm 1.90</math></i>

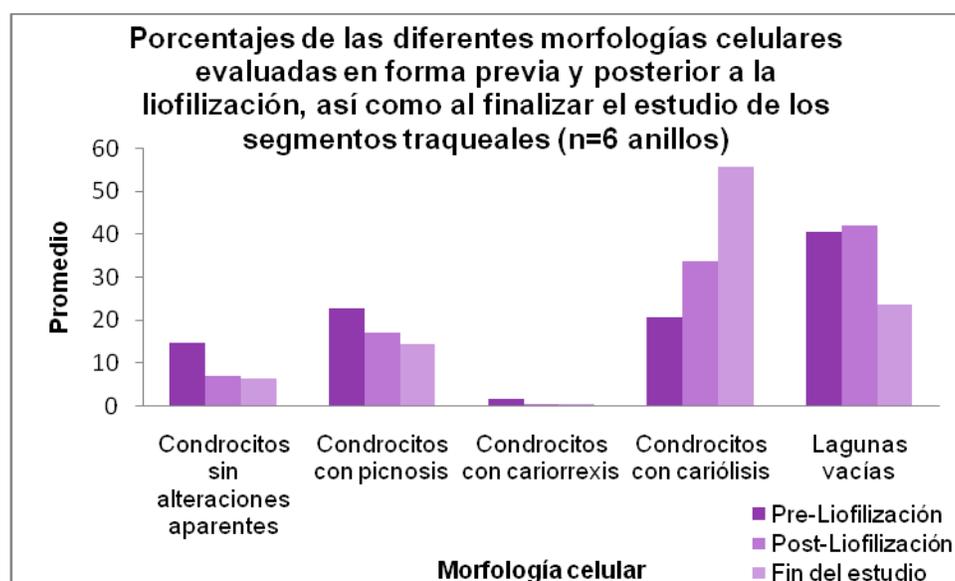


Figura 32. Gráfica de los porcentajes promedio de las diferentes morfologías celulares evaluadas en forma previa y posterior a la liofilización, así como al finalizar el estudio de los segmentos traqueales (pre y post liofilización:  $n = 6$  anillos, fin del estudio:  $n=1$  anillo)

Al realizar la comparación entre los porcentajes obtenidos en forma previa y posterior a la liofilización, así como al finalizar el estudio de los segmentos traqueales, se encontraron diferencias significativas en las morfologías analizadas, cuyos resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Valores de significancia (p) para cada una de las comparaciones realizadas de las morfologías analizadas (pre y post-liofilización: n=6 anillos, fin del estudio: n=1 anillo, ANDEVA+Tukey:  $p < 0.05$ )

Morfología celular	Anillos Pre-Liofilización vs Anillos Post-Liofilización	Anillos Pre-Liofilización vs Anillos Fin del estudio	Anillos Post-Liofilización vs Anillos Fin del estudio
Condrocitos sin alteraciones aparentes	0.000	0.050	0.982
Condrocitos con picnosis	0.004	0.026	0.653
Condrocitos con cariorrexis	0.000	0.004	1.000
Condrocitos con cariólisis	0.001	0.000	0.002
Lagunas vacías	0.896	0.022	0.012

Con respecto al porcentaje de condrocitos con cariólisis, éste se incrementó de manera significativa debido a la liofilización, así como al finalizar el estudio, pre-liofilización vs post-liofilización vs fin del estudio (ANDEVA + Tukey:  $p < 0.05$ ).

Al realizar la comparación entre los porcentajes obtenidos en forma previa y posterior a la liofilización, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los condrocitos sin alteraciones aparentes, con picnosis y con cariorrexis, ya que estos disminuyen significativamente por efecto de la liofilización, pre-liofilización vs post-liofilización (ANDEVA + Tukey:  $p < 0.05$ ). Al finalizar el estudio estos porcentajes no se modifican de manera significativa.

Con respecto al porcentaje de lagunas vacías, éste disminuyó significativamente al finalizar el estudio, pre y post liofilización vs fin del estudio, pero no se modificó por efecto de la liofilización (ANDEVA+Tukey:  $p < 0.05$ ).

### 6.3.3. Integridad y degeneración celular

Se obtuvo el porcentaje de condrocitos sin alteraciones y de condrocitos con alteraciones (picnosis, cariorrexis y cariólisis), presentes en los extremos derecho e izquierdo, así como en la región central de los 18 anillos de cartílago en forma previa y posterior a la liofilización de los segmentos traqueales.

En forma previa a la liofilización de los segmentos traqueales, los porcentajes de células sin alteraciones fueron 19.75, 15.21 y 26.91%, respectivamente, para los extremos derecho, izquierdo y región central de los anillos de cartílago, mientras que los porcentajes de células con alteraciones fueron 80.25, 84.79 y 73.09% para los extremos derecho, izquierdo y región central de los anillos de cartílago.

En forma posterior a la liofilización de los segmentos traqueales, los porcentajes de células sin alteraciones fueron 6.68, 3.93 y 9.20%, respectivamente, para los extremos derecho, izquierdo y región central de los anillos de cartílago, mientras que los porcentajes de células con alteraciones fueron 93.32, 96.07 y 90.80% para los extremos derecho, izquierdo y región central de los anillos de cartílago.

Estos resultados se muestran en la Tabla 9 y se ilustran en la Figura 33.

Tabla 9. Porcentaje de condrocitos sin alteraciones y con alteraciones, en los extremos izquierdo y derecho y región central de los anillos de cartílago, pre y post-liofilización, así como su valor de significancia (ANDEVA:  $p < 0.05$ )

Morfología celular	Pre-Liofilización (%)			Post-Liofilización (%)			Significancia (p)
	Ext. izq	Ext. der	Centro	Ext. izq	Ext. der	Centro	
Condrocitos sin alteraciones	15.21	19.75	26.91	3.93	6.68	9.20	0.020
Condrocitos con alteraciones	84.79	80.25	73.09	96.07	93.32	90.80	0.020
<i>Porcentaje total</i>	<i>100.00</i>	<i>100.00</i>	<i>100.00</i>	<i>100.00</i>	<i>100.00</i>	<i>100.00</i>	

