



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

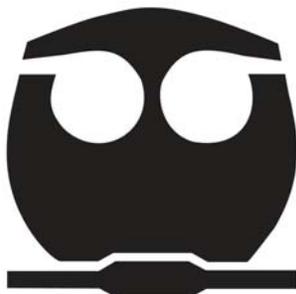
*“EXPRESIÓN DE CASPASA-3 Y CAMBIOS  
MICROSCÓPICOS EN EL CARTÍLAGO DE  
SEGMENTOS TRAQUEALES  
CRIOPRESERVADOS Y UTILIZADOS COMO  
BIOPRÓTESIS EN REPARACIÓN QUIRÚRGICA”*

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**MIRIAM MENDOZA SANTIAGO**



**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. Aida Navas Pérez

Secretario: Dr. Jaime Villalba Caloca

1er. Suplente: Dr. Fernando García Tamayo

2° Suplente: Dr. Óscar Armando Pérez Méndez

Sitio donde se desarrolló el tema:

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

Asesor del tema:

Dr. Jaime Villalba Caloca

---

Supervisor técnico:

Q.F.B. Matilde Baltazares Lipp

---

Sustentante:

Miriam Mendoza Santiago

---

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 del Dr. Jaime Villalba-Caloca, Q.F.B. Matilde Baltazares-Lipp, Dra. Avelina Sotres-Vega, Dr. Alfredo Santibáñez-Salgado y del Dr. Miguel Gaxiola-Gaxiola.

*A mi mamá: Eulalia*

“Tu fuerza y tu amor me han dirigido por la vida y me han dado las alas que necesitaba para volar”. Gracias por ser mi guía, mi consejera, mi amiga y sobre todo mi mamá, te amo.

*A mis hermanos: Patricia y Oscar*

Gracias, por estar siempre a mi lado, por su cariño, por su apoyo, por las travesuras y las peleas, por su comprensión y por ser las personas tan maravillosas que son, los amo.

*A mi tía: Imelda*

*A mis primos: César y David*

*A mis abuelos: Otilia y David*

Gracias tía por ser también mi mamá, a mis abuelos porque a pesar de la distancia siempre están presentes en mi vida y por todo su amor.

*A mis hermanas adoptivas: Mayra y Ángela*

Gracias, porque más que mis amigas son mis hermanas, por comprenderme durante el tiempo que las abandonaba por estudiar, por sus consejos, por ser las mejores cómplices que puedo tener, por su cariño, por levantarme cuando he caído y porque sin ustedes no sería lo mismo, las adoro niñas.

*A Carlos*

“Los cuentos más bonitos no son los que se escriben, sino los que se viven”.

Gracias, por caminar a mi lado, Te amo.

*A la Dra. Ave*

Gracias, por todo el apoyo brindado, por sus consejos, por sus enseñanzas, por abrirme las puertas en la investigación, por ser un gran ejemplo a seguir, por dejarme conocerla, no tengo palabras para decirle lo agradecida que estoy con usted y lo agradecida que estaré toda mi vida. Gracias por todo.

*Al Dr. Villalba*

Gracias, porque se convirtió en alguien trascendental en mi vida y en mi familia y, por ser un gran ejemplo a seguir. Gracias por todo.

*A la Q.F.B. Matilde*

Gracias, por sus consejos, por compartir sus conocimientos, por el apoyo y la ayuda brindada. Gracias por todo.

Gracias a mis sinodales, por su tiempo y consejos

*Dra. María del Carmen Durán Domínguez*

*M. en C. Aida Navas Pérez*

*Dr. Fernando García Tamayo*

*Dr. Óscar Armando Pérez Méndez*

Gracias a todas las personas que han estado presentes a lo largo de mi vida y por ser fundamentales en mi crecimiento personal y profesional.

A Lulú, al Dr. Alfredo, Sergio, Beto, Lupita, Erika, Bruno, Ana, Noé, Isabel

A mis amigos: Juanito, Maribel, Candy, Cristina, Miriam, Víctor, Omar, Edgar y a todos los que me faltó mencionar.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1. Sistema respiratorio	4
1.2. Tráquea	4
1.2.1. Anatomía y fisiología	4
1.2.2. Irrigación	6
1.2.3. Inervación	6
1.2.4. Histología	7
1.2.5. Cartílago traqueal	9
1.3. Trasplante y rechazo	10
1.3.1. Antígenos de histocompatibilidad	12
1.3.2. Las leyes del trasplante	12
1.4. Alotrasplante traqueal	13
1.5. Patología traqueal	14
1.6. Criopreservación	15
1.6.1. Medio RPMI-1640	17
1.7. Muerte celular	17
1.7.1. Apoptosis	19
1.7.1.1. Características morfológicas	19
1.7.1.2. Características bioquímicas	20
1.7.1.3. Rutas de activación	21
1.7.1.4. Vía de ejecución y caspasa-3	23
2. JUSTIFICACIÓN	25
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo general	27

4.2. Objetivos particulares	27
5. MATERIAL Y MÉTODOS	28
5.1. Recursos	28
5.2. Animales de experimentación	28
5.2.1. Criterios de inclusión	28
5.2.2. Criterios de exclusión	29
5.3. Consideraciones éticas	29
5.4. Procuración traqueal	29
5.5. Obtención de los segmentos traqueales	31
5.6. Obtención del anillo traqueal pre-preservación / Anillo control	31
5.7. Criopreservación de los segmentos traqueales	32
5.8. Obtención del anillo traqueal post-preservación / Anillo pre-reconstrucción	33
5.9. Reconstrucción traqueal (colocación del segmento traqueal criopreservado en un animal receptor)	33
5.10. Obtención del anillo traqueal post-cirugía / Fin de Estudio	35
5.11. Evaluación de los segmentos traqueales	35
5.11.1. Evaluación macroscópica	35
5.11.2. Evaluación microscópica	36
5.12. Determinación inmunohistoquímica de caspasa-3	37
5.13. Técnica para determinación inmunohistoquímica de caspasa-3	38
5.13.1. Preparación del tejido	38
5.13.2. Exposición y recuperación del antígeno	38
5.13.3. Eliminación de la peroxidasa endógena	38
5.13.4. Bloqueo del pegado inespecífico / Primer anticuerpo	39
5.13.5. Reacción streptavidina-biotina-peroxidasa	39
5.13.6. Visualización de la reacción antígeno-anticuerpo	40
6. RESULTADOS	41

6.1. Resultados generales	41
6.2. Evaluación macroscópica del segmento traqueal	41
6.3. Evaluación microscópica de los anillos traqueales	41
6.3.1. Cartílago	41
6.3.2. Integridad y degeneración celular (extremos del anillo de cartílago vs región central)	55
6.3.3. Captación del colorante (tinción con hematoxilina-eosina)	59
6.3.4. Alteración en la tinción tricrómica de Masson	62
6.3.5. Efecto de la criopreservación en epitelio y glándulas	64
6.3.6. Determinación de caspasa-3	65
6.4. Tiempo de sobrevida	68
7. DISCUSIÓN	70
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIÓN	77
9. REFERENCIAS	78

## ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS

Figura 1. Anatomía del sistema respiratorio y alvéolos_____	4
Figura 2. Anatomía de la tráquea _____	5
Figura 3. Histología traqueal_____	10
Figura 4. Tipos de injertos_____	12
Figura 5. Comparación entre necrosis y apoptosis_____	18
Figura 6. Comparación de características de apoptosis y necrosis _____	18
Figura 7. Eventos apoptóticos_____	22
Figura 8. Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis _____	23
Figura 9. Procuración traqueal_____	30
Figura 10. Obtención del anillo traqueal pre-preservación / Anillo control _____	31
Figura 11. Criopreservación de los anillos traqueales pre-preservación_____	32
Figura 12. Obtención de los anillos traqueales post-preservación _____	33
Figura 13. Colocación del segmento traqueal criopreservado en un animal receptor _____	34
Figura 14. Evaluación macroscópica_____	35
Figura 15. Evaluación microscópica del cartílago traqueal _____	36
Figura 16. Determinación inmunohistoquímica: Expresión positiva _____	37
Figura 17. Segmento traqueal sin alteraciones aparentes_____	41
Figura 18. Efecto de la criopreservación sobre: (1a) epitelio sin alteraciones, (2a) desprendimiento de epitelio por efecto de la criopreservación y (1b) glándulas sin alteraciones, (2b) destrucción de glándulas por efecto de la criopreservación _____	64
Tabla 1. Porcentaje de lagunas vacías, condrocitos sin alteraciones aparentes, con cariólisis, con picnosis y cariorrexis en el cartílago traqueal. Valores promedio $\pm$ EE (error estándar). Valores de significancia (p), ANDEVA y t-Student _____	45
Tabla 2. Porcentaje de lagunas vacías, condrocitos sin alteraciones aparentes, con cariólisis, con picnosis y cariorrexis en el cartílago traqueal. Valores promedio $\pm$ EE (error estándar). Valores de significancia (p), ANDEVA+Tukey _____	46

Tabla 3. Porcentajes promedio de los 4 conteos realizados de los condrocitos (sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías), en 5 regiones de los anillos de cartílago, en cada uno de los 18 anillos traqueales, pre-criopreservación y post-criopreservación	50
Tabla 3a. Porcentajes totales de condrocitos sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías, encontrados en cada uno de los 18 anillos de cartílago, en forma previa y posterior a la criopreservación de los segmentos traqueales	51
Tabla 3b. Valores promedio $\pm$ EE (error estándar) de los condrocitos sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías encontrados en los 18 anillos de cartílago en forma previa y posterior a la criopreservación de los segmentos traqueales	54
Tabla 4. Porcentajes promedio de los 4 conteos realizados de los condrocitos (sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías), en 5 regiones de los anillos de cartílago, en cada uno de los 6 anillos traqueales, pre-criopreservación y post-criopreservación	52
Tabla 4a. Porcentajes totales de condrocitos sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías, encontrados en cada uno de los 6 anillos de cartílago, en forma previa y posterior a la criopreservación de los segmentos traqueales	53
Tabla 4b. Valores promedio $\pm$ EE (error estándar) de los condrocitos sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías encontrados en los 6 anillos de cartílago en forma previa y posterior a la criopreservación de los segmentos traqueales	54
Tabla 5. Porcentaje de condrocitos sin alteraciones y con alteraciones (picnosis, cariólisis y cariorrexis) en los extremos y centro de los anillos de cartílago, n=18	57
Tabla 6. Porcentaje de condrocitos sin alteraciones y con alteraciones (picnosis, cariólisis y cariorrexis) en los extremos y centro de los anillos de cartílago, n=6	58
Tabla 7. Número y (porcentaje) de anillos traqueales que presentaron alteraciones en la tinción del cartílago. Tinción hematoxilina-eosina, (n=número/ %)	60
Tabla 8. Cambios en la coloración de la tinción tricrómica de Masson en los 18 anillos de cartílago	62
Tabla 9. Cambios en la coloración de la tinción tricrómica de Masson en los 6 anillos de cartílago	63
Tabla 10. Expresión de caspasa-3 en los 18 anillos de cartílago traqueal pre-criopreservación y post-criopreservación	66

Tabla 11. Expresión de caspasa-3 en los 18 anillos de cartílago traqueal pre-criopreservación y post-criopreservación_____	67
Tabla 12. Tiempo de sobrevida expresado en días que presentaron los seis animales en los que se realizó la reconstrucción_____	68
Tabla 13. Expresión de caspasa-3 y tiempo de sobrevida _____	69
Gráfica 1. Porcentaje de lagunas vacías, condrocitos sin alteraciones aparentes, con cariólisis, con picnosis y cariorrexis en el cartílago traqueal. Valores promedio $\pm$ EE. Valores de significancia (p), ANDEVA y t-Student_____	48
Gráfica 2. Porcentaje de lagunas vacías, condrocitos sin alteraciones aparentes, con cariólisis, con picnosis y cariorrexis en el cartílago traqueal. Valores promedio $\pm$ EE (error estándar). Valores de significancia (p), ANDEVA y t-Student_____	48
Gráfica 3. Porcentaje de condrocitos sin alteraciones vs condrocitos con alteraciones en los extremos y en la región central del anillo de cartílago, (Extremo derecho (ED), Extremo izquierdo (EI) y Centro (c) _____	57
Gráfica 4. Porcentaje de condrocitos sin alteraciones vs condrocitos con alteraciones en los extremos y en la región central del anillo de cartílago, (Extremo derecho (ED), Extremo izquierdo (EI) y Centro (c) _____	58
Gráfica 5. Porcentaje de anillos traqueales que presentaron alteraciones en la coloración del cartílago traqueal con la tinción H-E _____	61
Gráfica 6. Porcentaje de anillos traqueales pre-criopreservación, post-criopreservación y fin de estudio que presentaron alteración en el cartílago con la tinción H-E_____	61
Gráfica 7. Porcentaje de anillos que presentaron expresión de caspasa-3 en el cartílago_____	67
Gráfica 8. Porcentaje de anillos que presentaron expresión de caspasa-3 en el cartílago_____	68
Gráfica 9. Tiempo de sobrevida expresado en días que presentaron los seis animales de cada uno de los grupos de estudio_____	69

## INTRODUCCIÓN

El tratamiento de elección para diferentes alteraciones traqueales como estenosis, neoplasias, malacias y malformaciones congénitas incluye resección quirúrgica con anastomosis término-terminal. Esta reparación, frecuentemente está obstaculizada por la falta de tejido sano y es muy importante mencionar que solamente tiene utilidad cuando la lesión traqueal mide menos de 7cm de longitud. Actualmente, no existen estrategias quirúrgicas definitivas para la reparación de defectos traqueales mayores de 7cm, sin importar que para tratar de resolver este problema se han utilizado diferentes tipos de prótesis sintéticas y biológicas pero con ninguna ha sido posible lograr una reparación adecuada, ya que todas ellas generan complicaciones como estenosis y rechazo.

La criopreservación, es probablemente la técnica más efectiva para el mantenimiento estructural y funcional de diferentes células y tejidos. Con respecto a la criopreservación de segmentos traqueales, los resultados experimentales indican, que el proceso de criopreservación reduce la antigenicidad del segmento traqueal utilizado en la reparación. Los procesos de congelación-descongelación inherentes a la criopreservación, disminuyen la viabilidad celular y está bien establecido que el daño ocasionado en el cartílago interfiere en la función, lo que ha limitado la aplicación clínica del procedimiento.

Considerando que: 1) la reparación de lesiones traqueales de gran extensión constituye un problema clínico importante todavía no resuelto que demanda la búsqueda de una bioprótesis funcional, 2) la criopreservación ha demostrado tener utilidad en el mantenimiento estructural, funcional y bioquímico de diferentes células y tejidos, 3) los procesos de congelación, descongelación, hipoxia e isquemia inherentes al proceso de criopreservación disminuyen la antigenicidad, y 4) en este proceso de congelación se presenta el proceso de apoptosis, por lo que el objetivo de este trabajo radicó en evaluar la expresión de caspasa-3 en el cartílago de segmentos traqueales sin criopreservación, en

segmentos traqueales criopreservados y después de que éstos fueron utilizados como bioprótesis en reparación quirúrgica.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. Sistema respiratorio

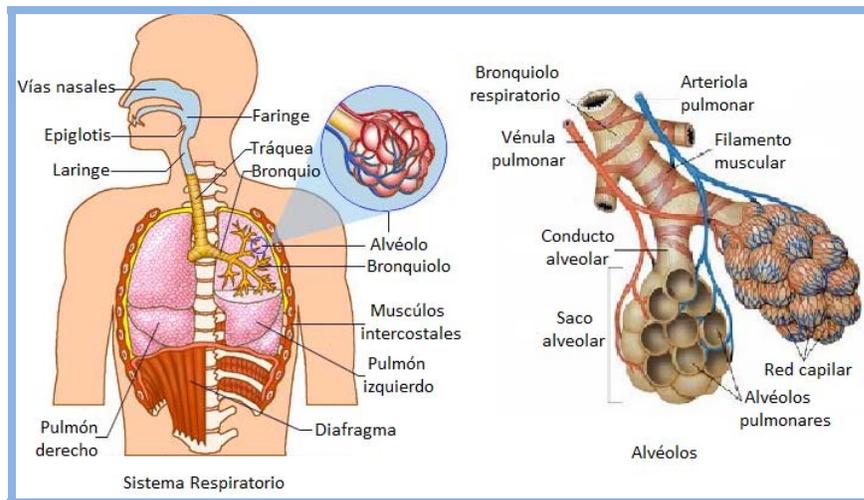
El sistema respiratorio está integrado por la secuencia de conductos aéreos y por los pulmones. Su función principal es proporcionar oxígeno y eliminar dióxido de carbono de las células del cuerpo mediante un proceso involuntario y automático.<sup>1</sup>

El sistema respiratorio se subdivide en dos regiones: conductora y respiratoria. La conductora está constituida por la cavidad nasal, la laringe, la tráquea, los bronquios, los bronquiolos terminales, el tejido conjuntivo y las ramificaciones de las arterias y de las venas pulmonares. Se sitúa fuera y dentro de los pulmones y se encarga de conducir el aire desde y hacia el medio externo. La respiratoria está constituida por los bronquiolos respiratorios, los alvéolos (unidad anatomofuncional de los pulmones<sup>4</sup>) y los capilares sanguíneos. Está localizada estrictamente dentro de los pulmones, y tiene como función el intercambio de oxígeno por dióxido de carbono<sup>1,3</sup> a través del proceso denominado hematosis (**Figura 1**).

La pared de los alvéolos se reduce a una membrana de 4 $\mu$  de grosor en la que uno de sus lados contacta con el aire que llega de los bronquiolos y el otro, se relaciona con la red capilar, en donde los glóbulos rojos realizan la hematosis<sup>8</sup>. Dentro de los alvéolos se localizan los neumocitos tipo I que permiten la fácil difusión de gases y los neumocitos tipo II que son células secretoras<sup>4</sup> de surfactante\* y recubren el epitelio evitando el colapso alveolar después de una expiración<sup>5</sup>.

---

\* Surfactante: Mezcla de 90% de fosfolípidos y 10% de proteínas secretada por los neumocitos tipo II que tiene como principal función disminuir la tensión superficial de los alvéolos.