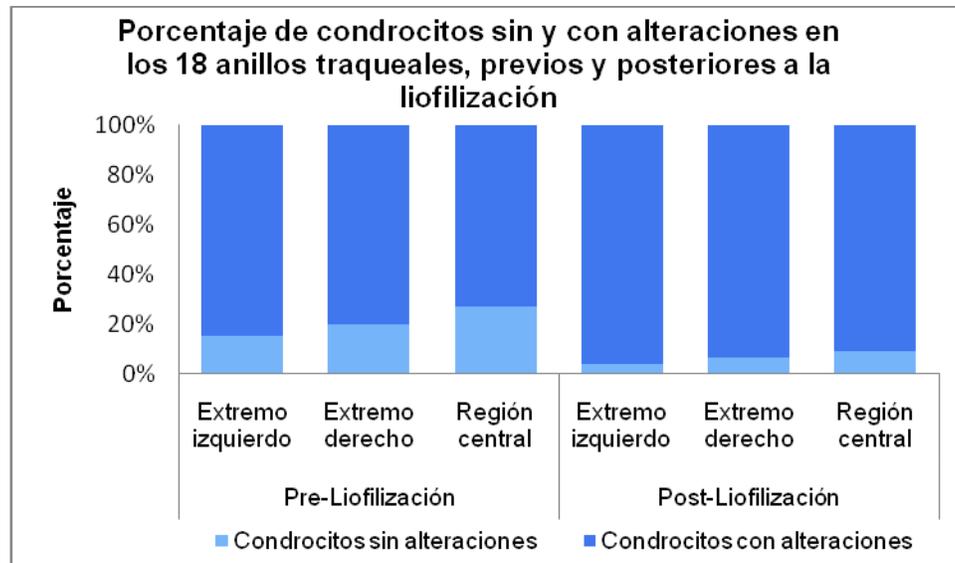


Figura 33. Gráfica del porcentaje de condrocitos sin y con alteraciones, analizados en los extremos y en la región central de los anillos de cartílago, pre y post-liofilización

Al realizar la comparación entre los porcentajes obtenidos de condrocitos sin alteraciones en forma previa y posterior a la liofilización, así como de condrocitos con alteraciones en forma en forma previa y posterior a la liofilización de los segmentos traqueales (n=18 anillos), se encontraron diferencias estadísticamente significativas (ANDEVA:  $p < 0.05$ ), como se observa en los valores de significancia (p) de la Tabla 9.

Se observó que los porcentajes de condrocitos sin alteraciones evaluados en tres zonas de los anillos de cartílago (extremo izquierdo, extremo derecho y región central) disminuyen significativamente por efecto de la liofilización. Los porcentajes de condrocitos con alteraciones evaluados en tres zonas de los anillos de cartílago (extremo izquierdo, extremo derecho y región central) aumentan significativamente después de la liofilización.

De igual forma, se obtuvo el porcentaje de condrocitos sin alteraciones y de condrocitos con alteraciones (picnosis, cariorrexis y cariólisis), presentes en los extremos derecho e izquierdo y en la región central de los 6 anillos de cartílago, en forma previa y posterior a la liofilización de los segmentos traqueales, así como al finalizar el estudio después de que fueron utilizadas como bioprótesis.

En forma previa a la liofilización de los segmentos traqueales, los porcentajes de células sin alteraciones fueron 18.58, 16.74 y 33.43%, respectivamente, para los extremos derecho, izquierdo y región central de los anillos de cartílago, mientras que los porcentajes de células con alteraciones fueron 81.42, 83.26 y 66.57%, para los extremos derecho, izquierdo y región central de los anillos de cartílago.

En forma posterior a la liofilización de los segmentos traqueales, los porcentajes de células sin alteraciones fueron 6.55, 5.36 y 14.43%, respectivamente, para los extremos derecho, izquierdo y región central de los anillos de cartílago, mientras que los porcentajes de células con alteraciones fueron 93.45, 94.64 y 85.57%, para los extremos derecho, izquierdo y región central de los anillos de cartílago.

Al finalizar el estudio, después de que los segmentos traqueales fueron utilizados como bioprótesis, los porcentajes de células sin alteraciones fueron 15.91, 0.00 y 13.40% respectivamente para los extremos derecho, izquierdo y región central de los anillos de cartílago, mientras que los porcentajes de células con alteraciones fueron 84.09, 100.00 y 86.60%, para los extremos derecho, izquierdo y región central de los anillos de cartílago.

Estos resultados se muestran en la Tabla 10 y se ilustran en la Figura 34.

Tabla 10. Porcentaje de condrocitos sin alteraciones y con alteraciones, en los extremos izquierdo y derecho y región central de los anillos de cartílago, previos a la liofilización, posteriores a la liofilización, así como al finalizar el estudio

Morfología celular	Pre-Liofilización (%)			Post-Liofilización (%)			Fin del estudio (%)		
	Ext. izq	Ext. der	Centro	Ext. izq	Ext. der	Centro	Ext. izq	Ext. der	Centro
Condrocitos sin alteraciones	16.74	18.58	33.43	5.36	6.55	14.43	0.00	15.91	13.40
Condrocitos con alteraciones	83.26	81.42	66.57	94.64	93.45	85.57	100.00	84.09	86.60
<i>Porcentaje total</i>	<i>100.00</i>	<i>100.00</i>	<i>100.00</i>	<i>100.00</i>	<i>100.00</i>	<i>100.00</i>	<i>100.00</i>	<i>100.00</i>	<i>100.00</i>

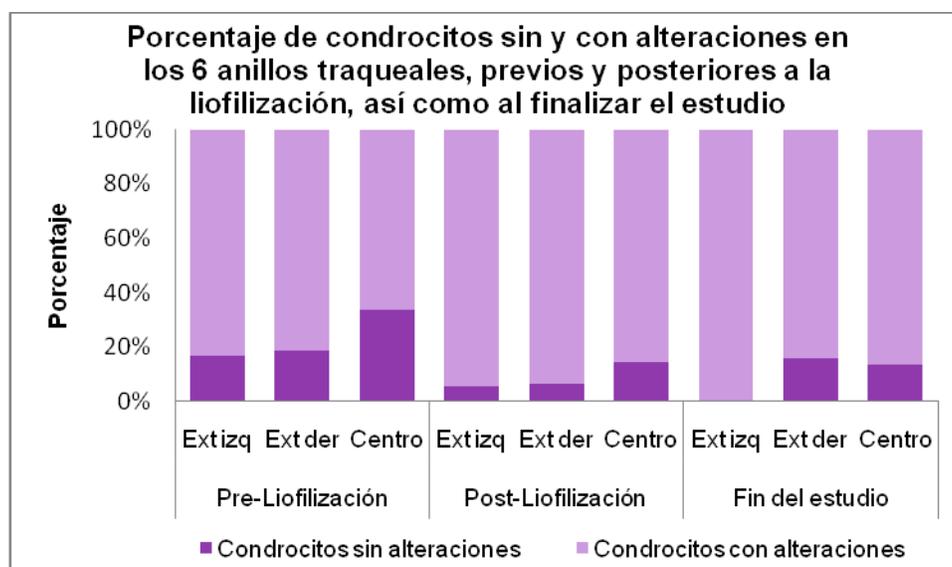


Figura 34. Gráfica del porcentaje de condrocitos sin y con alteraciones, analizados en los extremos derecho e izquierdo y región central de los anillos de cartílago, pre y post-liofilización, así como al finalizar el estudio

Al realizar la comparación entre los porcentajes obtenidos de condrocitos sin y con alteraciones en forma previa y posterior a la liofilización, así como al finalizar el estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, como se observa en los valores de significancia (p) de la Tabla 11.

Tabla 11. Valores de significancia (p) para cada una de las comparaciones realizadas entre condrocitos sin alteraciones y condrocitos con alteraciones en tres zonas de los anillos de cartílago (pre y post-liofilización: n=6 anillos, fin del estudio: n=1 anillo, ANDEVA + Tukey: p<0.05)

Morfología celular	Anillos Pre-Liofilización vs Anillos Post-Liofilización	Anillos Pre-Liofilización vs Anillos Fin del estudio	Anillos Post-Liofilización vs Anillos Fin del estudio
Condrocitos sin alteraciones	0.144	0.176	0.987
Condrocitos con alteraciones	0.144	0.176	0.987

Se observó que los porcentajes tanto de condrocitos sin alteraciones como de condrocitos con alteraciones, evaluados en tres zonas de los anillos de cartílago (extremo izquierdo, extremo derecho y región central), no se modifican significativamente ni por efecto de la liofilización, ni cuando fueron utilizados en una reparación quirúrgica.

#### **6.3.4. Tinción con hematoxilina-eosina**

Del total de anillos traqueales analizados (100.0%, n=37), en forma previa (n=18) y posterior (n=18) a la liofilización y uno al finalizar el estudio, a la tinción con hematoxilina-eosina y con respecto a la coloración basófila del cartílago, el 62.2% (n=23/37) no presentaron alteraciones en la tinción del cartílago.

El 37.8% (n=14/37) sí presentó cambios en la tinción basófila del cartílago con hematoxilina-eosina caracterizados, tanto por una intensa captación del colorante denotando un cartílago hiperteñido (5 anillos), como por una tenue captación del mismo denotando un cartílago débilmente teñido (9 anillos).

Estos porcentajes indican que la liofilización provocó alteraciones significativas en la tinción del cartílago (23 anillos sin alteraciones vs 14 anillos con alteraciones: t-student,  $p < 0.05$ ).

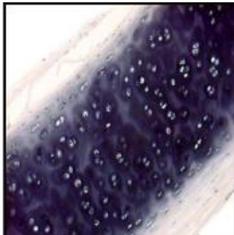
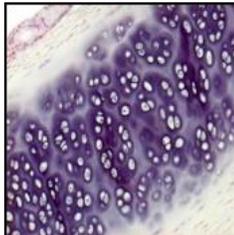
Las condiciones de liofilización para los segmentos traqueales establecidas en este proyecto y con respecto a la tinción basófila del cartílago normal “sin liofilización” provocaron alteraciones significativas en la captación del colorante (tinción basófila control vs hipertinción, tinción basófila control vs tinción lívida, t-student,  $p < 0.05$ )

Al finalizar el estudio, después de que los segmentos traqueales liofilizados fueron utilizados como bioprótesis, de seis anillos esperados, únicamente se obtuvo uno (16.7%) que presentó una tinción tenue del cartílago, dado que cinco de los animales (83.3%) presentaron necrosis y fue imposible recuperar los anillos

traqueales correspondientes. Estos resultados sugieren que las alteraciones ocasionadas en el cartílago por efecto de las condiciones de liofilización establecidas en este proyecto disminuyen la utilidad de los segmentos traqueales como bioprótesis en una reconstrucción traqueal.

Estos resultados se resumen en la Tabla 12 y se ilustran en la Figura 35.

Tabla 12. Resultados de la tinción con hematoxilina-eosina de los anillos de cartílago

Cartílago traqueal (Hematoxilina-Eosina) (10X)	Intensa captación de colorante	Captación normal de colorante	Débil captación de colorante
			
	n (%)	n (%)	n (%)
Anillos	n=5/37 (13.5%)	n=23/37 (62.2%)	n=9/37 (24.3%)
Pre-Liofilización	n=5/18 (27.8%)	n=11/18 (61.1%)	n=2/18 (11.1%)
Post-Liofilización	n=0/18 (0.0%)	n=12/18 (66.7%)	n=6/18 (33.3%)
*Fin de estudio	n=0/1 (0.0%)	n=0/1 (0.0%)	n=1/1 (100.0%)

\*Al finalizar el estudio, únicamente se obtuvo una de las seis muestras esperadas ya que cinco de los animales presentaron necrosis

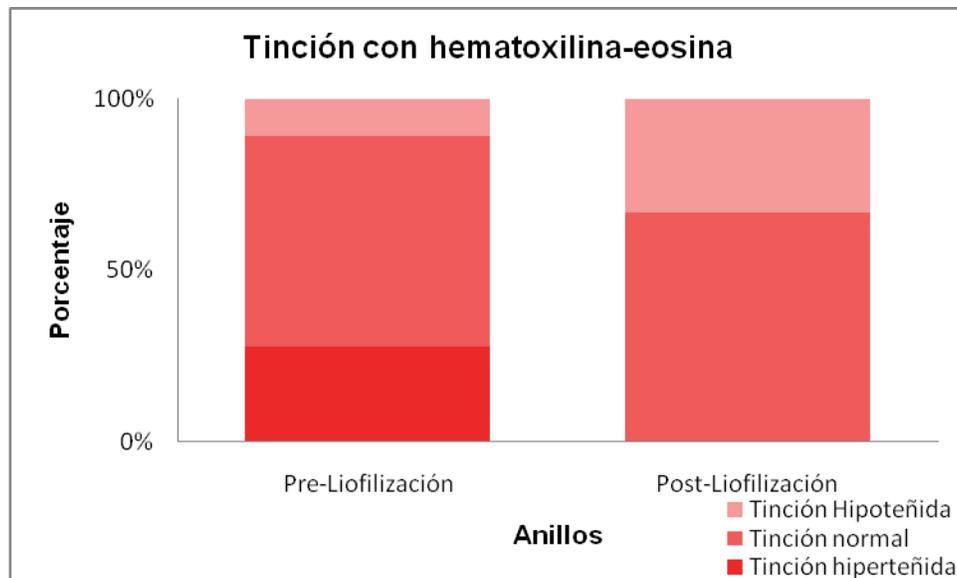


Figura 35. Resultados de la evaluación de la tinción con hematoxilina-eosina en los anillos de cartílago

### 6.3.5. Tinción tricrómica de Masson

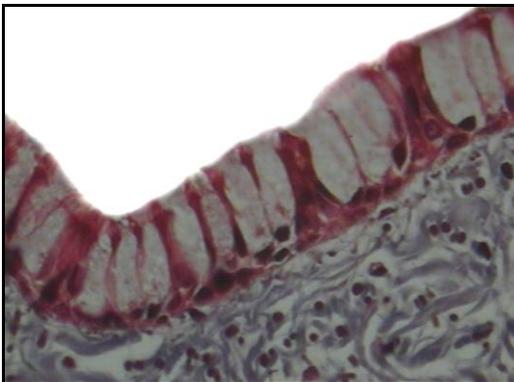
La evaluación del cartílago con la tinción tricrómica de Masson, se realizó con base en la ocurrencia de cambios evidentes en la coloración del cartílago por efecto de la liofilización y al concluir el estudio. Del total de anillos traqueales analizados 100.0% (n=37), el 89.2% (n=33/37), no presentó cambios en la tinción del cartílago. De éstos, el 48.6% (n=18/37), correspondieron a los anillos obtenidos en forma previa a la liofilización de los segmentos traqueales y el 40.5% (n=15/37), correspondieron a los anillos obtenidos después del proceso de liofilización.