**Figura 1. Anatomía del sistema respiratorio y alvéolos<sup>9</sup>**

## 1.2. Tráquea

### 1.2.1. Anatomía, fisiología

La tráquea, es un órgano impar de forma tubular integrado por anillos cartilagosos en forma de “C” incluidos dentro de tejido muscular liso a intervalos regulares e incompletos por la parte posterior en donde se conectan mediante una membrana elástica denominada porción membranosa de la tráquea<sup>1</sup> (**Figura 2**). Cada anillo de cartílago se conecta al anillo adyacente por tejido conectivo fibroelástico<sup>1,2</sup>. El cartílago cricoides de la laringe que surge con el primer anillo traqueal, es el único anillo cartilaginoso completo<sup>2,8</sup>. Los anillos traqueales forman la estructura de soporte para las paredes anterior y lateral de la tráquea, le confieren rigidez y permiten los movimientos de flexión, extensión y torsión. La contracción del músculo traqueal reduce el diámetro de la luz de la tráquea generando un flujo de aire más rápido que ayuda a desalojar material extraño (moco u otros irritantes) de la laringe mediante la tos<sup>3</sup>.

En el humano, la tráquea se extiende por la parte inferior o ventral del cuello, desde el borde inferior de la laringe justo debajo del cartílago cricoides a nivel de la sexta vértebra cervical, desciende por delante del esófago, ingresa al tórax y se dirige hasta el mediastino en donde en la carina, a nivel de la cuarta o

quinta vértebra torácica se bifurca en los dos bronquios principales, derecho e izquierdo. La tráquea tiene una longitud promedio que varía entre 11 y 13 centímetros con un diámetro promedio de 2 centímetros y está integrada por 20 a 22 anillos con una dimensión de 2.1 anillos por centímetro<sup>1,2,3,8</sup>. En los caninos, la tráquea se encuentra formada por 35 a 45 anillos de cartílago que presentan las mismas características fisiológicas, anatómicas e histológicas que la tráquea humana<sup>1</sup>.

La tráquea es una de las vías aéreas de conducción. Participa en el acondicionamiento, calentamiento, humidificación y depuración del aire. Su función principal es llevar el aire inspirado y/o espirado, ya sea por la nariz o por la boca a las zonas de intercambio gaseoso<sup>1,2</sup>. También, posee función mucociliar e interviene en la protección de las vías respiratorias bajas y en el proceso de fonación.

Los anillos de cartílago mantienen la permeabilidad de la luz durante la respiración normal, forzada y cuando se presentan accesos de tos. La pérdida del apoyo cartilaginoso permite el colapso dinámico y genera obstrucción de las vías respiratorias<sup>2</sup>. La flexibilidad de la tráquea disminuye con el aumento de la edad<sup>8</sup>.

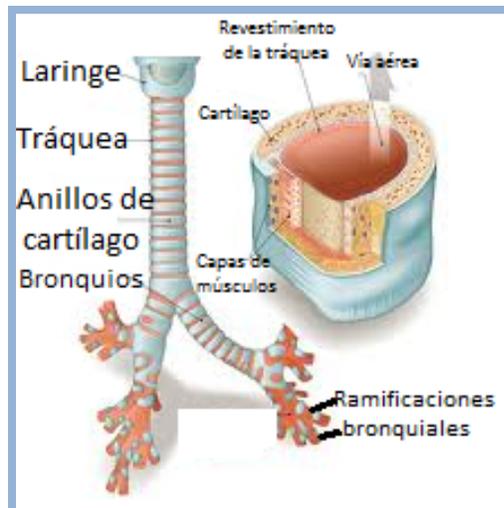


Figura 2. Anatomía de la tráquea<sup>10</sup>

### 1.2.2. Irrigación

La tráquea recibe irrigación de las arterias tiroidea inferior, subclavia, intercostal superior, mamaria y bronquial media. Estas arterias están interconectadas a lo largo de la superficie lateral de la tráquea, originan anastomosis paralelas a la tráquea y de estas anastomosis, emergen vasos que ingresan a la tráquea en el tejido cartilaginoso. 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>1,2,6,8</sup>.

### 1.2.3. Inervación

La inervación de la tráquea está dada tanto por fibras simpáticas como parasimpáticas del sistema nervioso autónomo. La estimulación simpática relaja el músculo bronquial, inhibe la secreción glandular y causa vasoconstricción a través de las fibras simpáticas de los ganglios cervicales y del tronco simpático.

Las fibras que llevan los impulsos a la parte alta de la tráquea ascienden por la cadena simpática y forman sinapsis en los ganglios simpáticos cervicales con las fibras post-ganglionares que van a la parte baja de la tráquea, en su mayor parte a través del plexo pulmonar.

Las fibras parasimpáticas, ramas craneales del nervio vago y laríngeo recurrente, controlan la contracción del músculo traqueal, la secreción glandular y la vasodilatación.

Todas las fibras parasimpáticas pre-ganglionares eferentes que se dirigen hacia la tráquea, al igual que las que provienen del cuerpo y del cayado aórtico, están incluidas en el nervio vago; mientras que las fibras que parten del seno y del cuerpo carotídeo lo hacen por el nervio glossofaríngeo<sup>1,2,6</sup>.

#### 1.2.4. Histología traqueal

En todos los mamíferos, la tráquea se compone de una serie de capas que de adentro hacia fuera incluyen: 1) mucosa, 2) lámina propia, 3) submucosa, 4) cartílago y 5) adventicia.

La mucosa está conformada por epitelio respiratorio, que es de tipo cilíndrico pseudoestratificado y ciliado. Esto se debe a que todas las células en el epitelio pseudoestratificado están en contacto con la lámina basal, pero únicamente algunas de ellas llegan a la superficie del epitelio. Las células de la superficie son cilíndricas y las células que no se extienden hasta la superficie suelen tener una base más ancha y se tornan más angostas en su extremo apical, las células más altas llegan a la superficie y poseen una base estrecha en contacto con la lámina basal y una superficie apical ensanchada. Debido a que las células del epitelio tienen alturas diferentes, sus núcleos se localizan en niveles distintos y semeja un epitelio estratificado, compuesto sólo de una capa celular. El tipo de epitelio ciliado presenta cilios en la superficie apical de las células que llegan a la superficie epitelial. Este tipo de epitelio recubre la mayor parte de la tráquea y los bronquios principales. Tiene como funciones, la secreción, la absorción, la lubricación, la protección, el transporte y actúa como barrera protectora ya que produce moco, que filtra y remueve (a través de cilios) las partículas atrapadas en él hacia la parte proximal de la tráquea<sup>1,2,3</sup>.

La lámina propia está formada por tejido conjuntivo laxo, principalmente a base de fibras elásticas, posee glándulas mucosas (células caliciformes) que tienen sus conductos de salida en la luz de la tráquea. Las glándulas mucosas secretan mucinógenos, que son proteínas glucosiladas grandes que cuando se hidratan, constituyen un lubricante protector grueso y viscoso parecido a un gel que se conoce como mucina, el componente principal del moco<sup>3</sup>.

La submucosa se encuentra constituida por una capa de fibras elásticas, está separada de la mucosa por una membrana elástica. Está integrada por una

capa de fibras elásticas entremezcladas con abundantes fibras de colágena y conteniendo múltiples glándulas mucosas y seromucosas. La capa de la submucosa termina en donde las fibras del tejido conectivo se mezclan con el pericondrio de la capa cartilaginosa<sup>2,3</sup>.

El cartílago es de tipo hialino presenta una coloración blanquecina-azulada, es traslúcido<sup>4</sup> y se encuentra limitado por el pericondrio que se continúa con el tejido conectivo fibroso que une a los cartílagos entre sí y cuya función es darle estabilidad a la tráquea.

El pericondrio es vascular y sus vasos proporcionan nutrientes a las células del cartílago, además de constituir una fuente de nuevos condrocitos para el crecimiento. Es el responsable de la oxigenación y la eliminación de desechos metabólicos del cartílago, debido a que tiene en su interior vasos sanguíneos y linfáticos inexistentes en el tejido cartilaginoso<sup>3,4</sup>. El pericondrio está formado por tejido conjuntivo enriquecido con fibras de colágeno tipo I en su parte más superficial y presenta de manera progresiva mayor número de células a medida que se aproxima al cartílago. Desde el punto de vista morfológico, las células del pericondrio son semejantes a los fibroblastos, las más cercanas al cartílago se multiplican fácilmente mediante mitosis originando condrocitos y funcionalmente se comportan como condroblastos<sup>4</sup>.

Las glándulas son especialmente abundantes y en la brecha libre del cartílago de la porción posterior de la tráquea, algunas atraviesan la capa muscular en este sitio, por lo que también forman parte de la adventicia. Los anillos de cartílago y el músculo traqueal separan la submucosa de la adventicia<sup>2</sup>.

La adventicia es la cubierta externa de la tráquea. Se encuentra formada por tejido conectivo laxo y su función es unir a la tráquea con los tejidos adyacentes del cuello y el mediastino; es periférica a los anillos cartilaginosos y el músculo traqueal<sup>1,3</sup>.

### 1.2.5. Cartílago traqueal

El tejido cartilaginoso es una modalidad especializada del tejido conjuntivo de consistencia firme, flexible y resistente a fuerzas mecánicas<sup>3,7</sup>, carece de vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. Posee células especializadas para secretar la matriz en la que quedan atrapadas dichas células. El cartílago traqueal es de tipo hialino, se encuentra cubierto por una capa de tejido conjuntivo denso denominado pericondrio responsable del aporte sanguíneo y de la eliminación de los restos metabólicos<sup>2,7</sup>.

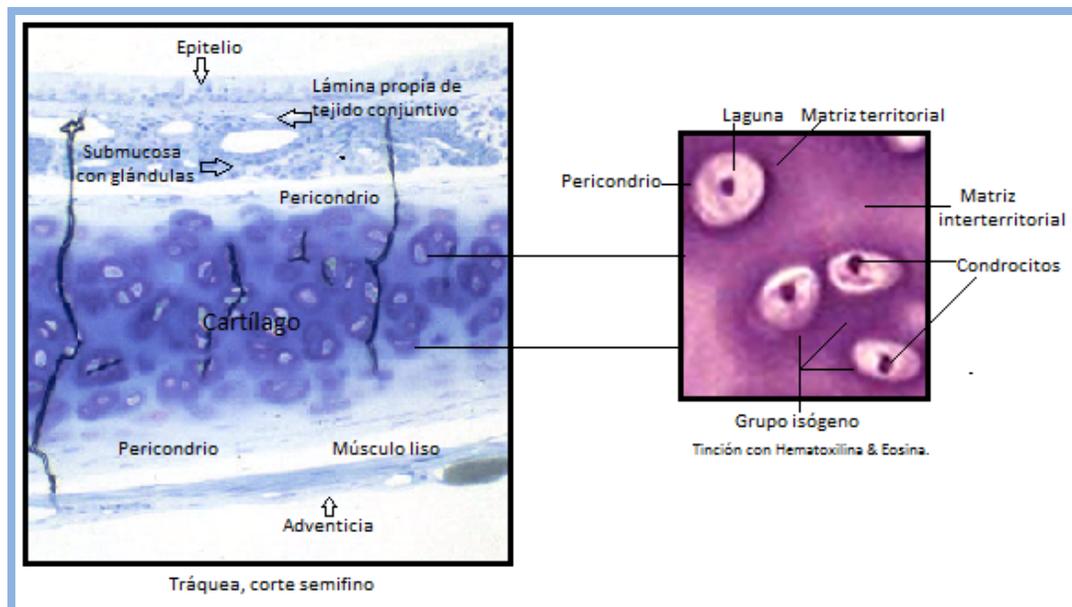
El cartílago está integrado por células denominadas condroblastos que secretan una matriz a su alrededor. Los condroblastos quedan atrapados en cavidades de la matriz conocidas como lagunas. Los condroblastos rodeados por la matriz se denominan condrocitos<sup>3</sup>. En la periferia del cartílago hialino, los condrocitos tienen una configuración alargada con el eje mayor paralelo a la superficie. En las zonas más profundas tienen una forma redondeada<sup>4</sup>. Estas células son capaces de dividirse y formar grupos de dos o cuatro o más células en una laguna. Estos grupos se conocen como grupos isógenos y representan una o dos divisiones celulares a partir de un condrocito original. A medida que las células de un grupo isógeno elaboran matriz, chocan, se alejan entre ellas y forman lagunas separadas que como consecuencia, incrementan el cartílago desde el interior. Este tipo de crecimiento se llama crecimiento intersticial y sólo ocurre en la fase inicial de la formación del cartílago hialino<sup>2,3,7</sup>.

La sustancia del cartílago no está vascularizada ni recibe nervios o vasos linfáticos, las células se nutren por medio de vasos sanguíneos del tejido conjuntivo circundante mediante difusión a través de la matriz.

Los condrocitos renuevan las macromoléculas de la matriz del cartílago, sintetizan colágeno principalmente del tipo II, proteoglicanos y condronectina. La matriz extracelular es un gel formado por macromoléculas de glucosaminoglicanos y proteoglicanos, que mantienen una íntima relación con fibras de colágena y

elásticas incluidas en la matriz<sup>2,3,7</sup>. La matriz se subdivide en dos regiones: matriz territorial situada alrededor de cada laguna y matriz interterritorial localizada entre la matriz territorial<sup>3</sup> (**Figura 3**).

La consistencia firme del cartílago se atribuye a las uniones covalentes de los glucosaminoglicanos sulfatados que forman parte de los proteoglicanos, los cuales interactúan con las fibras de colágena y con las moléculas de agua unidas a los grupos sulfato de estos mismos glucosaminoglicanos. Esto mantiene la rigidez de la matriz extracelular, la hace resistente a la deformación y le confiere plasticidad al tejido. La cualidad mecánica fundamental de los proteoglicanos es proporcionar una alta compresión hidrostática interna al cartílago, que es semejante a la de un amortiguador<sup>2</sup>.



**Figura 3. Histología traqueal<sup>1,2</sup>**

### 1.3. Trasplante y rechazo

El trasplante de órganos es uno de los grandes logros de la medicina del siglo XX y es posible gracias a una rigurosa selección de los receptores, al mejoramiento de las técnicas quirúrgicas, anestésicas y cuidados postoperatorios así como al desarrollo de la inmunofarmacoterapia con la aparición de

medicamentos inmunosupresores, antibacterianos, antivíricos, antimicóticos<sup>15</sup> y de la inmunobiología aplicando las técnicas clínicas de ejecución de trasplantes<sup>14</sup>.

Las moléculas del MHC (*Major Histocompatibility Complex*) se descubrieron en experimentos con injertos de piel en ratones, su función radica en presentar los antígenos a las células T que desempeñan un papel esencial en el rechazo de los órganos trasplantados<sup>14</sup> a través de las APC (*Antigen Presenting Cells*) principalmente macrófagos y las células dendríticas. En las respuestas antígeno-específicas del sistema inmunitario participan TCR (*T Cell Receptor*) e inmunoglobulinas (Ig), con capacidad para distinguir unas configuraciones peptídicas de otras<sup>15</sup>. El interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) y el TNF (*Tumor Necrosis Factor*) son potentes inductores de la expresión de moléculas MHC<sup>14,15</sup>.

En el organismo humano, existen proteínas polimórficas que presentan diferencias en la secuencia de aminoácidos entre los individuos. Estas proteínas pueden ser reconocidas como extrañas por el sistema inmunológico de otro individuo desencadenando la respuesta cuyo objetivo es la eliminación de los elementos extraños.

Las proteínas más polimórficas son las del sistema MHC<sup>15</sup> con lo que las respuestas de rechazo se pueden reducir si las moléculas MHC del donador y del receptor son lo más parecidas entre sí, especialmente las de clase II.

A no ser que el donante y receptor sean genéticamente idénticos, los antígenos del injerto inducirán una respuesta inmunitaria de rechazo.

El factor que determina si se producirá o no un rechazo es la relación genética existente entre el donador y el receptor, de esta forma, los autoinjertos y los isoinjertos no suelen ser rechazados, mientras que los aloinjertos y los xenoinjertos sí lo son<sup>14</sup> (**Figura 4**).

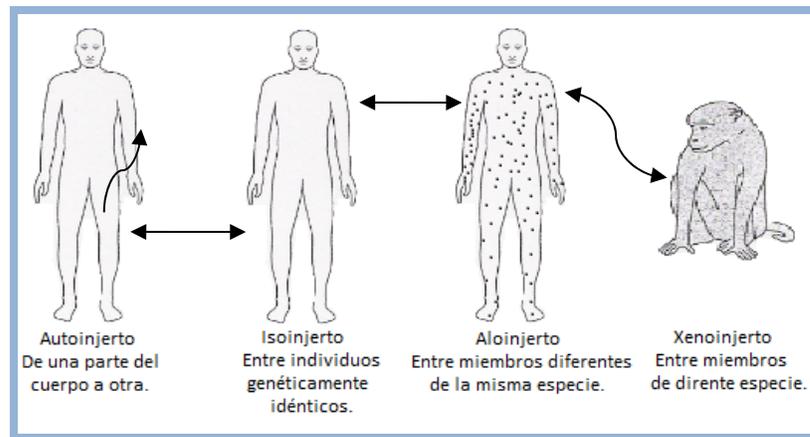


Figura 4. Tipos de injertos<sup>14</sup>

### 1.3.1. Antígenos de histocompatibilidad

Los antígenos de histocompatibilidad más importantes están codificados en el MHC y son los responsables del rechazo de los tejidos genéticamente diferentes<sup>14</sup>. Los antígenos de histocompatibilidad se expresan a partir de una región del cromosoma 6 denominada MHC<sup>16</sup>. En el hombre, los marcadores generados por la región MHC se estudiaron en los leucocitos por lo que se denominan *Human Leukocyte Antigen* (HLA)<sup>14,16</sup>.

El trasplante de órganos implica que el sistema inmunitario del receptor enfrente moléculas HLA distintas de las suyas y por lo tanto susceptibles de ser reconocidas como extrañas. Este reconocimiento alógeno se produce en los ganglios linfáticos del receptor por la migración de células detríticas del donador<sup>14,15</sup>.

### 1.3.2. Las leyes del trasplante

En un trasplante, se pueden activar todos los mecanismos reguladores que controlan respuestas inmunitarias. Las células T pueden ser activadas directamente por moléculas MHC ajenas. En las respuestas normales de las células T frente a proteínas extrañas, los antígenos deben ser procesados y transformados en péptidos que a continuación son presentados en las superficies

de las APC del huésped asociados a moléculas MHC. El rechazo ocurre por la respuesta del huésped frente al injerto que puede ser rechazado al poseer cualquier antígeno del que carezca el receptor y las reacciones injerto contra huésped se producen cuando los linfocitos del donante responden frente a los tejidos del receptor<sup>14</sup>.