Únicamente el 10.8% de los anillos analizados (n=4/37) presentaron cambios en la tinción del cartílago, 3 de ellos por efecto de la liofilización y el único que fue obtenido al finalizar el estudio.

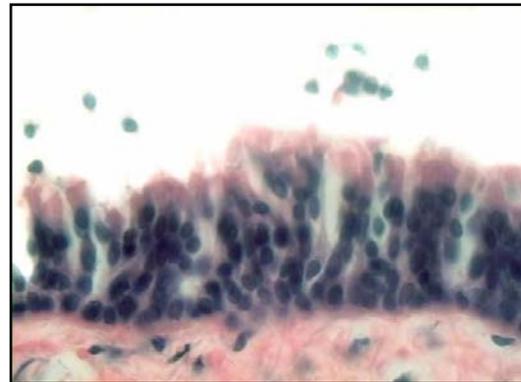
### 6.3.6. Epitelio: Tinciones con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson

Aunque el objetivo de este trabajo se basó en evaluar los cambios microscópicos que ocurrieron en el cartílago traqueal por efecto de las condiciones específicas de liofilización establecidas en este proyecto, sugeridas

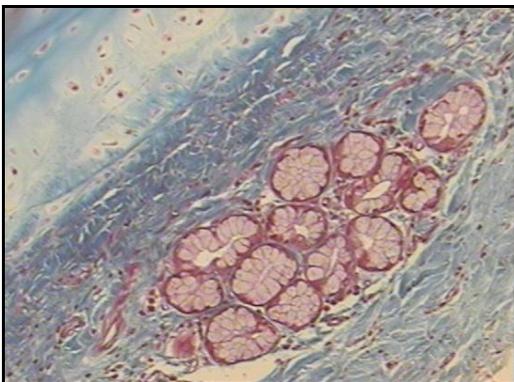
de una investigación previa<sup>1</sup>, también se realizó una evaluación de la continuidad y desprendimiento del epitelio respiratorio a lo largo de la mucosa traqueal, así como de la estructura de las glándulas seromucosas presentes en la submucosa traqueal. Estas condiciones de liofilización provocaron destrucción de la arquitectura glandular, mientras que con respecto al epitelio, se observaron zonas del anillo de cartílago con epitelio conservado, zonas con desprendimiento (mínimo, moderado y severo) y zonas con pérdida total del epitelio (Figura 36).



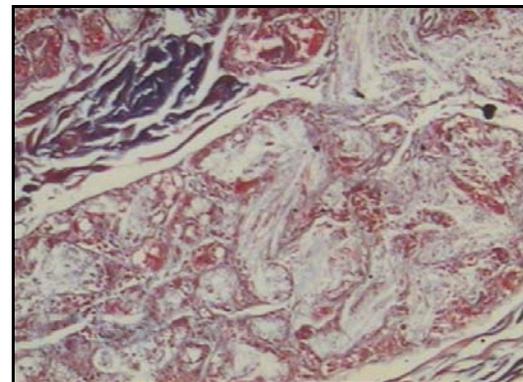
a) Tricrómica de Masson (aumento 40X)



b) Hematoxilina-eosina (aumento 40X)



c) Tricrómica de Masson (aumento 10X)

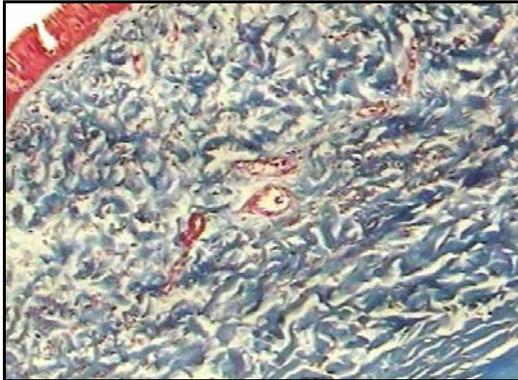


d) Tricrómica de Masson (aumento 40X)

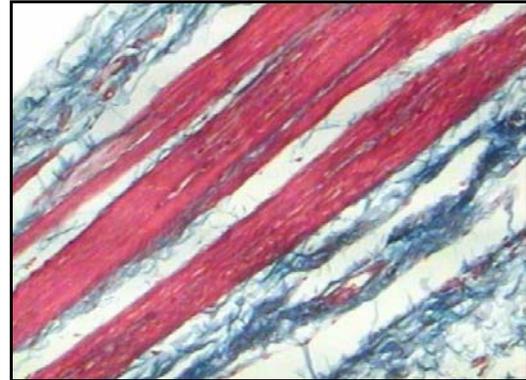
Figura 36. a) Epitelio respiratorio conservado (pre y post-liofilización), b) Mínimo desprendimiento epitelial, (pre y post-liofilización), c) Glándulas en la submucosa conservadas (pre-liofilización) y d) Destrucción glandular por efecto de las condiciones de liofilización estudiadas

### 6.3.7. Fibras de colágena y de músculo liso: Tinciones con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson

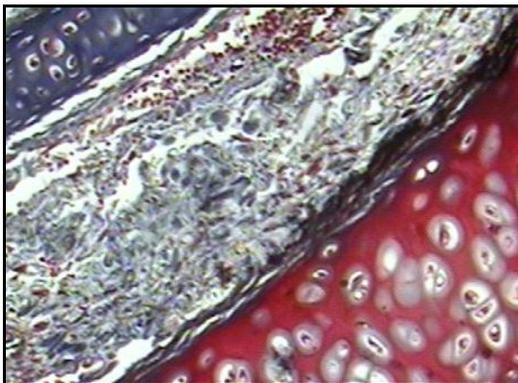
Las fibras, tanto de músculo liso como de colágena, se observaron conservadas, aunque la liofilización provocó separación de las fibras (Figura 37).



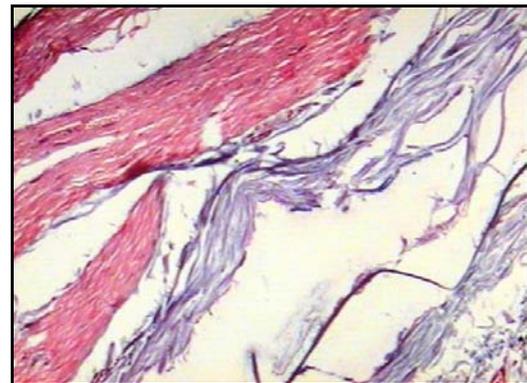
a) Tricrómica de Masson (aumento 25X)



b) Tricrómica de Masson (aumento 10X)



c) Tricrómica de Masson (aumento 10X)



d) Tricrómica de Masson (aumento 10X)

Figura 37. a) Fibras de colágena en la submucosa (pre-liofilización), b) Fibras de músculo liso en la adventicia (pre-liofilización), c) Fibras de colágena en la submucosa (post-liofilización) y d) Fibras de músculo liso y de colágena en la adventicia (post-liofilización)

### 6.3.8. Evaluación de caspasa-3

Ninguno de los anillos traqueales (18 pre-liofilización + 18 post-liofilización + 1 de fin del estudio) presentó expresión positiva para caspasa-3 en el cartílago traqueal.

### 6.3.9. Tiempo de sobrevida

El tiempo de sobrevida para los seis animales a los que se les practicó la reparación quirúrgica fue de 5, 8, 11, 15, 17 y 22 días. Estos resultados se muestran en la Tabla 13 y se ilustran en la Figura 38.

Tabla 13. Tiempo de sobrevida que presentaron los animales de experimentación, a los que se les practico una reparación quirúrgica, utilizando un segmento traqueal liofilizado

Tiempo de sobrevida de los animales de experimentación	
Animal de experimentación	Días de sobrevida
1	22 días
2	8 días
3	11 días
4	17 días
5	5 días
6	15 días

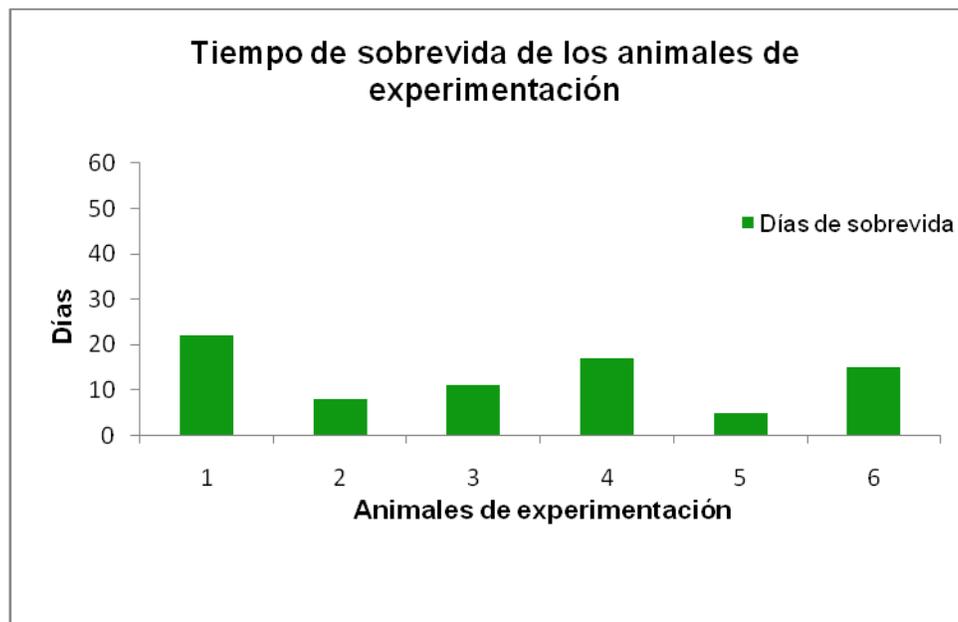


Figura 38. Gráfica del tiempo de sobrevida, para cada uno de los animales a los que se les practicó una reparación quirúrgica utilizando un segmento traqueal liofilizado de 10 anillos de longitud

## **7. DISCUSIÓN**

El objetivo de este trabajo radicó en evaluar los cambios macroscópicos, microscópicos y la expresión de caspasa-3 que ocurren en el cartílago de segmentos traqueales por efecto de las condiciones específicas de liofilización establecidas en este proyecto y, después de que éstos fueron utilizados como bioprótesis en una reconstrucción traqueal. Se propuso como hipótesis que el proceso de deshidratación inherente a las condiciones específicas a las que se realizó la técnica de liofilización provocarían un incremento en el índice de muerte celular en el cartílago de segmentos traqueales, sin afectar las características físicas del mismo. Bajo estas condiciones de liofilización para segmentos traqueales establecidas en el proyecto, los resultados fueron:

### **Hallazgos macroscópicos**

Los segmentos traqueales sometidos al proceso de liofilización no presentaron fracturas, tampoco pérdida de la continuidad estructural entre los anillos, aunque se observó la ocurrencia de cambios en la textura, en la consistencia y en la coloración de todo el tejido traqueal. Sin embargo, tanto la textura como la consistencia del tejido traqueal, se recuperaron cuando se rehidrataron los segmentos traqueales liofilizados, aunque no ocurrió lo mismo con respecto a la coloración del cartílago.

Al finalizar el estudio, de los 6 segmentos traqueales que fueron utilizados como bioprótesis en reparación quirúrgica, cinco presentaron necrosis, por lo que únicamente en uno de ellos fue posible realizar las evaluaciones correspondientes. Estos resultados sugieren que ocurrió pérdida de la continuidad, destrucción total y reabsorción del tejido traqueal liofilizado bajo las condiciones experimentales establecidas en este estudio.

### **Hallazgos microscópicos**

Al analizar la morfología celular en forma previa y posterior al proceso de liofilización de los 18 segmentos traqueales, se observó que el proceso de

liofilización provocó una disminución estadísticamente significativa en los porcentajes de: a) condrocitos sin alteraciones aparentes, b) condrocitos con picnosis y c) condrocitos con cariorrexis y un incremento significativo en los porcentajes de condrocitos con cariólisis y de lagunas vacías.

Un comportamiento similar se observó al analizar la morfología celular de los seis segmentos traqueales que fueron utilizados como bioprótesis, en forma previa y posterior al proceso de liofilización, con excepción del porcentaje de lagunas vacías, que no se modificó de manera significativa por efecto de las condiciones de liofilización establecidas en este estudio.

Al finalizar la investigación, después de que los 6 segmentos traqueales fueron utilizados como bioprótesis, hubo una disminución significativa en los porcentajes de condrocitos sin alteraciones, condrocitos con picnosis, condrocitos con cariorrexis y de lagunas vacías y un incremento significativo en el porcentaje de condrocitos con cariólisis. Es importante considerar que los resultados obtenidos al finalizar el estudio (cuando se retiró la bioprótesis) incluyeron solamente uno de seis animales.

Los resultados anteriores indican que las distintas morfologías celulares evaluadas incrementan o disminuyen en porcentaje debido al efecto de las condiciones de liofilización en estudio y parecen mantenerse sin cambios desde que se coloca la bioprótesis liofilizada hasta que ésta se retira.