#### **1.4. Alotrasplante traqueal**

Desde mediados del siglo XX, se realiza investigación clínica-quirúrgica para solucionar diferentes tipos de patología traqueal. Hasta la fecha, no se cuenta con avances sustanciales médicos y quirúrgicos que resuelvan lesiones extensas de este órgano<sup>1</sup>.

Las reconstrucciones traqueales, como parte de la cirugía general del tórax, llevan poco tiempo de realizarse. El pensamiento que se tenía de que "el cartílago traqueal difícilmente cicatrizaba y que la máxima extensión, que se podía resear de la tráquea eran dos o tres anillos", originó que se incrementara la investigación quirúrgica para resolver traqueoplastías con extensiones mayores a 2 cm. Pionero en la búsqueda de soluciones para esta patología, es el Dr. Hermes C. Grillo que ideó varios procedimientos quirúrgicos, para poder retirar más de "dos o tres anillos" traqueales, logrando buenos resultados en resecciones de 4 cm. En México, en 1954, Pacheco y col., publicaron un trabajo de alotrasplante traqueal en "fresco" en el que describen la destrucción y fibrosis del injerto<sup>1</sup>.

Así que, por lo extenso de las lesiones traqueales, de no ser posible la anastomosis término-terminal, se idearon "prótesis de diferentes materiales sintéticos", para sustituir a la tráquea y dar una solución estable y permanente a la insuficiente ventilación que sufren estos enfermos<sup>1,21,22</sup>. También, se han usado tejidos autólogos con colgajos de omento para cubrir los injertos traqueales trasplantados (omentopexia) que presentan revascularización en las líneas de sutura (anastomosis) pero no en la porción media del injerto donde se presenta necrosis por la obstrucción sanguínea derivada de los vasos anastomosados<sup>21,22</sup>.

Existen diferentes problemas que se deben resolver antes de que el alotrasplante traqueal sea clínicamente factible, principalmente: la preservación y vascularización del injerto, la formación de tejido de granulación, estenosis, necrosis, dehiscencia, malacias y rechazo<sup>1,2,17,22</sup>.

En la reconstrucción de lesiones traqueales mayores de 7 cm de longitud, se presentan complicaciones isquémicas en el injerto<sup>18</sup>; ya que por el tamaño no es posible realizar anastomosis arteriales<sup>18,19</sup>. Diferentes diseños experimentales han utilizado factores de crecimiento aunados al uso de diferentes técnicas quirúrgicas, como la de trasplante traqueal dividido para favorecer la neoformación de vasos sanguíneos. La adición de factores de crecimiento en la zona de las anastomosis promueve la angiogénesis e incrementa la revascularización del injerto<sup>21</sup>; también, la omentopexia favorece la angiogénesis, inmediatamente después del trasplante favoreciendo el suministro de sangre<sup>19</sup>.

En diferentes países, toda esta problemática ha causado que las investigaciones quirúrgicas de reconstrucción traqueal se enfoquen a la preservación de segmentos traqueales a través de diferentes técnicas (por ejemplo, criopreservación) para ser trasplantados en individuos de la misma especie, portadores de extensas lesiones, en los que no existe la posibilidad de realizar anastomosis término-terminal<sup>2</sup>. De ser posible y si se lograra una eficaz preservación se podría tener un “banco de tráqueas”<sup>1</sup>.

### **1.5. Patología traqueal**

La patología traqueal más frecuente sigue siendo la estenosis benigna debida principalmente a la intubación prolongada, a la realización de traqueotomías o a traumatismos traqueales<sup>23</sup>.

En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México, ingresaron desde 1998 hasta septiembre de 2007, 993 pacientes con patología

traqueal que, en orden de frecuencia, fueron estenosis, tumores y malacias. Lo ideal en estos pacientes es practicar anastomosis término-terminal pero, en los que no era posible por la extensión de la lesión, se efectuaron: traqueostomías, aplicación de rayo láser, dilataciones traqueales, colocación de diferentes tipos de “stents” etc., para disminuir la insuficiencia respiratoria ocasionada por la obstrucción.

## **1.6. Criopreservación**

La criopreservación es una técnica con la que es posible conservar materiales biológicos mediante el almacenamiento en temperaturas criogénicas, consiguiendo detener completamente la actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas y, de esta forma, proteger la estructura y la función de diferentes células y tejidos durante periodos de tiempo indefinidos<sup>1,24</sup>.

La criopreservación consiste en sumergir el material que se desea preservar dentro de una solución adicionada con los nutrientes adecuados elegidos con base en las características metabólicas propias del tipo celular además de un agente crioprotector capaz de evitar o disminuir el daño osmótico y mantenerlo almacenado bajo temperaturas extremas de congelación (tradicionalmente nitrógeno líquido) durante períodos prolongados de tiempo. Un agente crioprotector es un fármaco encargado de proteger el tejido biológico del daño ocasionado por la congelación debido a la formación de cristales de hielo.

Los agentes crioprotectores más empleados son los glicoles (alcoholes que contienen al menos dos grupos hidroxilos) como el propilenglicol, el dimetil sulfóxido (DMSO) y el glicerol que se emplean para proteger a las células en contra de las lesiones por congelamiento (reducen la formación intracelular de cristales de hielo y deshidratan a la célula)<sup>1,25</sup>.

En lo que respecta a la criopreservación de segmentos traqueales, los crioprotectores más empleados incluyen dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol y trehalosa<sup>2,13</sup>.

Como soporte para realizar la congelación de segmentos traqueales se han empleado diferentes medios de cultivo celular como RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) y TC-199 (Tissue Culture), además de la solución de Eurocollins que se utiliza para la preservación de diferentes órganos con fines de trasplante.

La criopreservación se inicia bajo un sistema de lento congelamiento en el que se controla la disminución gradual de temperatura en un rango que varía regularmente entre (-1°C) y (-5°C) por minuto hasta alcanzar un rango de temperatura entre (-80°C) y (-100°C)<sup>13</sup>. La mayoría de las alteraciones celulares se presentan cuando el tejido alcanza la denominada “temperatura de riesgo” que oscila entre (0 °C) y (-60 °C)<sup>1</sup>.

Con respecto al tiempo de criopreservación, el daño tisular por efecto de la congelación, se clasifica como “indirecto” cuando se presenta como consecuencia de un periodo de tiempo de criopreservación prolongado. Al respecto, algunos autores refieren que los periodos prolongados de criopreservación favorecen en la tráquea, el deterioro del epitelio y del cartílago, mientras que otros indican, que la viabilidad del cartílago y las alteraciones isquémicas que se presentan en el tejido traqueal por efecto de la congelación, no muestran diferencias importantes al incrementar el tiempo de criopreservación<sup>2</sup>.

Transcurrido el tiempo de criopreservación y en forma previa inmediata al momento de realizar la reconstrucción, el esquema para descongelar los segmentos traqueales incluye en su mayoría, un rango de temperatura que fluctúa entre (35°C) y (42°C) lo que minimiza el tiempo necesario para disipar la formación de hielo<sup>2</sup>.

### 1.6.1. Medio RPMI-1640

El medio de cultivo celular Roswell Park Memorial Institute (RPMI), se formuló para mantener a los fibroblastos en suspensión.

RPMI-1640 es un medio simple en ingredientes y rico en aminoácidos. Contiene altas cantidades de glucosa, en comparación con otros medios como el DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) la cual es la fuente central de energía para todas las células.

Actualmente, puede ser adaptado para el cultivo óptimo de varios tipos de células suplementado con vitaminas, aminoácidos, factores de crecimiento, citoquinas o suero<sup>10</sup>.

### 1.7. Muerte Celular

En el organismo fisiológicamente sano, millones de células mueren sin dejar cicatrices ni activar células inflamatorias. Se trata de un proceso activo, definido genéticamente, en el que las células están destinadas a morir, formando parte de los procesos fisiológicos que resultan necesarios para el funcionamiento normal del organismo. La muerte celular engloba principalmente dos procesos: necrosis y apoptosis (**Figura 5**).

El término necrosis reúne los procesos violentos, donde la degeneración celular es pasiva sin un requerimiento de energía. Aparece como consecuencia de un daño traumático o por exposición a toxinas y finaliza con la lisis de la membrana celular. Este fenómeno conduce a las células vecinas también hacia la muerte, atrayendo, al mismo tiempo, a las células inflamatorias, lo que hace que en las áreas donde se observan células necróticas sea frecuente encontrar nuevas células las que desarrollan este tipo de muerte celular, además de originar una reacción inflamatoria y una cicatriz fibrosa que deforma el tejido y el órgano afectado<sup>12</sup>.

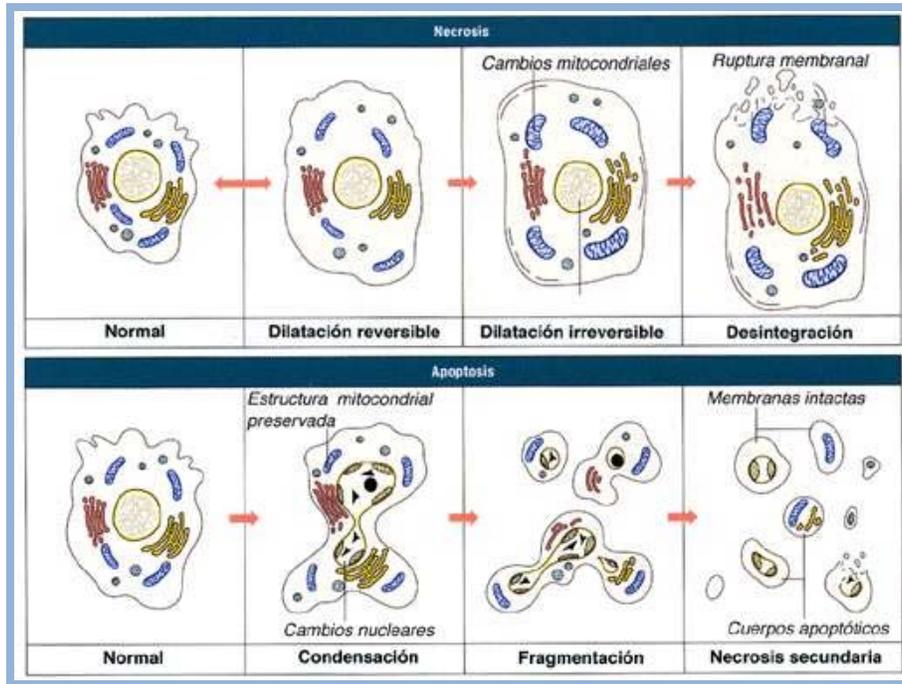


Figura 5. Comparación entre necrosis y apoptosis<sup>28</sup>

La apoptosis también es conocida como muerte celular programada. Las células se autodestruyen sin dejar reacciones de inflamación ni cicatrices en los tejidos. Es por tanto considerada como una muerte natural fisiológica<sup>28,12</sup> (Figura 6).

Apoptosis	Necrosis
Células individuales o pequeños grupos de células	A menudo células contiguas
Contracción de la célula	Aumento de volumen celular
Picnosis y cariorrexis	Cariólisis, picnosis y cariorrexis
Citoplasma retenido en cuerpos apoptóticos	Ruptura de la membrana celular
No inflamación	Inflamación

Figura 6. Comparación de características de apoptosis y necrosis<sup>28</sup>

Se han definido las etapas que hacen referencia a la desintegración y desaparición del núcleo como cariorrexis, cariólisis y picnosis.

La picnosis es la retracción del núcleo con condensación de la cromatina; la cariólisis, la disolución del núcleo; la cariorrexis, la fragmentación del núcleo en trozos con cromatina condensada. Las alteraciones del citoplasma y núcleo son coexistentes. La picnosis, cariólisis y cariorrexis no constituyen etapas de la alteración nuclear; son formas distintas de reacción<sup>12</sup>.

### **1.7.1. Apoptosis**

El término apoptosis (a-po-toe-sis) deriva del griego antiguo que sugiere "hojas que caen de un árbol"<sup>26,27</sup> y fue acuñado por Kerr, Wyllie y Currie (1972) para describir una forma de muerte celular activa, controlada y caracterizada por aspectos morfológicos definidos<sup>28</sup>. Ocurre durante el desarrollo y el envejecimiento como un mecanismo homeostático para mantener la población celular en los diferentes tejidos y de defensa, ya sea en las reacciones inmunes o cuando las células son dañadas por enfermedad o agentes nocivos. Es importante mencionar que no todas las células mueren en respuesta al mismo estímulo<sup>27,28</sup>.

La apoptosis es un tipo de muerte celular genéticamente controlado que ocurre de manera programada. Se trata de un proceso dependiente de energía que involucra la activación de un grupo de enzimas denominadas "caspasas" (cisteín-aspartato proteasas) que se activan por eventos en cascada y están relacionadas con la iniciación del estímulo y con la desaparición final de la célula<sup>27,28</sup>. La apoptosis es un proceso irreversible con activación de caspasas comprometiendo una célula a morir<sup>28</sup>.

#### **1.7.1.1. Características morfológicas de la apoptosis**

Al microscopio óptico y utilizando la tinción con hematoxilina-eosina, las células apoptóticas se observan como una masa redonda u oval con el citoplasma oscuro, el núcleo denso y fragmentos de cromatina nucleares de color púrpura<sup>28</sup>. Durante el proceso de muerte celular, las células apoptóticas disminuyen de tamaño, ocurre retracción del núcleo y condensación de la cromatina (picnosis) sin

ruptura de la membrana plasmática que se mantiene íntegra, formación de hendiduras de las proteínas del citoesqueleto por proteasas específicas de aspartato con lo que colapsan los componentes subcelulares, ocurre la fragmentación nuclear y la formación de vesículas de la membrana plasmática<sup>27</sup>.

Las vesículas de membrana plasmática ocurren seguidas por cariorrexis (fragmentación del núcleo en trozos con cromatina condensada) y separación de fragmentos celulares en cuerpos apoptóticos. Los cuerpos apoptóticos son de citoplasma con organelos empaquetados fuertemente con o sin un fragmento nuclear. La integridad de los organelos se mantiene dentro de la membrana plasmática intacta. Estos cuerpos son subsecuentemente fagocitados por macrófagos, células parenquimales, o células neoplásicas y degradadas dentro de fagolisosomas<sup>27,28</sup>.

No existe una reacción inflamatoria asociada con el proceso de apoptosis debido a que no ocurre ruptura de la membrana plasmática, las células apoptóticas no liberan los constituyentes celulares en el tejido intersticial circundante, son rápidamente fagocitados por células circundantes previniendo la necrosis secundaria y la inducción de citocinas inflamatorias<sup>28</sup>.

#### **1.7.1.2. Características bioquímicas de la apoptosis**

Las células apoptóticas muestran modificaciones bioquímicas tales como división, ruptura de ADN y reconocimiento fagocítico. Las caspasas son expresadas en una forma inactiva de proenzima en la mayoría de las células y a menudo activan a otras procaspasas, lo que permite la iniciación de una cascada de proteasas. Algunas procaspasas también pueden agregarse y autoactivarse. Esta cascada proteolítica en el que una caspasa puede activar a otras caspasas, amplifica la vía de señalización apoptótica y por lo tanto conduce a la muerte celular rápida<sup>27</sup>.

Las caspasas contienen tres dominios, un prodominio N-terminal, una subunidad larga (p20) que contiene el centro activo con cisteína y una subunidad pequeña (p10) en el C- terminal. El prodominio y la subunidad larga están separados por un lugar de corte con ácido aspártico y la subunidad grande está separada de la pequeña por uno o dos motivos de corte Asp. La presencia de Asp en los sitios de corte para la maduración está relacionada con la capacidad de las caspasas para activarse por otras caspasas como parte de una cascada de amplificación. Una vez que las caspasas son activadas inicialmente, hay un compromiso irreversible hacia la muerte celular.

Se han identificado once caspasas y se clasifican en: iniciadoras (caspasa-2, -8, -9, -10), efectoras o ejecutoras (caspasa-3, -6, -7) e inflamatorias (caspasa-1, -4, -5, -11). Las caspasas iniciadoras se encargan de la activación de las caspasas ejecutoras; las caspasas inflamatorias median la maduración de citocinas proinflamatorias y las caspasas ejecutoras median el procesamiento de productos que desencadenan cambios celulares incluyendo degradación del ADN, condensación de cromatina y desintegración de la membrana plasmática<sup>27,28,26,32</sup>.

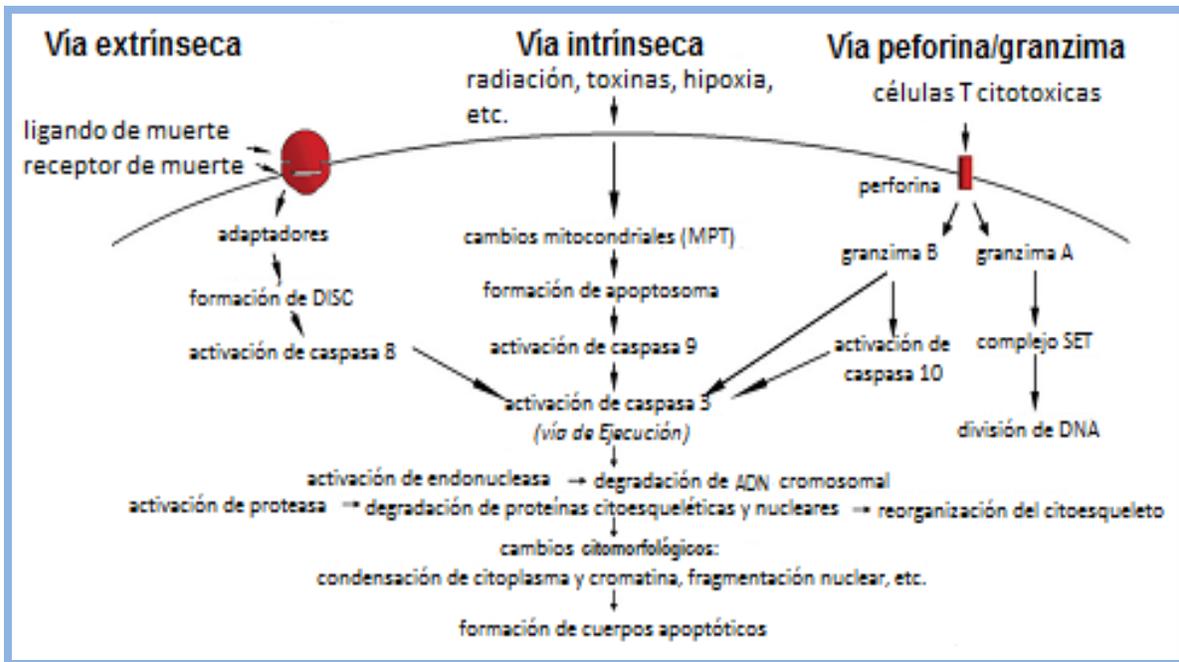
El proceso apoptótico consta de tres fases. Se dividen en fase de iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte e intervienen las caspasas (-8 y -9); en la fase de ejecución se producen la mayor parte de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis e intervienen las caspasas (-3, -6 y -7) y en la fase de eliminación, los restos celulares son degradados por los macrófagos y por las células adyacentes<sup>29</sup>.

### **1.7.1.3. Rutas de activación**

Las rutas de activación que conducen a la muerte celular por apoptosis incluyen dos vías principales (intrínseca y extrínseca) que culminan en un programa de muerte común y cuyas moléculas pueden influir una sobre la otra. La ruta "mitocondrial" o "intrínseca" está regulada por la familia de proteínas Bcl-2 (B Cell Leukemia / Lymphoma 2) que inducen la permeabilidad mitocondrial,

liberando proteínas inductoras de muerte que normalmente están secuestradas dentro de las mitocondrias. La ruta “extrínseca” está mediada por “receptores de muerte” presentes en la superficie celular, entre ellos, la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) <sup>1,6,28</sup>. Además de las vías intrínseca y extrínseca, existe una tercera ruta adicional que implica la citotoxicidad mediada por células T y la muerte de células dependiente de perforina/granzima que induce apoptosis a través de granzima B o granzima A.

Las tres rutas de activación de la apoptosis convergen en la ejecución de la caspasa-3 que genera fragmentación del ADN, degradación y entrecruzamiento de proteínas del citoesqueleto y del núcleo, formación de cuerpos apoptóticos, expresión de ligandos para los receptores de las células fagocíticas y finalmente captación y degradación por las células fagocíticas<sup>28</sup> (**Figura 7**).



**Figura 7. Eventos apoptóticos<sup>28</sup>**

Existe una comunicación entre las dos vías, mediada por la forma trunca de una proteína pro-apoptótica llamada Bid (tBid), que se produce por la ruptura de Bid mediada por la caspasa 8. La tBid actúa inhibiendo la vía BCL2, BCL-XL y activa a BAX y BAK (**Figura 8**).

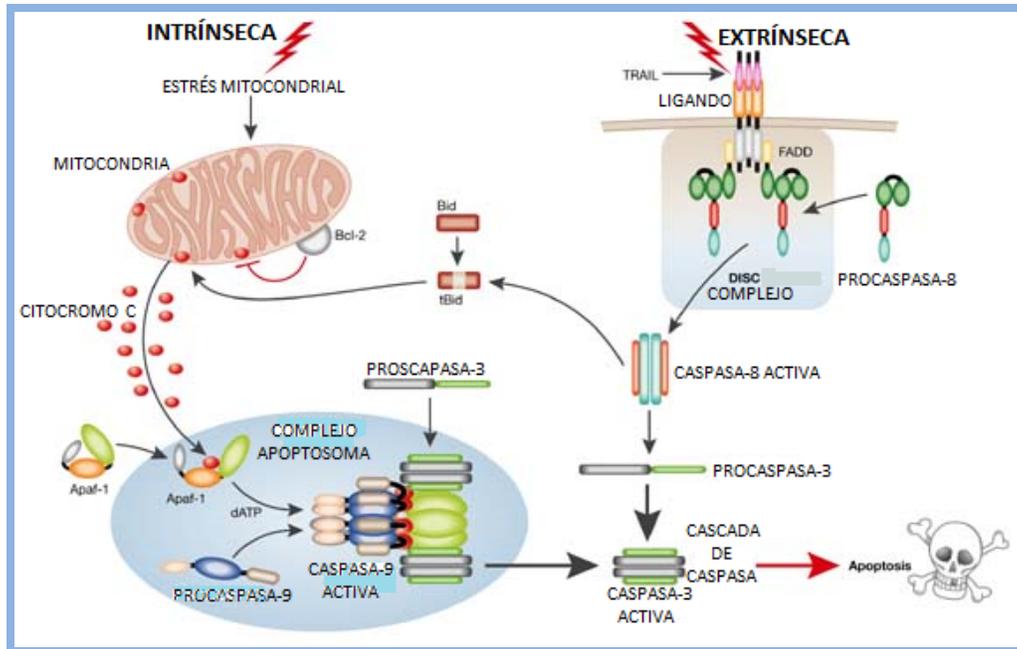


Figura 8. Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis<sup>11</sup>

#### 1.7.1.4. Vía de ejecución y caspasa-3

Las vías extrínseca e intrínseca terminan en el punto de la fase de ejecución, considerada la vía final de la apoptosis, con la activación de las caspasas ejecutoras.

Las caspasas que participan en la fase de ejecución activan endonucleasas y proteasas citoplasmáticas que degradan el material nuclear y proteínas nucleares del citoesqueleto. Entre éstas, se encuentra la caspasa-3 considerada como la más importante de las caspasas ejecutoras que puede activarse por la acción de cualquiera de las caspasas iniciadoras (caspasa-8, caspasa-9 o caspasa-10)<sup>27,28,20</sup>.

Específicamente, la caspasa-3 activa a la endonucleasa CAD (*Caspase-Activated DNase*). En las células proliferantes CAD es un complejo con su inhibidor, ICAD (*Caspase-Activated DNase Inhibitor*). En las células apoptóticas, se activa la caspasa-3 dividiendo ICAD para liberar CAD que degrada al ADN y

causa condensación de la cromatina. La caspasa-3 induce reorganización del citoesqueleto y desintegración de la célula en cuerpos apoptóticos. Gelsolina, una proteína de unión de actina, se ha identificado como una de los principales sustratos de activación de caspasa-3.

La caspasa-3, conocida también como CPP32 (cisteín-proteasa de 32 kDa), Yama ó Apopafina, existe en las células como una pro-enzima inactiva de 32 kDa denominada procaspasa 3, que al activarse genera un dímero de dominios catalíticos idénticos formado por las subunidades activas de 12 y 17 kDa, derivadas del precursor proteico por corte en Asp-Ser y Asp-Ser<sup>2</sup>.

La activación de las caspasa-3 provoca cambios en el núcleo, en la membrana plasmática y en la mitocondria; es responsable parcial o totalmente de la proteólisis de proteínas tales como poli ADP-ribosa polimerasa (PARP) y de un amplio número de sustratos que contienen la secuencia común de residuos Asp-Xaa-Xaa-Asp (DXXD), similar a la descrita originalmente para PARP. Está implicada en el daño tisular por efecto de la isquemia, de la reperfusión, de la hipoxia, de la intubación orotraqueal debido al volumen corriente y con los procesos de congelación y descongelación inherentes a la criopreservación de diferentes células y tejidos<sup>2</sup>.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La reparación de lesiones traqueales de gran longitud es un problema clínico importante todavía no resuelto, que demanda como solución potencial, la búsqueda de una bioprótesis funcional que: a) sea de tamaño suficiente para realizar la reparación, b) mantenga rigidez estructural, c) permita la cobertura del lumen con epitelio ciliado en ausencia de tejido de granulación y e) asegure estabilidad mecánica.

La criopreservación es probablemente el método más efectivo para el mantenimiento de los parámetros morfológicos y bioquímicos de diferentes biomateriales. En el caso de la tráquea, está reportado que mantiene la integridad del músculo liso, del tejido subepitelial, del epitelio y, al parecer reduce la antigenicidad del segmento traqueal utilizado en una reconstrucción. Sin embargo, en cuanto al efecto que ejerce la criopreservación sobre el mantenimiento de la integridad estructural del cartílago, los resultados reportados son contradictorios. Esto ha limitado la aplicación clínica de los segmentos traqueales criopreservados como bioprótesis en una reconstrucción quirúrgica.

En este proyecto de investigación se evaluará la participación de 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 criopreservación de segmentos traqueales durante 60 días a una temperatura de (-196°C) sumergidos en medio RPMI-1640 adicionado con 10% de dimetil sulfóxido, 20% de suero bovino fetal y una solución antibiótica-antimicótica, así como su uso en forma posterior como bioprótesis en reparaciones quirúrgicas utilizando un modelo experimental canino de reconstrucción traqueal de 10 anillos.

### **3. HIPÓTESIS**

La criopreservación provocará un incremento en la expresión de caspasa-3 sin afectar la integridad estructural del tejido cartilaginoso y mientras mayor sea la expresión de caspasa-3 en el cartílago, menor será la utilidad del segmento traqueal criopreservado en la reconstrucción.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto que ejerce la criopreservación con medio RPMI-1640 sobre los cambios microscópicos relacionados con muerte celular por apoptosis en el cartílago, en forma previa y posterior al procedimiento así como en forma posterior a su uso como bioprótesis en una reparación quirúrgica.

### **4.2. Objetivos particulares**

- I. Evaluar el efecto de la criopreservación sobre la expresión de caspasa-3 en el cartílago traqueal.
- II. Evaluar el efecto de la criopreservación sobre los cambios microscópicos en el cartílago traqueal.
- III. Evaluar la expresión de caspasa-3 y los cambios microscópicos relacionados con muerte celular en el cartílago en forma previa y posterior al uso de una bioprótesis de segmento traqueal criopreservado en una reparación quirúrgica.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1. Recursos**

Los recursos humanos y materiales para el desarrollo de esta investigación fueron otorgados por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Ismael Cosío Villegas”.

Se contó con la participación de los investigadores y técnicos de la Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental y del Departamento de Investigación en Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Los animales que se utilizaron en este estudio fueron obtenidos de centros antirrábicos y proporcionados por el Bioterio del INER.

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

Se utilizaron 19 perros mestizos (1 donador + 18 receptores/donadores), clínicamente sanos, con una masa corporal entre 15 y 25 kg, de cualquier sexo, con edad variable, no relacionados entre sí y de “fin de estudio” (utilizados previamente en protocolos de investigación quirúrgica no relacionados con cirugía de cuello).

#### **5.2.1. Criterios de inclusión**

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

### **5.2.2. Criterios de exclusión**

Los animales con datos 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.

### **5.3. Consideraciones éticas**

Los animales fueron mantenidos en condiciones habituales de bioterio y manejados con base en los lineamientos establecidos en las Especificaciones Técnicas Establecidas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Diario Oficial de la Federación, 6 de diciembre, 1999). Estados Unidos Mexicanos<sup>33</sup> y en la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos<sup>34</sup>. El protocolo fue revisado y aprobado por el comité de Bioética y el Comité Científico del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

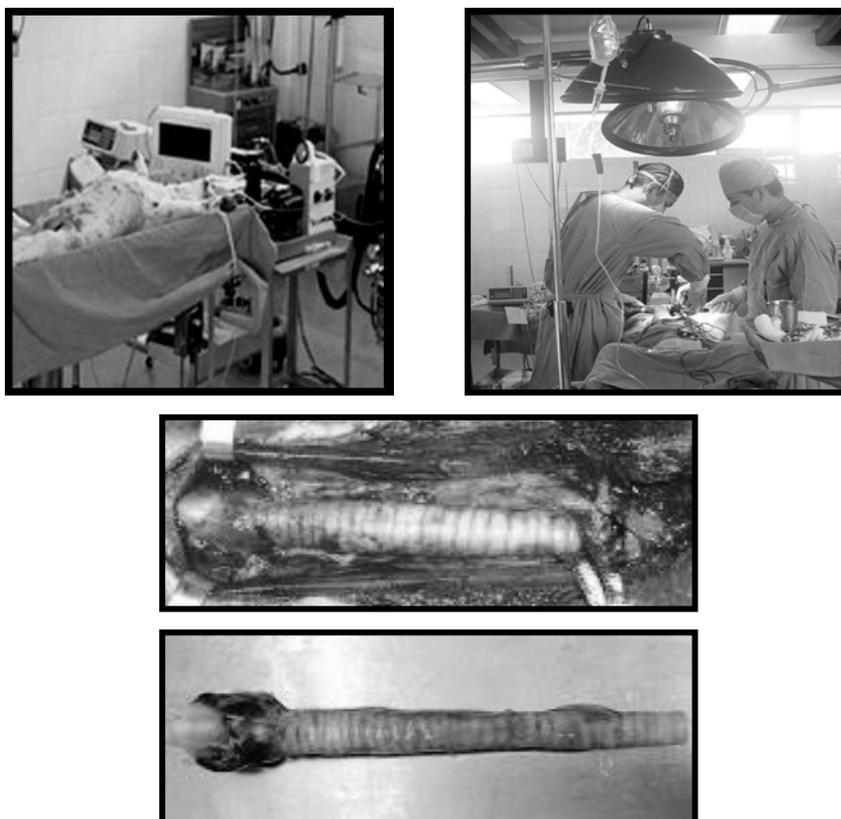
### **5.4. Procuración traqueal**

Cada uno de los animales fue donador de un segmento traqueal y receptor de un segmento traqueal criopreservado. Cuando los animales fueron donadores, se realizó tricotomía, asepsia y antisepsia de la zona tóraco-cervical que se delimitó con campos quirúrgicos. Se practicó una incisión ventral media, con límite craneal en la región de la mandíbula y con límite caudal en la región supraesternal.

Inicialmente, se procuró la tráquea en toda su longitud de un perro donador, ésta se sometió a criopreservación y se utilizó como bioprótesis en los dos primeros animales receptores. Todos los animales se prepararon con 24 horas de ayuno para sólidos y con 12 horas de ayuno para líquidos.

La anestesia se indujo por vía intravenosa con hidrocloreuro de xilacina (0.1 mg/kg, Rompum, Bayer) mezclado con propofol (6 mg/kg, Diprivan, Astra Zeneca) y se mantuvo con isofluorano al 2% durante todo el acto quirúrgico. Los animales se intubaron con una sonda orotraqueal y se conectaron a un ventilador de volumen (Harvard, Apparatus) con un vaporizador (Isotec 3 Ohmeda) manteniendo una frecuencia respiratoria de 20 respiraciones/min, un volumen corriente de 15 mL/kg y una  $FiO_2$  del 100%.

Se resecó el tejido subcutáneo hasta llegar a la tráquea que se diseccionó en toda su circunferencia y se resecó en toda su longitud, utilizando las técnicas quirúrgicas convencionales. Inmediatamente después de la resección y sobre una charola de “mayo” apoyada sobre una cámara de hielo y con bisturí, se realizó una disección fina de la tráquea (**Figura 9**).



**Figura 9. Procuración traqueal**

### 5.5. Obtención de los segmentos traqueales

En forma inmediata posterior a la disección traqueal, con ayuda de un bisturí se reseco el cartílago cricoides, que fue eliminado del estudio. La tráquea del primer donador se cortó en segmentos de doce anillos, 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 estreptomicina (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 10)**.



**Figura 10. Obtención de los segmentos traqueales**

### 5.6. Obtención del anillo traqueal pre-preservación / Anillo control

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 la realización de las evaluaciones control (pre-criopreservación) histológica e inmunohistoquímica de caspasa-3, quedando así segmentos traqueales de once anillos que fueron sometidos a una preservación mediante criopreservación **(Figura 10)**.

## 5.7. Criopreservación de los segmentos traqueales

Cada uno de los segmentos traqueales de once anillos se colocó de manera individual dentro de un criotubo que contenía medio RPMI-1640 (SIGMA, R8758) adicionado con 10% de dimetil sulfoxido (SIGMA, D2650), 20% de suero bovino fetal (GIBCO, 16000-044) y una solución antibiótica-antimicótica (SIGMA, A5955). En forma previa al almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido, los crioviales se colocaron dentro de una caja de unicel perfectamente sellada. Posteriormente la caja se almacenó durante 24 horas en un congelador (REVCO, UFP2350A18) mantenido a (-70°C) con el objeto de disminuir la temperatura de manera gradual (-1°C/min).

Transcurrido el tiempo de congelación a (-70°C), los crioviales fueron transferidos a un tanque con nitrógeno líquido (fase de vapor) a -196°C durante 2 meses (**Figura 11**).

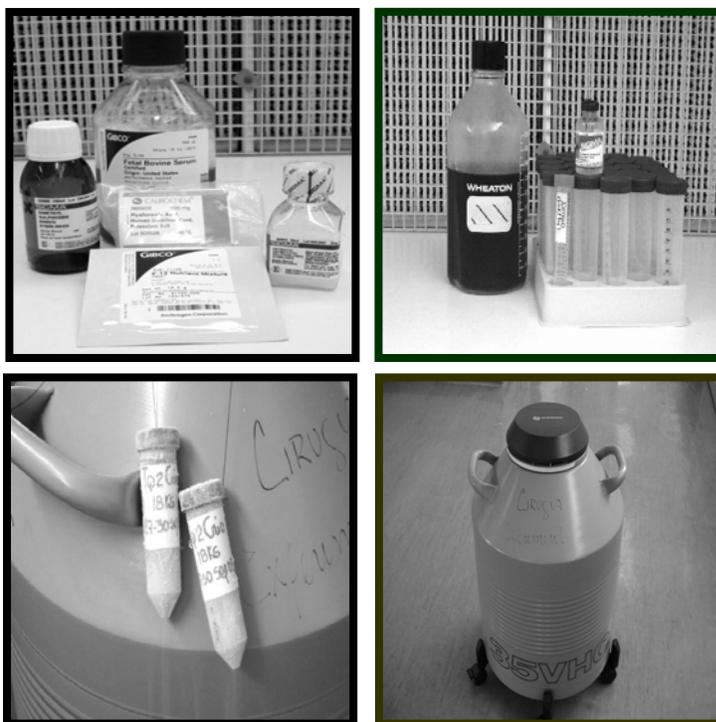
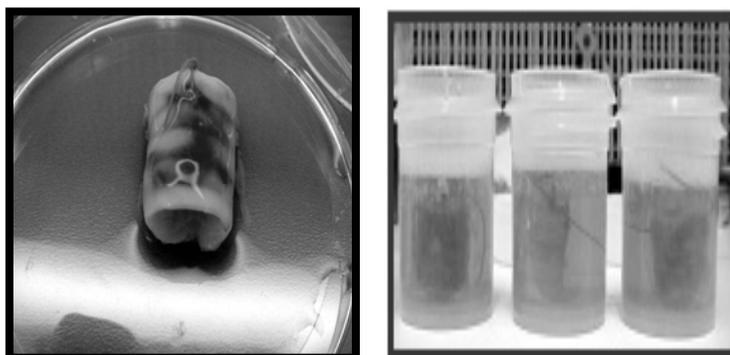


Figura 11. Criopreservación de los anillos traqueales pre-preservación

### 5.8. Obtención del anillo traqueal post-preservación / Anillo pre-reconstrucción

Concluido el tiempo de criopreservación establecido (2 meses) y en forma previa inmediata a la realización de la cirugía, los segmentos traqueales fueron descongelados. Se colocó el criotubo en un baño maría mantenido a una temperatura de 37°C. Se retiraron del criotubo y se enjuagaron durante 30 minutos con solución salina fisiológica mantenida a la misma temperatura. 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. Fue utilizado para la realización de las determinaciones (anillo post-criopreservación / anillo pre-reconstrucción) histológica e inmunohistoquímica de Caspasa-3 (**Figura 12**).