El análisis de los resultados obtenidos al comparar el porcentaje de integridad celular (condrocitos sin alteraciones) contra el porcentaje de degeneración celular (condrocitos con picnosis, con cariorrexis y con cariólisis), ubicados tanto en los extremos como en la región central del anillo de cartílago, indicaron que el proceso de liofilización provocó una disminución significativa en el porcentaje de condrocitos sin alteraciones y un incremento significativo en el porcentaje de degeneración celular. Este comportamiento se observó cuando se

evaluaron los 18 anillos de cartílago procedentes de los 18 segmentos traqueales pero no ocurrió lo mismo cuando se evaluaron únicamente los 6 anillos de cartílago obtenidos de los 6 segmentos traqueales utilizados como bioprótesis en donde las comparaciones realizadas no fueron estadísticamente significativas. Estos resultados sugieren que el incremento en la degeneración celular provocado por efecto de la liofilización ocurre prácticamente de igual forma a lo largo del anillo de cartílago.

Por otra parte, es importante mencionar que los segmentos traqueales se rehidrataron 60 días después de someterlos al proceso específico de liofilización, en forma previa inmediata al momento de utilizarlos como bioprótesis en una reconstrucción traqueal. La deshidratación de las células y la reactivación el metabolismo celular, a la luz de los resultados, indican que aunque con el proceso específico de liofilización fue posible almacenar los segmentos de tráquea como ocurre en el caso de alimentos o de fármacos, la complejidad del tejido traqueal y la presencia de células inmersas en una matriz extracelular pueden ser factores que no favorecen la recuperación del tejido traqueal sometido a estas condiciones de liofilización. Habrá que optimizar en el futuro las operaciones unitarias de este proceso de liofilización para encontrar las mejores condiciones que minimicen el daño en el tejido traqueal.

Tomando en cuenta los resultados de la tinción con hematoxilina-eosina la mayor parte de los anillos que presentaron alteraciones en la tinción del cartílago mostraron hipertinción y correspondieron a los anillos obtenidos en forma previa a la liofilización, mientras que las alteraciones en la tinción provocadas por efecto de la liofilización se caracterizaron por una disminución en la captación del colorante en el cartílago.

Estos datos sugieren la ocurrencia de cambios en la producción de los compuestos característicos de la matriz extracelular como glucosaminoglicanos y proteoglicanos, observando una sobreproducción (hipertinción) por efecto de la procuración y una disminución (tinción tenue) por efecto de la liofilización. Con la tinción hematoxilina-eosina<sup>5</sup> es posible indicar la presencia de compuestos

químicos, su distribución dentro de las células o espacios extracelulares con lo que se pueden distinguir los cambios observados en la matriz extracelular del cartílago. La captación de colorante parece indicar una exposición aumentada (hipertinción) o disminuida (tinción tenue) de los grupos sulfato, fosfato y carboxilo. Estos componentes son responsables de la consistencia del cartílago (proteoglicanos, glucosaminoglucanos, ácido hialurónico y colágena tipo II), capaces de remodelar la matriz extracelular del cartílago ocasionando cambios degenerativos.<sup>40</sup>

La liofilización a las condiciones que se realizó, parece no ser el proceso más adecuado para mantener viable el tejido traqueal. Aunque el objetivo de la tesis radicó en evaluar los cambios microscópicos relacionados con muerte celular en el cartílago, al analizar los anillos traqueales se observó también que estas condiciones de liofilización provocaron desprendimiento del epitelio de la submucosa traqueal y destrucción de las glándulas. Resultados recientes indican que la antigenicidad de los segmentos traqueales disminuye de manera significativa cuando se eliminan las glándulas y se remueve el epitelio de la mucosa traqueal.<sup>49,50</sup> Esto sería importante si los segmentos de tráquea liofilizados hubieran funcionado adecuadamente como bioprótesis en una reconstrucción; sin embargo al finalizar el estudio fue evidente que ocurrió necrosis.

Esto indica que antes de proseguir con pruebas *in vivo* es necesario optimizar los esquemas de tiempo y temperatura/presión más adecuados para realizar la congelación y la deshidratación en el marco del proceso de la liofilización. En el caso específico de la rehidratación del tejido liofilizado se debe incluir en el estudio, el tipo de solución utilizada, además del tiempo y la temperatura. Cabe mencionar que el proceso de esterilización posterior a la liofilización en una atmósfera de óxido de etileno, ha demostrado tener utilidad en diferentes tejidos biológicos como pericardio bovino y arterias pulmonares con fines de reconstrucción, sin alterar la integridad y conservando la esterilidad hasta por diez años.<sup>26,27</sup>

### **Hallazgos de la expresión de caspasa-3 en el cartílago traqueal**

La expresión de caspasa-3 en las células del cartílago fue nula, no se modificó ni por efecto de la liofilización ni cuando se retiró la bioprótesis y, por lo tanto, no se correlacionó con ninguno de los parámetros evaluados en este trabajo, incluyendo el tiempo de sobrevida. Roach, Aigner y Kouri<sup>44</sup> reportan que aunque en los cultivos de condrocitos las células que muestran las características típicas de la muerte celular por apoptosis, sólo se trata de células aisladas. No ocurre lo mismo cuando se trata de condrocitos *in vivo*. Al parecer, en éstos no se efectúa la muerte celular por apoptosis de la manera clásica tradicional y definen el término “condroptosis” como una variante de la muerte celular por apoptosis. Está caracterizada por expansión del retículo endoplásmico rugoso y del aparato de Golgi, salida de material celular al espacio extracelular y desintegración de los remanentes celulares con autodestrucción del condrocito dentro de la laguna. Esto se traduce en un incremento en el número de lagunas vacías, aunque tanto en la apoptosis clásica como en la condroptosis se observa condensación del núcleo, de la cromatina y expresión de caspasas. En este trabajo, el número de lagunas vacías se incrementó significativamente por efecto de la liofilización pero no se observó expresión de caspasa-3. Estos hallazgos pudieran explicarse por el incremento significativo en el porcentaje de condrocitos con cariólisis, aunado a la disminución en el porcentaje de condrocitos sin alteraciones aparentes en los extremos del anillo de cartílago que ocurrió por efecto de la liofilización. Además, debe considerarse la posibilidad de que la expresión de caspasa-3 ocurra desde antes de la procuración traqueal dado que está reportado que la ventilación mecánica con volúmenes corrientes altos incrementa la permeabilidad, el daño a las células epiteliales alveolares<sup>45</sup> y altera la elastina<sup>47</sup>, incrementando la generación de mediadores inflamatorios<sup>45,46</sup> y la expresión de caspasa-3 en las células bronquiales.<sup>48</sup> En este diseño experimental, los animales fueron intubados manteniendo una frecuencia respiratoria de 20 respiraciones/min, un volumen corriente de 15 mL/kg y una FiO<sub>2</sub> del 100% en forma previa a la obtención de las tráqueas.

## 8. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales establecidas en este proyecto, la congelación de los segmentos traqueales a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, seguido de liofilización a  $-55^{\circ}\text{C}$  también durante 24 horas y esterilización en una atmósfera con óxido de etileno después de empaquetarlas para su almacenamiento a temperatura ambiente, permite concluir lo siguiente:

- 1) La liofilización, desde el punto de vista macroscópico; mantiene la continuidad estructural entre los anillos y aunque provoca cambios en la textura y en la consistencia, éstos se recuperan por efecto de la rehidratación con solución salina fría ( $4^{\circ}\text{C}$ , 0.9% NaCl) durante 30 min, pero no ocurre lo mismo con la coloración del tejido, que no recupera su color rosado y permanece blancuzco.
  
- 2) La liofilización, desde el punto de vista microscópico:
  - a) en el tejido cartilaginoso provoca una disminución en el porcentaje de condrocitos sin alteraciones y un incremento en el porcentaje de condrocitos con alteraciones, además de alteraciones en la captación de colorante en el cartílago. Estas observaciones sugieren que si disminuye la viabilidad celular y aumenta la degeneración celular, ocurren alteraciones que disminuyen la producción y el metabolismo de los componentes de la matriz extracelular caracterizadas por una tinción lívida (cartílago débilmente teñido) y
  
  - b) en el tejido epitelial: provoca desprendimiento de las células de la mucosa traqueal y altera la integridad estructural de las glándulas traqueales. Si se considera que la exfoliación del epitelio y la destrucción glandular disminuyen la antigenicidad del segmento liofilizado utilizado en la reconstrucción, resulta un hallazgo benéfico. Esto, aunado al mantenimiento estructural de las fibras de colágena y de músculo liso hace que se mantengan conservados, aunque se observa separación entre ellos.

- 3) La liofilización no incrementa la expresión de caspasa-3 en el cartílago, ya que las células del cartílago no expresaron caspasa-3 ni antes ni después de liofilizar los segmentos traqueales.
- 4) Considerando que al finalizar el estudio (después de retirar la bioprótesis traqueal) se observaron fenómenos de destrucción, reabsorción y necrosis del tejido traqueal, se concluye que los segmentos traqueales liofilizados bajo las condiciones experimentales en este proyecto no tienen utilidad funcional como bioprótesis en la reparación de lesiones traqueales mayores a 7 cm.
- 5) Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionaron información útil para los investigadores relacionados con el área, invitándolos a estudiar las condiciones de liofilización del tejido traqueal que permitan asegurar la integridad estructural del tejido cartilaginoso y la destrucción del tejido epitelial (mucosa y glándulas).

## 9. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados reportados por diferentes autores<sup>17</sup>, así como los obtenidos en este proyecto no proporcionan las condiciones óptimas para la liofilización de segmentos traqueales, en futuros experimentos con tráqueas, se sugiere que se empleen diferentes esquemas de temperatura y tiempo, tanto para la congelación como para el secado en la liofilización, así como condiciones de empaquetado, hasta encontrar aquellas que ocasionen el menor daño posible a la viabilidad celular.

Es necesario también probar diferentes combinaciones de rehidratación de los segmentos traqueales (el tipo de solución, el tiempo y temperatura para la rehidratación) hasta encontrar aquella en la que los segmentos traqueales aparezcan microscópica y macroscópicamente similares a los segmentos traqueales nativos “sin liofilización”. Una vez que se tengan las condiciones óptimas será posible evaluar la bondad de la tecnología de preservación (liofilización-rehidratación) en los diseños experimentales de liofilización-rehidratación-implante de los segmentos traqueales en modelos animales “*in vivo*”.

## 10. REFERENCIAS

1. Villalba-C. J. Respuesta Tisular del Aoinjerto Traqueal Liofilizado y Criopreservado combinado con Terapia de Inmunosupresión y Aplicación Tópica del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular. Tesis Doctoral. Escuela Superior de Medicina. Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. IPN. México. 2007.
2. Herrera S.-L. P., Barrientos-F. T., Fuentes-S. R., Alva-R. M. Anatomía Integral. Editorial Trillas. México. 2008. Pp. 763, 780-784.
3. Latarjet M., Ruiz-L. A. Anatomía Humana. Editorial Médica Panamericana. Cuarta edición. México. 2004.
4. Gartner L. P., Hiatt J. L. Texto Atlas de Histología. Segunda Edición. Editorial McGraw – Hill Interamericana. México. 2002. Pp. 69-81, 83-91, 127-131.
5. Junqueira L. C., Carneiro J. Histología Básica. Sexta Edición. Editorial Masson. Barcelona. 2005. Pp. 92-124, 132-135.
6. Conh L. Mucus in chronic airway diseases: Sorting out the sticky details. J Clin Invest. 2006; 116: 306-308.
7. Sotres-V. A., Baltazares-L. M., Villalba-C. J., Gaxiola-G. M. O., Santibáñez-S. J. A., Olmos-Z. R., Jasso-V. R. Tracheal cryopreservation: Caspase-3 immunoreactivity in tracheal epithelium and in mixed glands. Brazilian J Med Biol Res. 2009; 42: 1156-1162.
8. Stockwell R. A. Chondrocytes. J Clin Pathol. 1978; 31: 7-13
9. Trujillo-M. E. Transportadores de sodio del condrocito humano y sus modificaciones en el cartílago enfermo. Memoria para optar al grado de Doctora en Medicina. Departamento de Medicina Interna, Psiquiatría y Dermatología. Servicio de Reumatología. Hospital Universitario de Canarias. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Laboratorio de Biología del Desarrollo. Universidad de la Laguna. España. 1998.
10. Torres M. A. Apuntes de apoyo; trabajo teórico dirigido. Cartílago, articulaciones y hueso. Curso de Histología General. Facultad de Odontología. Universidad de Chile. Chile. 2006.
11. Paniagua R. Biología celular. Tercera Edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. Madrid. 2007. Pp. 295-318.

12. Kumar V., Abbas A. K., Fausto N., Aster J. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Saunders Pub. Cap 3. Tissue renewal, regeneration, and repair. 8a Ed. EE UU. 2009.
13. Fuentes-V. E., Corona-M. S. B. Tumores primarios malignos de tráquea y bronquios principales. Rev Cubana Cir. 2002; 41 (3): 176-184.
14. Yang P.-Y., Liu M.-S., Chen Ch.-H., Lin Ch.-M., Tsao T. Ch. Y. Adenoid cystic carcinoma of the trachea: A report of seven cases and literature review. Chang Gung Med J. 2005; 28: 357-363.
15. Takahashi H., Harada M., Ito T., Kato H. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the trachea. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 2007; 13: 191-194.
16. Escadajillo J. R. Oídos, nariz, garganta y cirugía de cabeza y cuello. Tercera Edición. Editorial Manual Moderno. México. 2009. Pp. 640-663.
17. Grillo H. C. Tracheal replacement: A critical review. Ann Thorac Surg. 2002; 73: 1995-2004.
18. Lenot B., Macchiarini P., Dulmet E., Weiss M., Darteville P. Tracheal allograft replacement. An unsuccessful method. Eur J Cardiothorac Surg. 1993; 7: 648-652.
19. Omori K., Nakatuma T., Kanemaru S., Asato R., Yamashita M., Tanaka S., Magrufov A., Ito J., Shimizu Y. Regenerative medicine of the trachea: The first human case. Annals Otology, Rhinology & Laryngology. 2005; 114(6): 429-433.
20. Gómez-H. H. E., Parra-R. J., De Santos-A. J. M., René F. A computational model for freeze-drying of shaped foodstuff. Revista Digital Científica y Tecnológica. México. 2003; Vol. 1. Art. 11.
21. Instruction manual. Free zone 6 liter Benchtop. Freeze dry sistem model 77520. Kansas City. EE UU.
22. Patel S. M., Bhugra C., Pikal M. J. Reduced pressure ice technique for controlled ice nucleation during freeze-drying. AAPS Pharm Sci Tech. 2009; 10 (4): 1406-1411.
23. Scheneid S., Gieseler H. Evaluation of a new wireless temperature remote interrogation system (TEMPRIS) to measure product temperature during freeze drying. AAPS Pharm Sci Tech. 2008; 9 (3): 729-739.