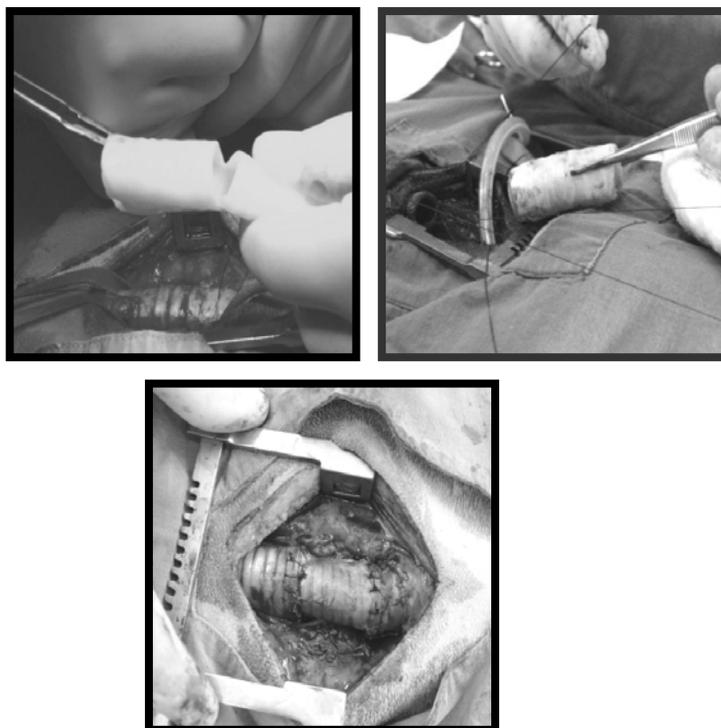


Figuras 12. Obtención de los anillos traqueales post-preservación

### 5.9. Reconstrucción traqueal (colocación del segmento traqueal criopreservado en un animal receptor)

Con base en la masa corporal y la talla de seis animales, se eligieron 6 de los 18 segmentos traqueales criopreservados y fueron utilizados como bioprótesis en una reconstrucción traqueal con una longitud de 10 anillos. El comportamiento de estos 6 segmentos se analizó de manera independiente desde que fueron obtenidos, sometidos a criopreservación, descongelados, utilizados como bioprótesis y al finalizar el estudio (después de practicar la eutanasia).

Los animales receptores se prepararon bajo las mismas condiciones de ayuno y anestesia descritas para los donadores en el inciso 1.4 (procuración traqueal). Utilizando las técnicas quirúrgicas habituales, se resecó un segmento de tráquea cervical con una longitud de 10 anillos y se colocó un segmento traqueal criopreservado de la misma longitud (**Figura 13**).



**Figura 13. Colocación del segmento traqueal criopreservado en un animal receptor**

De los 18 segmentos traqueales criopreservados, 6 fueron trasplantados y, en forma posterior a la colocación del segmento traqueal criopreservado, los animales no recibieron ningún tipo de terapia inmunosupresora. El tiempo de estudio establecido fue de ocho semanas, al término del cual los animales fueron sometidos a eutanasia mediante una sobredosis de pentobarbital de sodio (Anestosal, Pfizer S.A. de C.V. México). Este mismo procedimiento fue utilizado cuando los animales presentaron estenosis traqueal con dificultad para respirar en reposo o cualquier otra afección que comprometiera su calidad de vida sin importar la conclusión del tiempo de estudio establecido.

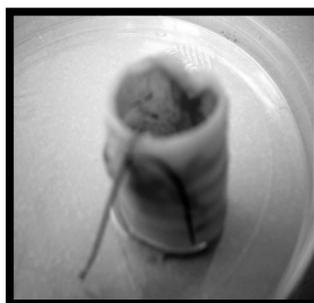
## 5.10. Obtención del anillo traqueal post-cirugía / Fin de estudio

Inmediatamente después de practicar la eutanasia, se procuró el segmento traqueal criopreservado utilizado en la reconstrucción, procediendo conforme a las técnicas quirúrgicas convencionales. Con ayuda de un bisturí se retiró el anillo de uno de los extremos (anillo de fin de estudio) y se sumergió en una solución de formaldehído amortiguado al 10% durante 24 horas para realizar las determinaciones histológicas y de Caspasa-3 por inmunohistoquímica.

## 5.11. Evaluaciones de los segmentos traqueales

### 5.11.1. Evaluación macroscópica

Los segmentos traqueales trasplantados fueron sometidos a tres evaluaciones macroscópicas: la primera de ellas, “evaluación macroscópica pre-criopreservación” se realizó inmediatamente después de que los segmentos traqueales fueron lavados con la solución glucosada en forma inmediata posterior a la procuración de la tráquea y previa a la preservación, la segunda fue una “evaluación macroscópica post-criopreservación”, inmediatamente después de que los segmentos traqueales fueron descongelados y, la tercera evaluación al finalizar el estudio, es decir, en forma posterior a la eutanasia. Esta evaluación incluyó un registro de la integridad estructural del segmento traqueal mediante apreciación visual de los cambios de coloración en los anillos de cartílago y la ocurrencia de fracturas después de descongelar los segmentos traqueales que fueron sometidos a criopreservación (**Figura 14**).



**Figura 14. Evaluación macroscópica**

### 5.11.2. Evaluación microscópica

Los anillos traqueales fueron sometidos a una evaluación microscópica, comparados con la histología normal de la tráquea. La evaluación histológica del cartílago incluyó un registro de las alteraciones en: a) la integridad estructural de los anillos de cartílago utilizando un microscopio óptico (OLYMPUS optical, CH30) bajo aumento 2.5X, b) la tinción gruesa del cartílago bajo aumento 2.5X, c) los cambios en la tinción de las matrices pericelular, territorial e interterritorial bajo aumento 10X y d) con ayuda de un contador manual (THOMAS SCIENTIFIC, 3297R20), se determinó el porcentaje (promedio de cuatro conteos) de los condrocitos conservados (nucleados, sin alteraciones aparentes) y de condrocitos con alteraciones estructurales (picnosis, cariólisis y cariorrexis). Esta evaluación se realizó a lo largo de todo el anillo de cartílago (de extremo a extremo) (**Figura 15**).

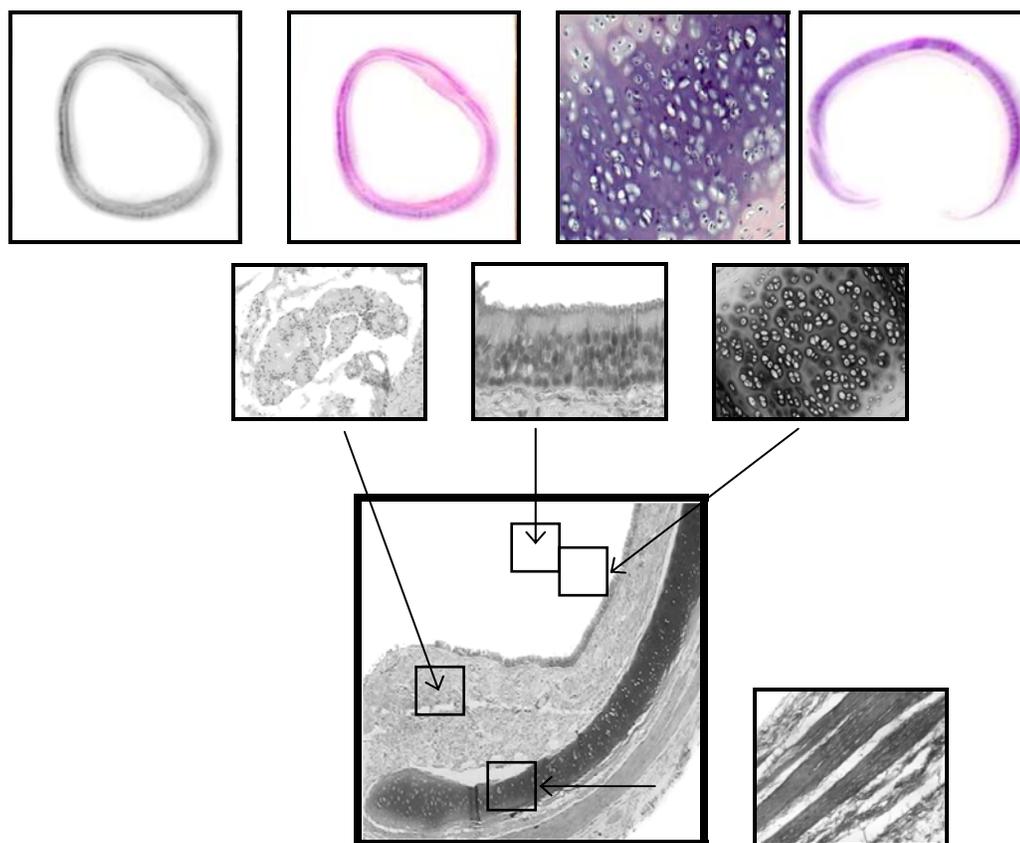


Figura 15. Evaluación microscópica del cartílago traqueal

La evaluación microscópica se realizó en los anillos traqueales control (pre-criopreservación), post-criopreservación (pre-quirúrgica) y post-cirugía (fin de estudio) para lo cual, los anillos traqueales obtenidos en cada uno de los eventos fueron sumergidos en una solución amortiguada de formaldehído al 10% para su fijación. Después de 24 horas fueron retirados del formol y procesados para su inclusión en bloques de parafina y para la obtención de cortes de 4 $\mu$  de grosor para tinciones con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson. De igual manera, de estos bloques se realizaron cortes de 2 $\mu$  de grosor para la determinación inmunohistoquímica de caspasa-3.

### 5.12. Determinación inmunohistoquímica de caspasa-3

La determinación de caspasa-3 en el tejido traqueal se realizó mediante la técnica de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo [Caspase 3 (CPP32) Ab-4, Rabbit Polyclonal Antibody. Neo Markers, Lab Vision, Co. RB-1197], el sistema biotina-avidina-peroxidasa, la tinción con aminoetilcarbazol (BIOGENEX, HK092-5K) y la contratinción con hematoxilina (VECTOR, H-3404). En todos los ensayos se incluyó como control negativo una laminilla de tejido traqueal a la que no se le adicionó el anticuerpo policlonal durante la determinación. La expresión positiva para caspasa-3 en las células del cartílago (**Figura 16**), permite observar las células teñidas de color marrón.



**Figura 16. Determinación Inmunohistoquímica:  
Expresión positiva**

En el cartílago se obtuvo el número total de condrocitos positivos para caspasa-3 con ayuda de un microscopio óptico y de un contador manual para células. Con base en la anatomía de la tráquea, el diámetro de los anillos de cartílago disminuye conforme estos se aproximan a la bifurcación de la carina siendo mayor en los anillos proximales al cartílago cricoides que en los anillos proximales a la carina.

### **5.13. Técnica inmunohistoquímica para la determinación de caspasa-3**

#### **5.13.1. Preparación del tejido**

Los cortes de tejido traqueal se colocaron en canastillas y se incubaron durante 20 minutos dentro de una estufa (TÉCNICA CIENTÍFICA, IC1437B2) mantenida a una temperatura 56°C para su desparafinación. Inmediatamente después el tejido se rehidrató y clarificó mediante una inmersión seriada en xilol (Golden Bell Reactivos, 09101363) (10 minutos), etanol (Golden Bell Reactivos, 09101363) al 70% (2 minutos), etanol al 90% (2 minutos), etanol absoluto (2 minutos), agua (10 minutos) y TBST (Tris Buffered Saline Tween 20) (10 minutos).

#### **5.13.2. 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 (pH:6). La recuperación del antígeno se realizó colocando la caja de “coplin” en baño “maría” (LAB-LINE, AQUABATH, 18007) a una temperatura de 80°C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, la caja de “coplin” se retiró del baño “maría” y se mantuvo a temperatura ambiente para su enfriamiento.

#### **5.13.3. Eliminación de la peroxidasa endógena**

Una vez alcanzada la temperatura ambiente, las laminillas se sometieron a tres lavados seriados de cinco minutos con solución TBST. Con ayuda de un

marcador (Mini Pap-Pen, Invitrogen) y con la finalidad de concentrar el área de reacción antígeno-anticuerpo se delimitó el tejido traqueal.

Las laminillas se escurrieron sobre papel absorbente, se colocaron dentro de una cámara de incubación húmeda mantenida a temperatura ambiente, se adicionaron 100µl de una solución de peróxido al 3% y transcurridos 15 minutos se realizaron tres lavados seriados de cinco minutos cada uno con solución TBST.

#### **5.13.4. Bloqueo del pegado inespecífico / Primer anticuerpo**

Las laminillas se escurrieron sobre papel absorbente y 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.

Las laminillas se escurrieron sobre papel absorbente y se adicionaron 100µl del primer anticuerpo (dilución 1:100 en TBST) complementado con suero bloqueador [Caspase 3 (CPP32) Ab-4, Rabbit Polyclonal Antibody. Neo Markers, Lab Vision, Co. RB-1197]. Las laminillas se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 4°C.

#### **5.13.5. Reacción streptavidina-biotina-peroxidasa**

Transcurrido el tiempo de incubación a 4°C se realizaron tres lavados seriados de cinco minutos cada uno con solución TBST. Las laminillas se escurrieron sobre papel absorbente, se adicionaron 100µl del anticuerpo biotilado y después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente se realizaron tres lavados seriados de cinco minutos cada uno con solución TBST en forma previa a la adición de 100µl del conjugado streptavidina-peroxidasa. Transcurridos 15 minutos se realizaron tres lavados seriados de cinco minutos cada uno con solución TBST y las laminillas se escurrieron sobre papel absorbente.

### **5.13.6. Visualización de la reacción antígeno-anticuerpo**

Se adicionaron 100µl de una solución acuosa de amino-etil-carbazol 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 100µl de una solución saturada de carbonato de litio y al montaje en medio acuoso.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Resultados generales

Se criopreservaron 18 segmentos traqueales, 6 de ellos fueron utilizados en la reconstrucción quirúrgica de 6 defectos traqueales de 10 anillos de longitud.

### 6.2. Evaluación macroscópica del segmento traqueal

En ninguno de los 18 segmentos traqueales se observaron alteraciones aparentes en la integridad estructural ni en la coloración del cartílago. Tampoco se observaron fracturas en forma inmediata posterior a la descongelación de los mismos (**Figura 17**).

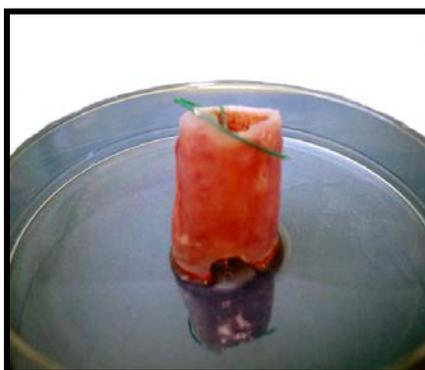


Figura 17. Segmento traqueal sin alteraciones aparentes

### 6.3. Evaluación microscópica de los anillos traqueales

#### 6.3.1. Cartílago

Los porcentajes obtenidos de condrocitos: a) sin alteraciones aparentes, b) con picnosis, c) con cariorrexis, d) con cariólisis y d) lagunas vacías, encontrados en el anillo traqueal, se describen a continuación.

## **a. Condrocitos sin alteraciones aparentes**

### **a1) Pre y post criopreservación (18 segmentos traqueales)**

El porcentaje promedio de condrocitos sin alteraciones aparentes  $\pm$  error estándar fue de  $11.64 \pm 0.76$ , en forma previa a la criopreservación de los segmentos traqueales y de  $9.15 \pm 0.65$ , después de la criopreservación. Este porcentaje no se incrementó significativamente por efecto de la criopreservación (ANDEVA y t-student:  $p > 0.05$ ). Estos resultados se muestran en la **Tabla 1** y se ilustran en la **Gráfica 1**.

### **a2) Pre-post criopreservación y post-reconstrucción traqueal (6 segmentos traqueales)**

De los 18 segmentos traqueales que fueron sometidos a criopreservación, 6 fueron utilizados como bioprótesis y al concluir el estudio, el porcentaje promedio de condrocitos sin alteraciones aparentes  $\pm$  error estándar fue de  $11.00 \pm 0.93$  en forma previa a la criopreservación de los segmentos traqueales, de  $10.60 \pm 1.14$  después de la criopreservación y de  $7.02 \pm 1.08$  en el fin de estudio. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (ANDEVA+Tukey) al comparar el porcentaje entre: anillos pre-criopreservación vs fin de estudio y anillos post-criopreservación vs fin de estudio ( $p < 0.05$ ). Estos resultados se muestran en la **Tabla 2** y se ilustran en la **Gráfica 2**.

## **b. Condrocitos con picnosis**

### **b1) Pre y post criopreservación (18 segmentos traqueales)**

El porcentaje promedio de condrocitos con picnosis  $\pm$  error estándar fue de  $20.18 \pm 0.71$ , en forma previa a la criopreservación de los segmentos traqueales y de  $24.97 \pm 1.11$ , después de la criopreservación. Este porcentaje se incrementó significativamente por efecto de la criopreservación (ANDEVA y t-student:  $p < 0.05$ ). Estos resultados se muestran en la **Tabla 1** y se ilustran en la **Gráfica 1**.

### **b2) Pre-post criopreservación y post-reconstrucción traqueal (6 segmentos traqueales)**

El porcentaje promedio de condrocitos con picnosis  $\pm$  error estándar fue de  $20.30 \pm 0.97$ , en forma previa a la criopreservación de los segmentos traqueales, de  $25.79 \pm 1.86$ , después de la criopreservación y de  $12.67 \pm 1.01$ , en el fin de estudio. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (ANDEVA+Tukey) al comparar el porcentaje entre: anillos pre-criopreservación vs post-criopreservación, anillos pre-criopreservación vs fin de estudio y post-criopreservación vs fin de estudio ( $p < 0.05$ ). Estos resultados se muestran en la **Tabla 2** y se ilustran en la **Gráfica 2**.

### **c. Condrocitos con cariorrexis**

#### **c1) Pre y post criopreservación (18 segmentos traqueales)**

El porcentaje promedio de condrocitos con cariorrexis  $\pm$  error estándar fue de  $0.30 \pm 0.04$  en forma previa a la criopreservación de los segmentos traqueales y de  $0.25 \pm 0.04$  después de la criopreservación. Este porcentaje no se incrementó significativamente por efecto de la criopreservación (ANDEVA y t-student:  $p > 0.05$ ). Estos resultados se muestran en la **Tabla 1** y se ilustran en la **Gráfica 1**.

#### **c2) Pre-post criopreservación y post-reconstrucción traqueal (6 segmentos traqueales)**

El porcentaje promedio de condrocitos con cariorrexis  $\pm$  error estándar fue de  $0.58 \pm 0.09$ , en forma previa a la criopreservación de los segmentos traqueales, de  $0.51 \pm 0.09$ , después de la criopreservación y de  $0.35 \pm 0.08$ , en el fin de estudio. No hubo diferencias significativas (ANDEVA y t-student:  $p > 0.05$ ). Estos resultados se muestran en la **Tabla 2** y se ilustran en la **Gráfica 2**.

### **d. Condrocitos con cariólisis**

#### **d1) Pre y post criopreservación (18 segmentos traqueales)**

El porcentaje promedio de condrocitos con cariólisis  $\pm$  error estándar fue de  $21.27 \pm 1.22$ , en forma previa a la criopreservación de los segmentos traqueales y

de  $31.30 \pm 1.12$ , después de la criopreservación. Este porcentaje se incrementó significativamente por efecto de la criopreservación (ANDEVA y t-student:  $p < 0.05$ ). Estos resultados se muestran en la **Tabla 1** y se ilustran en la **Gráfica 1**.

#### **d2) Pre-post criopreservación y post-reconstrucción traqueal (6 segmentos traqueales)**

El porcentaje promedio de condrocitos con cariólisis  $\pm$  error estándar fue de  $24.03 \pm 2.16$ , en forma previa a la criopreservación de los segmentos traqueales, de  $32.70 \pm 1.82$ , después de la criopreservación y de  $41.10 \pm 2.35$ , en el fin de estudio. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (ANDEVA+Tukey) al comparar el porcentaje entre: anillos pre-criopreservación vs post-criopreservación, anillos pre-criopreservación vs fin de estudio y post-criopreservación vs fin de estudio ( $p < 0.05$ ). Estos resultados se muestran en la **Tabla 2** y se ilustran en la **Gráfica 2**.

#### **e) Lagunas vacías**

##### **e1) Pre y post criopreservación (18 segmentos traqueales)**

El porcentaje promedio de lagunas vacías  $\pm$  error estándar fue de  $43.76 \pm 1.52$ , en forma previa a la criopreservación de los segmentos traqueales y de  $34.78 \pm 1.30$ , después de la criopreservación. Este porcentaje no se incrementó significativamente por efecto de la criopreservación (ANDEVA y t-student:  $p > 0.05$ ). Estos resultados se muestran en la **Tabla 1** y se ilustran en la **Gráfica 1**.

##### **e2) Pre-post criopreservación y post-reconstrucción traqueal (6 segmentos traqueales)**

El porcentaje promedio de lagunas vacías  $\pm$  error estándar fue de  $44.06 \pm 2.19$ , en forma previa a la criopreservación de los segmentos traqueales, de  $30.37 \pm 2.12$ , después de la criopreservación y de  $38.85 \pm 1.81$ , en el fin de estudio. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (ANDEVA+Tukey) al comparar el porcentaje entre: anillos pre-criopreservación vs post-criopreservación y post-criopreservación vs fin de estudio ( $p < 0.05$ ). Estos resultados se muestran en la **Tabla 2** y se ilustran en la **Gráfica 2**.

Tabla 1. Porcentaje de lagunas vacías, condrocitos sin alteraciones aparentes, con cariólisis, con picnosis y cariorrexis en el cartílago traqueal. Valores promedio  $\pm$  EE (error estándar). Valores de significancia (p), ANDEVA y t-Student

Segmento traqueal Porcentaje (%)	Pre- Criopreservación	Post- Criopreservación	Significancia (p)
<b>Condrocitos sin alteraciones aparentes</b> 	(11.64 $\pm$ 0.76)	(9.15 $\pm$ 0.65)	>0.05
<b>Condrocitos con picnosis</b> 	(20.18 $\pm$ 0.71)	(24.97 $\pm$ 1.11)	< 0.001
<b>Condrocitos con cariorrexis</b> 	(0.30 $\pm$ 0.04)	(0.25 $\pm$ 0.04)	>0.05
<b>Condrocitos con cariólisis</b> 	(21.27 $\pm$ 1.22)	(31.30 $\pm$ 1.12)	< 0.001

Tabla 1. Porcentaje de lagunas vacías, condrocitos sin alteraciones aparentes, con cariólisis, con picnosis y cariorrexis en el cartílago traqueal. Valores promedio ± EE (error estándar). Valores de significancia (p), ANDEVA y t-Student (continuación)

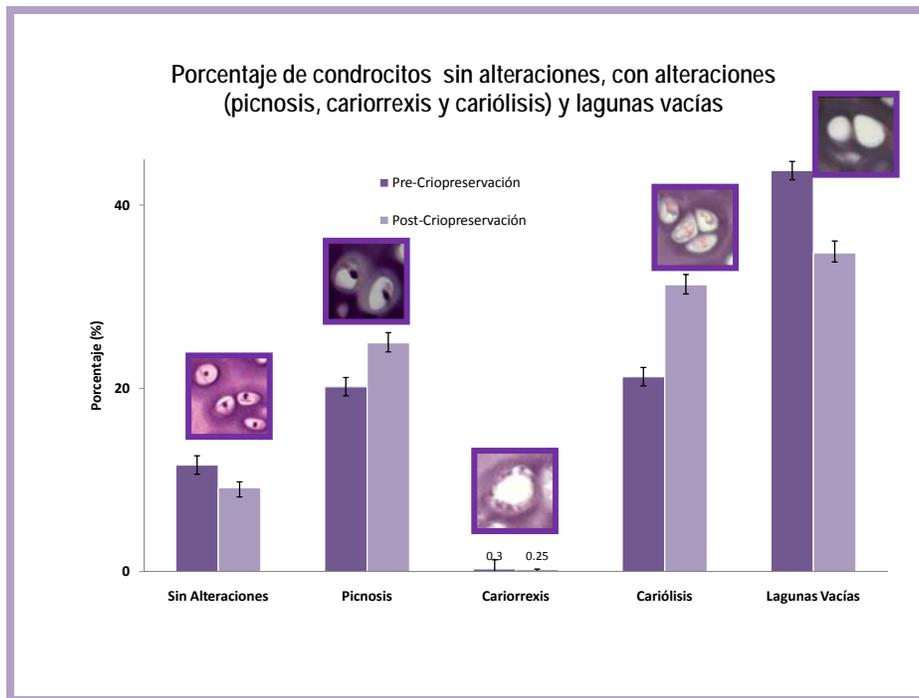
<p><b>Lagunas vacías</b></p> 	(43.76±1.52 )	(34.78±1.30)	<b>&gt;0.05</b>
<b>Porcentaje total</b>	(97.15±4.25)	(100.45±4.18)	

Tabla 2. Porcentaje de lagunas vacías, condrocitos sin alteraciones aparentes, con cariólisis, con picnosis y cariorrexis en el cartílago traqueal. Valores promedio ± EE (error estándar). Valores de significancia (p), ANDEVA+Tukey

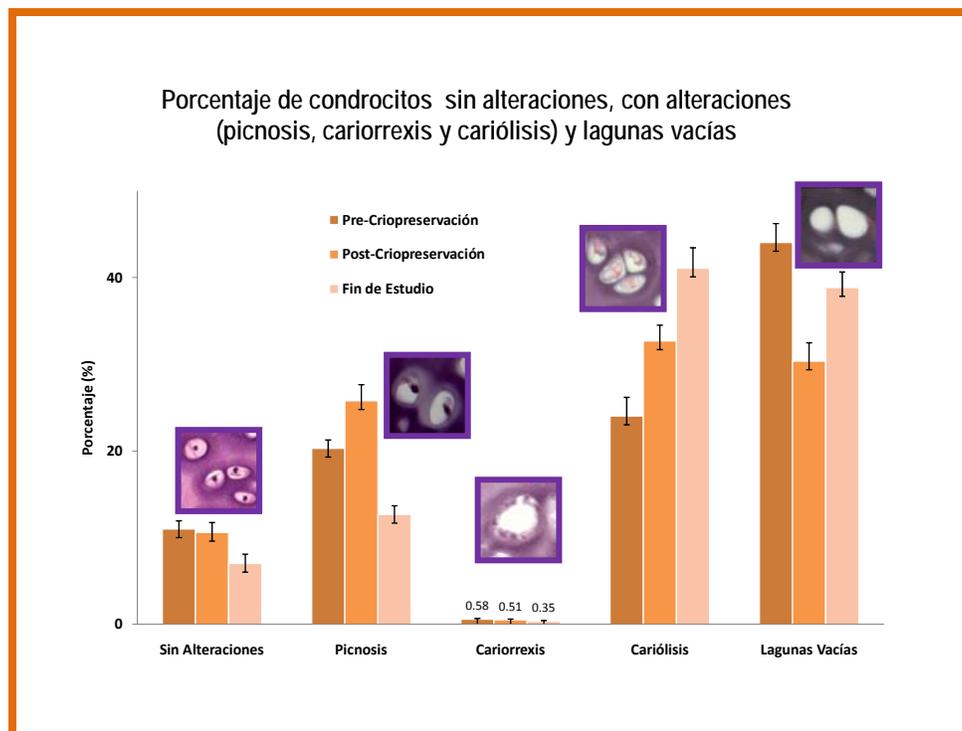
Segmento traqueal	Pre- Criopreservación	Post- Criopreservación	Fin de estudio Post- Reconstrucción	Significancia (p)
<p><b>Condrocitos sin alteraciones aparentes</b></p> 	(11.00±0.93)	(10.60±1.14)	(7.02±1.08)	<p>Pre vs post: <b>p&gt;0.05</b></p> <p>Pre vs fin: <b>&lt; 0.05</b></p> <p>Post vs fin : <b>&lt; 0.05</b></p>
<p><b>Condrocitos con picnosis</b></p> 	(20.30±0.97)	(25.79±1.86)	(12.67±1.01)	<p>Pre vs post: <b>&lt; 0.05</b></p> <p>Pre vs fin: <b>&lt; 0.01</b></p> <p>Post vs fin : <b>&lt; 0.01</b></p>

Tabla 2. Porcentaje de lagunas vacías, condrocitos sin alteraciones aparentes, con cariólisis, con picnosis y cariorrexis en el cartílago traqueal. Valores promedio ± EE (error estándar). Valores de significancia (p), ANDEVA+Tukey (continuación)

<p><b>Condrocitos con cariorrexis</b></p> 	(0.58±0.09)	(0.51±0.09)	(0.35±0.08)	<p>Pre vs post: p&gt;0.05</p> <p>Pre vs fin: p&gt;0.05</p> <p>Post vs fin : p&gt;0.05</p>
<p><b>Condrocitos con cariólisis</b></p> 	(24.03±2.16)	(32.70±1.82)	(41.10±2.35)	<p>Pre vs post: <b>&lt; 0.05</b></p> <p>Pre vs fin: <b>&lt; 0.01</b></p> <p>Post vs fin : <b>&lt; 0.05</b></p>
<p><b>Lagunas vacías</b></p> 	(44.06±2.19 )	(30.37±2.12)	(38.85±1.81)	<p>Pre vs post: <b>&lt; 0.01</b></p> <p>Pre vs fin: p&gt;0.05</p> <p>Post vs fin : <b>&lt; 0.05</b></p>
<p><b>Porcentaje total</b></p>	(99.97±6.34)	(99.97±7.03)	(99.99±6.33)	



**Gráfica 1. Porcentaje de lagunas vacías, condrocitos sin alteraciones aparentes, con cariólisis, con picnosis y cariorrexis en el cartílago traqueal. Valores promedio ± EE. Valores de significancia (p), ANDEVA y t-Student**



**Gráfica 2. Porcentaje de lagunas vacías, condrocitos sin alteraciones aparentes, con cariólisis, con picnosis y cariorrexis en el cartílago traqueal. Valores promedio ± EE (error estándar). Valores de significancia (p), ANDEVA y t-Student**

En la **Tabla 3**, se reportan los porcentajes promedio de los 4 conteos realizados de los condrocitos (sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías), en 5 regiones de los anillos de cartílago (EI = extremo izquierdo, ELI = extremo lateral izquierdo, C = centro, ELD = extremo lateral derecho y ED = extremo derecho), en cada uno de los 18 anillos traqueales, pre-criopreservación y post-criopreservación. En la **Tabla 3a**, se reportan los porcentajes totales de condrocitos sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías, encontrados en cada uno de los 18 anillos de cartílago, en forma previa y posterior a la criopreservación de los segmentos traqueales. En la **Tabla 3b**, se reporta en total de los porcentajes promedio  $\pm$  EE de los condrocitos sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías encontrados en los 18 anillos de cartílago, en forma previa y posterior a la criopreservación de los segmentos traqueales.

En la **Tabla 4**, se reportan los porcentajes promedio de los 4 conteos realizados de los condrocitos (sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías), en 5 regiones de los anillos de cartílago (EI = extremo izquierdo, ELI = extremo lateral izquierdo, C = centro, ELD = extremo lateral derecho y ED = extremo derecho), en los 6 anillos traqueales, pre-criopreservación, post-criopreservación y post-trasplante. En la **Tabla 4a**, se reportan los porcentajes totales de condrocitos sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías, encontrados en cada uno de los 6 anillos de cartílago, en forma previa y posterior a la criopreservación y, post-trasplante de los segmentos traqueales. En la **Tabla 4b**, se reporta en total de los porcentajes promedio  $\pm$  EE de los condrocitos sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías encontrados en los 6 anillos de cartílago, en forma previa y posterior a la criopreservación y, post-trasplante de los segmentos traqueales.

**Tabla 3. Porcentajes de los 4 conteos realizados de los condrocitos (sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías), en cada uno de los 18 anillos traqueales, pre-criopreservación y post-criopreservación**

Número de anillo	Pre-Criopreservación					Post-Criopreservación					
	Lagunas vacías	Sin alteraciones	Picnosis	Cariorrexis	Cariólisis	Lagunas vacías	Sin alteraciones	Picnosis	Cariorrexis	Cariólisis	
1	1	40.8	13.8	29.6	0.8	15	51.4	11.2	30.2	0	7.2
	2	42.6	16.8	26.4	1.8	12.4	55.8	12.8	25.4	0	6
	3	29.4	4.8	18.8	0.4	46.6	39.8	2.6	16.6	0	41
	4	36.8	4.8	16.2	0.6	41.6	39.8	0.8	12.6	0	46.8
2	1	40.8	13.8	29.6	0.8	15	31.8	13	39.8	3.4	12
	2	42.6	16.8	26.4	1.8	12.4	35.2	19	30.2	1	14.6
	3	29.4	4.8	18.8	0.4	46.6	28.8	6.2	19.4	0	45.6
	4	36.8	4.8	16.2	0.6	41.6	28.2	4.6	24.4	0	42.8
3	1	40.8	13.8	29.6	0.8	15	44.6	18	23.4	2	12
	2	42.6	16.8	26.4	1.8	12.4	46.2	16.6	22.4	1.6	13.2
	3	29.4	4.8	18.8	0.4	46.6	30.6	3.2	2.8	0	63.4
	4	36.8	4.8	16.2	0.6	41.6	37.6	5.6	5.4	0	51.4
4	1	46	15.2	24.8	1.2	12.8	24.2	20	36.2	1.8	17.8
	2	52.2	12	21.2	0.8	13.8	28.4	21.8	32.4	1	16.4
	3	39.6	0.4	7.8	0	52.2	10.6	9.8	18.2	0	61.4
	4	31	2.2	4.8	0	62	15.2	5.6	16.8	0	62.4
5	1	45.6	24.2	24.4	0.6	5.2	28.8	11.4	52	0.4	7.4
	2	53	19.8	22.4	0.2	4.6	24.8	17.2	45.8	0	12.2
	3	57.8	8.4	19.4	0.2	14.2	10.8	2.8	41.6	0	44.8
	4	54.2	10.4	18.2	0	17.2	12.2	2.4	26	0	59.4
6	1	48.2	15.2	25.8	0.2	10.6	32.8	17	25.8	0.4	24
	2	50.2	17.6	25.6	0	6.6	30.6	16.6	30	0.2	22.6
	3	64.6	7.8	9.6	0	18	21	7.4	16.6	0.6	54.4
	4	66.4	10.4	10.4	0	12.8	19.8	9	25	0	46.2
7	1	53	13.4	26.8	0.4	6.4	40.4	9.4	40.2	0	10
	2	57	8.2	28	0	6.8	39.6	11	39	0	10.4
	3	66.8	2.6	3.6	0	27	8.2	5.4	40.8	0	45.6
	4	56.2	0.2	7.8	0	35.8	6.6	8.2	33.4	0	51.8
8	1	53	13.4	26.8	0.4	6.4	40.2	22	19	0.6	18.2
	2	57	8.2	28	0	6.8	39.4	20.4	21.8	0.6	17.8
	3	66.8	2.6	3.6	0	27	24.2	8	24.8	0	43
	4	56.2	0.2	7.8	0	35.8	21	9.4	32.2	0	37.4
9	1	42	12	36.2	0	9.8	45.6	15.6	24.2	0.6	14
	2	35.8	20.4	32.8	0	11	42.8	11.4	30.4	0.6	14.8
	3	56.4	5	20.8	0	17.8	15	4.2	9.6	0	71.2
	4	62.4	4	19.4	0.2	14	12.8	2.8	10	0	74.4
10	1	42	12	36.2	0	9.8	46.8	16.4	23.6	0.6	12.6
	2	35.8	20.4	32.8	0	11	50.2	15.2	22	0.4	12.2
	3	56.4	5	20.8	0	17.8	15.2	2.4	14	0	68.4
	4	62.4	4	19.4	0.2	14	14.8	1.2	19	0	65
11	1	33.6	20	28	0.2	18.2	41.4	14.2	33.2	0	11.2
	2	28.4	25.2	29.4	0.4	16.6	43	13.2	32.6	0	11.2
	3	23.8	13.2	28.8	0	34.2	22.8	0.6	21.6	0	55
	4	21.2	14	28.8	0	36	19.8	0.4	24.4	0	55.4
12	1	33.6	20	28	0.2	18.2	32.4	24	27.4	0.6	15.6
	2	28.4	25.2	29.4	0.4	16.6	33.4	24.6	26	0.6	15.4
	3	23.8	13.2	28.8	0	34.2	22.6	4.8	7.2	0.2	65.2
	4	21.2	14	28.8	0	36	37.6	6.4	7.4	0.6	48
13	1	46	15.2	24.8	1.2	12.8	53.4	10.6	29.8	0.2	6