24. Tang X., Nail S. L., Pikal M. J. Evaluation of manometric temperature measurement, a process analytical technology tool for freeze-drying: Part 1, product temperature measurement. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2006; 7(1): 1-9.
25. Gilbert G. L., Gambill V. M., Spiner D. R., Hoffman R. K. Phillips C. R. Effect of moisture on ethylene oxide sterilization. *App Microbiology.* 1964; 12(6): 496-503.
26. Pérez-C. D. Pericardio bovino tratado con glutaraldehído, ácido glutámico y liofilizado en la reparación de defectos de la pared toraco-abdominal en perros: pruebas de resistencia y evaluación funcional. Tesis de Maestría. UNAM. Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. México. 2006.
27. Heras-R. Y. R. Evaluación de la utilidad y funcionalidad de la reconstrucción de la arteria pulmonar de perros, con aloinjertos de arteria pulmonar liofilizada y criopreservada. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. México. 2007.
28. Sutherland T. W., Williamson G. M., Zinneman. K., Shucksmith H. S. Graft sterilization. A biological and histological study of the relative merits of ethylene oxide and  $\beta$ -propiolactona as tissue sterilizing agents, with special reference to arterial grafts. *British Med J.* 1958: 734-736.
29. Roitt I., Brostoff J., Male D. *Inmunología.* Sexta Edición. Editorial Mosby. Estados Unidos. 2001. Pp. 385-400.
30. Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. *Inmunología celular y molecular.* Sexta Edición. Editorial Elsevier. Barcelona. 2008.
31. Sánchez-T. L. E., Diosdado-V. F. Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Téc Pecu Méx.* 2003; 41(1): 49-62.
32. Jiménez-G. L., *Biología celular y molecular.* Editorial Pearson Educación. México. 2003. Pp. 317-337.
33. Meléndez-Z. J., Ceballos-C. G. Sobreviviendo a Diablo: Lecciones de la survivina en la apoptosis. *Mensaje bioquímico.* Depto de Bioquímica. Facultad de Medicina. UNAM. 2008. 32; 175-183.
34. Hengartner M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000; 407: 770-776.
35. Hotchkiss R. S., Strasser A., McDunn J. E., Swanson P. E. Mechanism of disease. Cell death. *N Engl J Med.* 2009; 361: 1570-1583.

36. Shakibaei M., Schulze-Tanzil. G., De Souza P., John T., Rahmanzadeh M., Rahmanzadeh R., Merker H.-J. Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase induces apoptosis of human chondrocytes. *J Biological Chemistry*. 2001; 276: 13289-13294.
37. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35 (4): 495-516.
38. Martinez-S. M. Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular *in vitro* y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2009; 11(2): 152-166.
39. Masson P. J. Some histological methods. Trichrome stainings and their preliminary technique. *J Techn Methods*. 1929; 12: 75-90.
40. Sotres-V. A. Evaluación de las alteraciones macroscópicas, microscópicas y en la expresión de caspasa-3 en el tejido traqueal criopreservado por efecto de la solución, de la temperatura y del tiempo de congelación. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México. 2010.
41. Manual de instrucciones técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*. Instituto Nacional de Pediatría. Departamento de Anatomía Patológica. Laboratorio de Patología Molecular. México. D. F.
42. Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobón L. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América, Washington DC, Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) e Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP),1995.
43. Vector Laboratories. Vectastain universal quick kit. Catalog No. PK-8800. Instructions for rapid immunohistochemical staining. California. EE UU.
44. Roach H. I., Aigner T., Kouri J. B. Chondroptosis: A variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis*. 2004; 9 (3): 265-277.
45. Hirsch J., Hansen K. C., Sapru A., Frank J. A. Chalkley R. J., Fang X., Trinidad J. C., Baker P., Burlingame A. L., Matthay M. A. Impact of low and high tidal volumes on the rat alveolar epithelial type II cell proteome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 175: 1006-1013.

46. Wilson M. R., Choudhury S., Goddard M. E., O'Dea K. P., Nicholson A. G., Takata M. High tidal volume upregulates intrapulmonary cytokines in an *in vivo* mouse model of ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol*. 2003; 95: 1385-1393.
47. Bland R. D., Ertsey R., Mokres L. M., Xu L., Jacobson B. E., Jiang S., Alvira C. M., Rabinovitch M., Shinwell E. S., Dixit A. Mechanical ventilation uncouples synthesis and assembly of elastin and increases apoptosis in lungs of newborn mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008; 294: 3-14.
48. Hu G.-D., Cai S.-X., Chen Y.-H., Gao F. Effect of different tidal volume ventilation on rat bronchial and alveolar epithelial cell apoptosis. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 2005; 25: 508-512.
49. Sotres-V. A., Villalba-C. J., Jasso-V. R., Olmos-Z. R., Gaxiola-G. M., Baltazares-L. M., Santibáñez-S. A., Santillán-D. P. Cryopreserved tracheal grafts. A review of the literature. *J Invest Surg*. 2006; 19 (2): 125-135.
50. Tojo T., Kitamura S., Gojo S., Kushibe K., Nezu K., Taniguchi S. Epithelial regeneration and preservation of tracheal cartilage after tracheal replacement with cryopreserved allograft in the rat. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998; 116: 624-627.
51. Juaréz F., Villatoro J. A., López E. K. Apuntes de estadística inferencial. Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente". México, D. F. 2002.
52. Wayne W. D. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Cuarta edición. Editorial Limusa Wiley. México. 2002.
53. Boqué R., Maroto A. El análisis de la varianza (ANOVA). <http://www.química.urv.es/quicio>
54. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Diario Oficial de la Federación 1999. Diciembre 6. Estados Unidos Mexicanos. Especificaciones técnicas para la producción cuidado y uso de animales de laboratorio.
55. Guide for care and use of laboratory animals. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. 1985. Washington, EE UU.