**Tabla 3. Porcentajes de los 4 conteos realizados de los condrocitos (sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías), en cada uno de los 18 anillos traqueales, pre-criopreservación y post-criopreservación (continuación)**

Número de anillo	Pre-Criopreservación					Post-Criopreservación					
	Lagunas vacías	Sin alteraciones	Picnosis	Cariorrexis	Cariólisis	Lagunas vacías	Sin alteraciones	Picnosis	Cariorrexis	Cariólisis	
	2	52.2	12	21.2	0.8	13.8	52.6	9	31.6	0.2	6.6
	3	39.6	0.4	7.8	0	52.2	23.6	1.6	13	0	61.8
	4	31	2.2	4.8	0	62	22.8	1.8	14.4	0	61
14	1	60.8	17.2	19.6	0	2.4	26	16.2	48.4	0	9.4
	2	63.8	13.2	22.2	0	0.8	28.4	16.6	46.6	0	8.4
	3	64.2	32.8	3	0	0	27.2	1.2	54.2	0	17.4
	4	56.6	42.6	0.8	0	0	20.4	1.6	57	0	21
15	1	45.60	24.20	24.40	0.6	5.2	57.8	7.4	28	0.00	6.80
	2	53.00	19.80	22.40	0.20	4.60	56.00	10.20	26.80	0.00	7.00
	3	57.80	8.40	19.40	0.20	14.20	43.80	2.60	10.80	0.00	42.80
	4	54.2	10.4	18.2	0	17.2	39	1	13.4	0	46.6
16	1	48.8	13.2	24.8	0.6	12.6	68.2	6.2	18.8	0	6.8
	2	43.8	10.6	32.2	0.4	13	68	9.4	14.6	0	8
	3	54.6	2.4	0.4	0	42.6	51.4	2.4	14	0	32.2
	4	47.6	3.4	5.2	0	43.8	42.8	2.2	14.6	0	40.4
17	1	48.8	13.2	24.8	0.6	12.6	49.4	11.4	28.4	0	10.8
	2	43.8	10.6	32.2	0.4	13	50.6	11.2	26.8	0.2	11.2
	3	54.6	2.4	0.4	0	42.6	36.2	1	4.8	0	58
	4	47.6	3.4	5.2	0	43.8	28	4.4	7.2	0	60.4
18	1	51.8	13.8	26	0.4	8	54	10.4	28.2	0	7.4
	2	53	10.4	28	0.4	8.2	54	11.2	27.2	0	7.6
	3	55.8	6.4	8.2	0	29.6	39.4	1.6	17.2	0	41.8
	4	49.2	9.4	8.8	0	32.6	33.4	2.4	19.2	0	45

**Tabla 3a. Porcentajes totales de condrocitos sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías, encontrados en cada uno de los 18 anillos de cartilago, en forma previa y posterior a la criopreservación de los segmentos traqueales**

Número de anillo	Pre-Criopreservación					Post-Criopreservación				
	Lagunas vacías	Sin alteraciones	Picnosis	Cariorrexis	Cariólisis	Lagunas vacías	Sin alteraciones	Picnosis	Cariorrexis	Cariólisis
1	37.4	10.05	22.75	0.9	28.9	46.7	6.85	21.2	0	25.25
2	37.4	10.05	22.75	0.9	28.9	31	10.7	28.45	1.1	28.75
3	37.4	10.05	22.75	0.9	28.9	39.75	10.85	13.5	0.9	35
4	42.2	7.45	14.65	0.5	35.2	19.6	14.3	25.9	0.7	39.5
5	52.65	15.7	21.1	0.25	10.3	19.15	8.45	41.35	0.1	30.95
6	57.35	12.75	17.85	0.05	12	26.05	12.5	24.35	0.3	36.8
7	58.25	6.1	16.55	0.1	19	23.7	8.5	38.35	0	29.45
8	58.25	6.1	16.55	0.1	19	31.2	14.95	24.45	0.3	29.1
9	49.15	10.35	27.3	0.05	13.15	29.05	8.5	18.55	0.3	43.6
10	49.15	10.35	27.3	0.05	13.15	31.75	8.8	19.65	0.25	39.55
11	26.75	18.1	28.75	0.15	26.25	31.75	7.1	27.95	0	33.2
12	26.75	18.1	28.75	0.15	26.25	31.5	14.95	17	0.5	36.05
13	42.2	7.45	14.65	0.5	35.2	38.1	5.75	22.2	0.1	33.85
14	61.35	26.45	11.4	0	0.8	25.5	8.9	51.55	0	14.05
15	52.65	15.7	21.1	0.25	10.3	49.15	5.3	19.75	0	25.8
16	48.7	7.4	15.65	0.25	28	57.6	5.05	15.5	0	21.85
17	48.7	7.4	15.65	0.25	28	41.05	7	16.8	0.05	35.1
18	52.45	10	17.75	0.2	19.6	45.2	6.4	22.95	0	25.45

**Tabla 4. Porcentajes de los 4 conteos realizados de los condrocitos (sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías), en cada uno de los 6 anillos traqueales, pre-criopreservación y post-criopreservación**

Número de anillo	Lagunas vacías	Sin alteraciones	Picnosis	Cariorrexis	Cariólisis	
						Pre-Criopreservación
1	1	40.8	13.8	29.6	0.8	15
	2	42.6	16.8	26.4	1.8	12.4
	3	29.4	4.8	18.8	0.4	46.6
	4	36.8	4.8	16.2	0.6	41.6
2	1	40.8	13.8	29.6	0.8	15
	2	42.6	16.8	26.4	1.8	12.4
	3	29.4	4.8	18.8	0.4	46.6
	4	36.8	4.8	16.2	0.6	41.6
3	1	40.8	13.8	29.6	0.8	15
	2	42.6	16.8	26.4	1.8	12.4
	3	29.4	4.8	18.8	0.4	46.6
	4	36.8	4.8	16.2	0.6	41.6
4	1	46	15.2	24.8	1.2	12.8
	2	52.2	12	21.2	0.8	13.8
	3	39.6	0.4	7.8	0	52.2
	4	31	2.2	4.8	0	62
5	1	45.6	24.2	24.4	0.6	5.2
	2	53	19.8	22.4	0.2	4.6
	3	57.8	8.4	19.4	0.2	14.2
	4	54.2	10.4	18.2	0	17.2
6	1	48.2	15.2	25.8	0.2	10.6
	2	50.2	17.6	25.6	0	6.6
	3	64.6	7.8	9.6	0	18
	4	66.4	10.4	10.4	0	12.8
Post-criopreservación						
1	1	51.4	11.2	30.2	0	7.2
	2	55.8	12.8	25.4	0	6
	3	39.8	2.6	16.6	0	41
	4	39.8	0.8	12.6	0	46.8
2	1	31.8	13	39.8	3.4	12
	2	35.2	19	30.2	1	14.6
	3	28.8	6.2	19.4	0	45.6
	4	28.2	4.6	24.4	0	42.8
3	1	44.6	18	23.4	2	12
	2	46.2	16.6	22.4	1.6	13.2
	3	30.6	3.2	2.8	0	63.4
	4	37.6	5.6	5.4	0	51.4
4	1	24.2	20	36.2	1.8	17.8
	2	28.4	21.8	32.4	1	16.4
	3	10.6	9.8	18.2	0	61.4
	4	15.2	5.6	16.8	0	62.4
5	1	28.8	11.4	52	0.4	7.4
	2	24.8	17.2	45.8	0	12.2
	3	10.8	2.8	41.6	0	44.8
	4	12.2	2.4	26	0	59.4
6	1	32.8	17	25.8	0.4	24
	2	30.6	16.6	30	0.2	22.6
	3	21	7.4	16.6	0.6	54.4
	4	19.8	9	25	0	46.2

**Tabla 4. Porcentajes de los 4 conteos realizados de los condrocitos (sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías), en cada uno de los 6 anillos traqueales, pre-criopreservación y post-criopreservación (continuación)**

Número de anillo		Lagunas vacías	Sin alteraciones	Picnosis	Cariorrexis	Cariólisis
		Post-Criopreservación				
1	1	42.6	16.8	23	0	17.6
	2	43	17.6	21.6	0	17.8
	3	29	3	16	0	52
	4	35	0.8	20.2	0	44
2	1	64.6	6.8	14.6	0.6	13.4
	2	66	7.8	12.4	0.6	13.2
	3	43.8	0	0.8	0	55.4
	4	34	0	1.2	0	64.8
3	1	30	14.6	19.8	1.8	33.8
	2	29	14.6	21.8	1.2	33.4
	3	30	0	1	0	69
	4	31	0.4	1	0	67.6
4	1	43.2	21.2	18.6	1.2	15.8
	2	42.8	21.2	21.2	0.6	14.2
	3	32.8	0.2	0.4	0	66.6
	4	27	0	3.8	0	69.2
5	1	51.4	13.8	17.8	0.8	16.2
	2	49.4	13.2	20	0.8	16.6
	3	31.2	0.6	5	0	63.2
	4	30	0.2	3	0	66.8
6	1	61.4	10.2	24	0	4.4
	2	57.2	5.2	28	0.8	8.8
	3	15.2	0	4.8	0	80
	4	12.8	0.4	4.2	0	82.6

**Tabla 4a. Porcentajes totales de condrocitos sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías, encontrados en cada uno de los 18 anillos de cartilago, en forma previa y posterior a la criopreservación de los segmentos traqueales**

Número de anillo	Lagunas vacías	Sin alteraciones	Picnosis	Cariorrexis	Cariólisis
Pre-Criopreservación					
1	37.4	10.05	22.75	0.9	28.9
2	37.4	10.05	22.75	0.9	28.9
3	37.4	10.05	22.75	0.9	28.9
4	42.2	7.45	14.65	0.5	35.2
5	52.65	15.7	21.1	0.25	10.3
6	57.35	12.75	17.85	0.05	12
Post-Criopreservación					
1	46.7	6.85	21.2	0	25.25
2	31	10.7	28.45	1.1	28.75
3	39.75	10.85	13.5	0.9	35
4	19.6	14.3	25.9	0.7	39.5
5	19.15	8.45	41.35	0.1	30.95
6	26.05	12.5	24.35	0.3	36.8
Post-Trasplante					
1	37.4	9.55	20.2	0	32.85
2	52.1	3.65	7.25	0.3	36.7
3	30	7.4	10.9	0.75	50.95
4	36.45	10.65	11	0.45	41.45
5	40.5	6.95	11.45	0.4	40.7
6	36.65	3.95	15.25	0.2	43.95

**Tabla 3b. Valores promedio  $\pm$  EE (error estándar) de los condrocitos sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías encontrados en los 18 anillos de cartílago en forma previa y posterior a la criopreservación de los segmentos traqueales**

	Lagunas vacías	Sin alteraciones	Picnosis	Cariorrexis	Cariólisis		Lagunas vacías	Sin alteraciones	Picnosis	Cariorrexis	Cariólisis
<b>Pre-Criopreservación</b>	Promedio $\pm$ EE	<b>Post-Criopreservación</b>	Promedio $\pm$ EE								
	43.76 $\pm$ 1.52	11.64 $\pm$ 0.76	20.18 $\pm$ 0.71	0.30 $\pm$ 0.04	21.27 $\pm$ 1.22		34.78 $\pm$ 1.30	9.15 $\pm$ 0.65	24.97 $\pm$ 1.11	0.25 $\pm$ 0.04	31.30 $\pm$ 1.12

**Tabla 4b. Valores promedio  $\pm$  EE (error estándar) de los condrocitos sin alteraciones, con picnosis, con cariólisis, con cariorrexis y de lagunas vacías encontrados en los 6 anillos de cartílago en forma previa y posterior a la criopreservación de los segmentos traqueales**

	Lagunas vacías	Sin alteraciones	Picnosis	Cariorrexis	Cariólisis
	Promedio $\pm$ EE				
<b>Pre-Criopreservación</b>	44.06 $\pm$ 2.19	11.00 $\pm$ 0.93	20.30 $\pm$ 0.97	0.58 $\pm$ 0.09	24.03 $\pm$ 2.16
<b>Post-Criopreservación</b>	30.37 $\pm$ 2.12	10.60 $\pm$ 1.14	25.79 $\pm$ 1.86	0.51 $\pm$ 0.09	32.70 $\pm$ 1.82
<b>Post-Trasplante</b>	38.85 $\pm$ 1.81	7.02 $\pm$ 1.08	12.67 $\pm$ 1.01	0.35 $\pm$ 0.08	41.10 $\pm$ 2.35

### 6.3.2. Integridad y degeneración celular (extremos del anillo de cartílago vs región central)

A partir del conteo realizado, se obtuvo el porcentaje promedio de condrocitos conservados y el porcentaje promedio de condrocitos con alteraciones (picnosis, cariólisis y cariorrexis), tanto en los extremos como en la región central de cada uno de los anillos de cartílago.

El porcentaje promedio de condrocitos sin alteraciones aparentes y con alteraciones en el extremo derecho (ED), en el extremo izquierdo (EI) y en la región central (C), encontrados en los 18 anillos traqueales en forma previa a la criopreservación y posterior a la criopreservación (pre-reconstrucción), fue:

*Pre-criopreservación:* (ED: 14.7% sin alteraciones, 85.3% con alteraciones), (EI: 17.5% sin alteraciones, 82.5% con alteraciones) y (C: 23.9% sin alteraciones, 76.1% con alteraciones).

*Post-criopreservación:* (ED: 6.9% sin alteraciones, 93.1% con alteraciones), (EI: 5.2% sin alteraciones, 94.8% con alteraciones) y (C: 18.8% sin alteraciones, 81.2% con alteraciones). Estos resultados se muestran en la **Tabla 5**.

En todos los anillos traqueales, el porcentaje de condrocitos con alteraciones fue significativamente mayor, tanto en los extremos como en la región central del mismo en comparación con el porcentaje de condrocitos sin alteraciones. El porcentaje promedio de condrocitos sin alteraciones es mayor en los anillos traqueales pre-criopreservación en comparación con el porcentaje obtenido en los anillos traqueales post-criopreservación. Estos resultados se muestran en la **Gráfica 3**.

El porcentaje promedio de condrocitos sin alteraciones aparentes y con alteraciones en los extremos y en la región central encontrados en los 6 anillos traqueales en forma previa a la criopreservación, posterior a la criopreservación (pre-reconstrucción) y al finalizar el estudio (post-reconstrucción) fue:

*Pre-criopreservación:* (ED: 13.1% sin alteraciones, 86.9% con alteraciones), (EI: 17.9% sin alteraciones, 82.1% con alteraciones) y (C: 21.0% sin alteraciones, 79.0% con alteraciones).

*Post-criopreservación:* (ED: 6.8% sin alteraciones, 93.2% con alteraciones), (EI: 7.2% sin alteraciones, 92.8% con alteraciones) y (C: 20.2% sin alteraciones, 79.8% con alteraciones).

*Fin de Estudio:* (ED: 15.6% sin alteraciones, 84.4% con alteraciones), (EI: 2.4% sin alteraciones, 97.6% con alteraciones) y (C: 18.9% sin alteraciones, 81.1% con alteraciones). Estos resultados se muestran en la **Tabla 6**.

En todos los anillos traqueales el porcentaje de condrocitos con alteraciones fue significativamente mayor tanto en los extremos como en la región central del mismo en comparación con el porcentaje de condrocitos sin alteraciones.

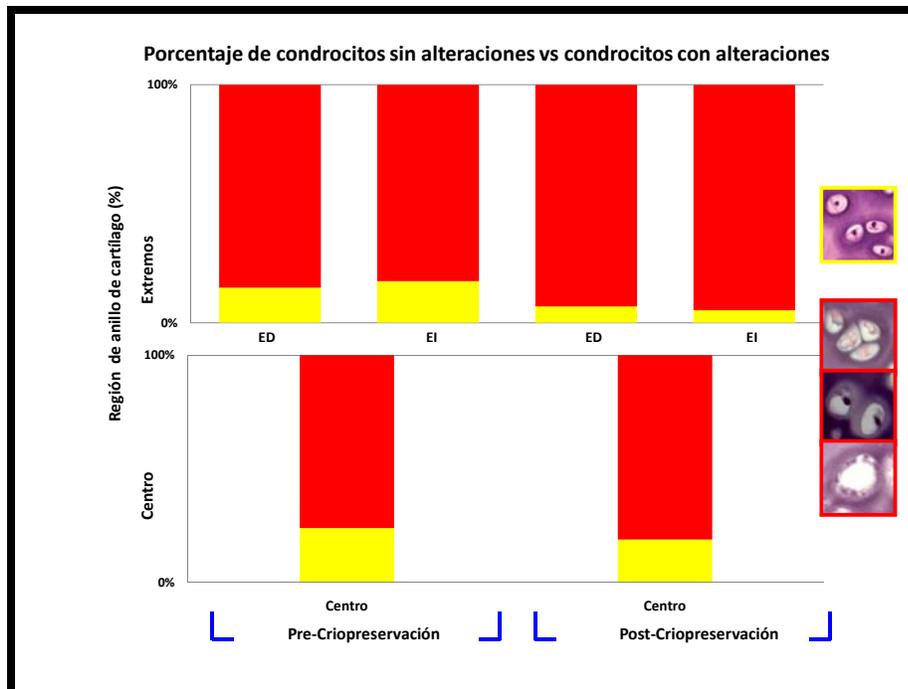
El porcentaje promedio de condrocitos sin alteraciones es mayor en los anillos traqueales pre-criopreservación en comparación con el porcentaje obtenido en los anillos traqueales post-criopreservación.

El porcentaje promedio de condrocitos sin alteraciones es mayor en los anillos traqueales de pre-criopreservación en comparación con el porcentaje obtenido en los anillos traqueales de fin de estudio.

Por último, el porcentaje promedio de condrocitos sin alteraciones es mayor en los anillos traqueales de post-criopreservación en comparación con el porcentaje obtenido en los anillos traqueales de fin de estudio. Estos resultados se muestran en la **Gráfica 4**.

Tabla 5. Porcentaje de condrocitos sin alteraciones y con alteraciones (picnosis, cariólisis y cariorrexis) en los extremos y centro de los anillos de cartílago, n=18

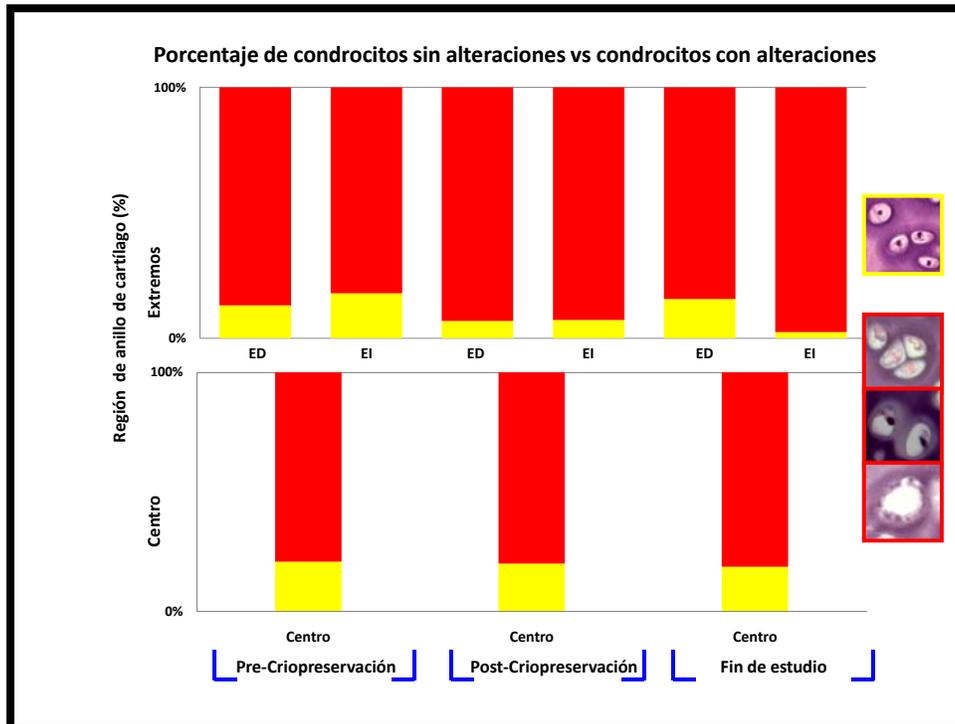
n=18	Pre-Criopreservación		Post-Criopreservación	
	Condrocitos sin alteraciones	Condrocitos con alteraciones (picnosis, cariólisis y cariorrexis)	Condrocitos sin alteraciones	Condrocitos con alteraciones (picnosis, cariólisis y cariorrexis)
Extremo derecho (%)	14.7	85.3	6.9	93.1
Extremo izquierdo (%)	17.5	82.5	5.2	94.8
Centro (%)	23.9	76.1	18.8	81.2



Gráfica 3. Porcentaje de condrocitos sin alteraciones vs condrocitos con alteraciones en los extremos y en la región central del anillo de cartílago, (Extremo derecho (ED), Extremo izquierdo (EI) y Centro (c))

**Tabla 6. Porcentaje de condrocitos sin alteraciones y con alteraciones (picnosis, cariólisis y cariorrexis) en los extremos y centro de los anillos de cartílago, n=6**

n=6	Pre-Criopreservación		Post-Criopreservación		Fin de estudio	
	Condrocitos sin alteraciones	Condrocitos con alteraciones (picnosis, cariólisis y cariorrexis)	Condrocitos sin alteraciones	Condrocitos con alteraciones (picnosis, cariólisis y cariorrexis)	Condrocitos sin alteraciones	Condrocitos con alteraciones (picnosis, cariólisis y cariorrexis)
Extremo derecho (%)	13.1	86.9	6.8	93.2	15.6	84.4
Extremo izquierdo (%)	17.9	82.1	7.2	92.8	2.4	97.6
Centro (%)	21.0	79.0	20.2	79.8	18.9	81.1



**Gráfica 4. Porcentaje de condrocitos sin alteraciones vs condrocitos con alteraciones en los extremos y en la región central del anillo de cartílago, (Extremo derecho (ED), Extremo izquierdo (EI) y Centro (c))**

### 6.3.3. Captación del colorante (tinción con hematoxilina-eosina)

A la tinción con hematoxilina-eosina, sin importar que el anillo traqueal sea pre-criopreservación, post-criopreservación o fin de estudio y con respecto a la coloración basófila del cartílago traqueal común, del total de anillos traqueales analizados (n=42, 100%), el 57.1% (n=24/42) no presentaron alteraciones en la tinción del cartílago. De estos 24 anillos, el 58.3% (n=14/24) perteneció a los anillos traqueales pre-criopreservación, 29.2% (n=7/24) a los anillos traqueales post-criopreservación, y 12.5% (n=3/24) a los anillos traqueales de fin de estudio.

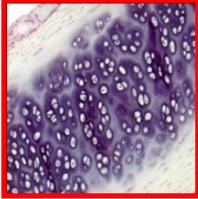
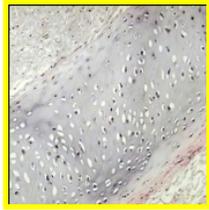
Las alteraciones en la tinción del cartílago se caracterizaron tanto por una intensa captación del colorante (denotando un cartílago hiperteñido) como por una tenue captación del mismo (cartílago débilmente teñido).

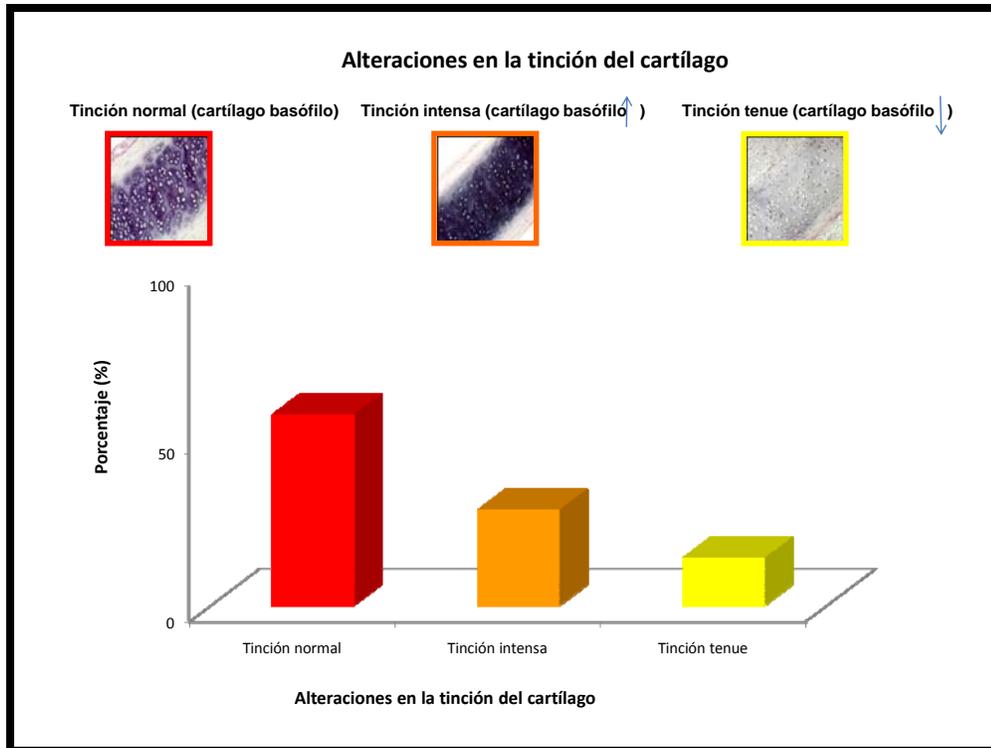
Dieciocho de 42 anillos (42.9%) presentaron alteraciones en la tinción del cartílago, el 28.6% (n=12/18) hipertinción y el 14.3% (n=6/18), una tinción lívida.

De los 12 anillos traqueales con hipertinción, el 25.0% (n=3/12) se encontró en los anillos traqueales pre-criopreservación, el 58.3% (n=7/12) en los anillos post-criopreservación y el 16.7% (n=2/12) en los anillos traqueales de fin de estudio.

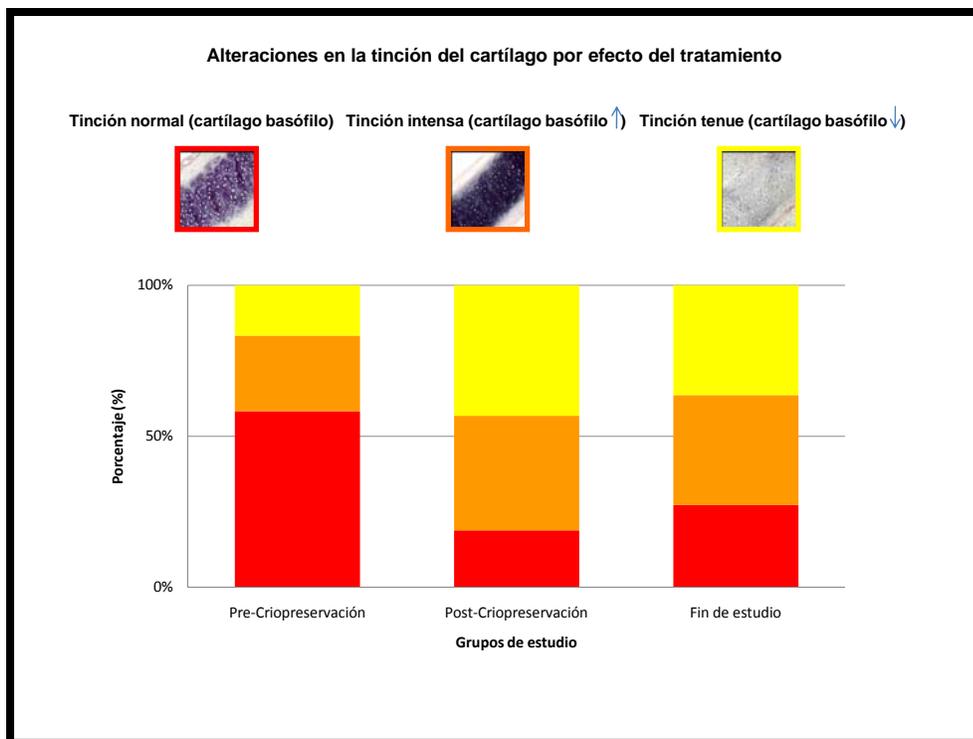
De los 6 anillos traqueales que presentaron captación disminuida del colorante, el 16.7% (n=1/6) correspondió a los anillos traqueales pre-criopreservación, el 66.6% (n=4/6) a los anillos traqueales post-criopreservación y el 16.7% (n=1/6) a los anillos traqueales de fin de estudio. Estos resultados se muestran en la **Tabla 7** y se ilustran en las **Gráficas 5 y 6**.

Tabla 7. Número y (porcentaje) de anillos traqueales que presentaron alteraciones en la tinción del cartílago. Tinción hematoxilina-eosina, (n=número/ %)

Cartílago traqueal (H&E, 10X)	Tinción basófila	Tinción hiperteñida↑	Tinción lívida↓
			
	n (%)	n (%)	n (%)
	24/42 (57.1%)	12/42 (28.6%)	6/42(14.3%)
<b>Pre-Criopreservación</b>	14/24 (58.3%)	3/12 (25.0%)	1/6 (16.7%)
<b>Post-Criopreservación</b>	7/24 (29.2%)	7/12 (58.3%)	4/6 (66.6%)
<b>Fin de estudio</b>	3/24 (12.5%)	2/12 (16.7%)	1/6 (16.7%)



**Gráfica 5. Porcentaje de anillos traqueales que presentaron alteraciones en la coloración del cartílago traqueal con la tinción H-E**

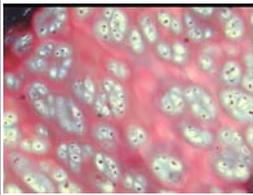
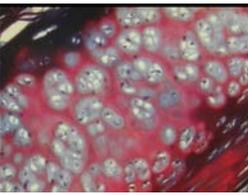
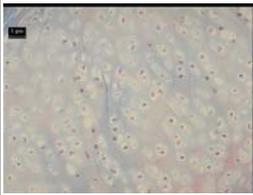
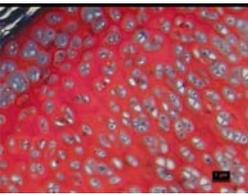


**Gráfica 6. Porcentaje de anillos traqueales pre-criopreservación, post-criopreservación y fin de estudio que presentaron alteración en el cartílago con la tinción H-E**

### 6.3.4. Alteración en la Tinción Tricrómica de Masson

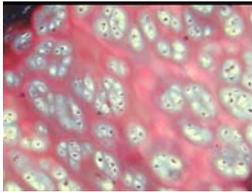
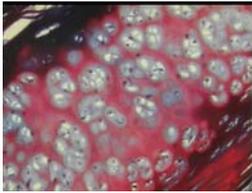
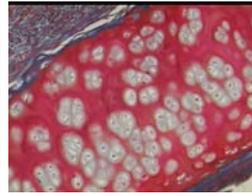
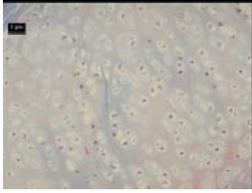
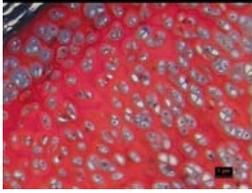
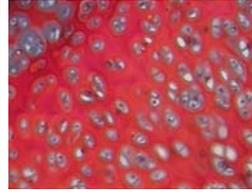
La evaluación de la tinción tricrómica de masson se realizó con respecto al tratamiento de cada anillo traqueal (pre-criopreservación, post-trasplante) y los cambios evaluados fueron en base a “sí” o “no” hubo cambio en la coloración del cartílago traqueal. De los 18 (100%) anillos traqueales el 77.8% (n=14/18) no presentó alteraciones en la tinción tricrómica de Masson y el 22.2% (n=4/18) presentó alteraciones en la tinción tricrómica de Masson. Estos resultados se muestran en la **Tabla 8**.

**Tabla 8. Cambios en la coloración de la tinción tricrómica de Masson en los 18 anillos de cartílago**

Pre-Criopreservación	Post-Criopreservación	Cambios	Número de anillos traqueales que sufrieron cambios	(%)
		NO	14	77.8
		SI	4	22.2
		Total	18	100

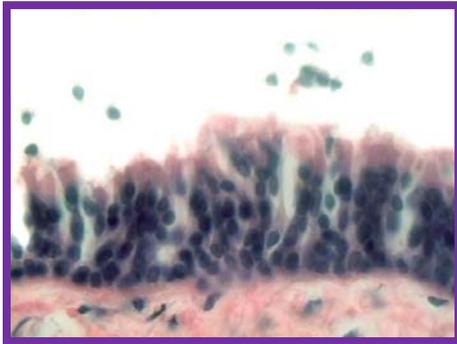
Con respecto a los 6 anillos traqueales elegidos para la reconstrucción quirúrgica (pre-criopreservación, post-trasplante y fin de estudio), 3 (50%) anillos traqueales no presentó alteraciones en la tinción tricrómica de Masson y el 50% (n=3/6) presentaron alteraciones en la tinción tricrómica de Masson. Estas alteraciones se manifestaron en forma posterior a la criopreservación. Estos resultados se muestran en la **Tabla 9**.

**Tabla 9. Cambios en la coloración de la tinción tricrómica de Masson en los 6 anillos de cartílago**

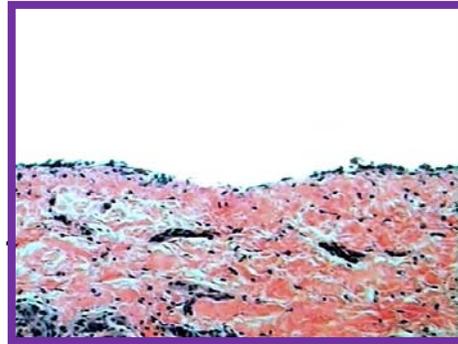
Pre-Criopreservación	Post-Criopreservación	Fin de estudio	Cambios	Número de anillos traqueales que sufrieron cambios	(%)
			NO	3	50
			SI	3	50
			Total	6	100

### 6.3.5. Efecto de la criopreservación sobre el epitelio y glándulas

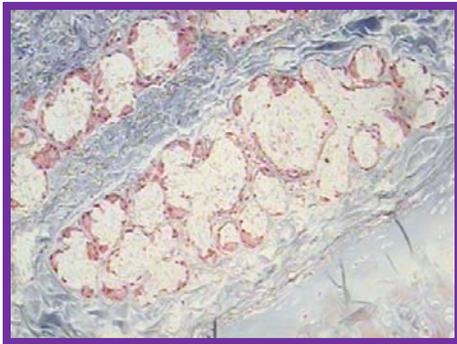
El efecto de la criopreservación causado sobre el epitelio y las glándulas de los segmentos traqueales criopreservados se muestra en la **Figura 17**.



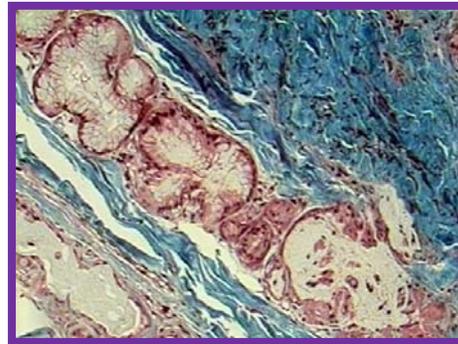
1a



1b



2a



2b

**Figura 18. Efecto de la criopreservación sobre: (1a) epitelio sin alteraciones, (2a) desprendimiento de epitelio por efecto de la criopreservación y (1b) glándulas sin alteraciones, (2b) destrucción de glándulas por efecto de la criopreservación**

### 6.3.6. Determinación de caspasa-3

#### 1a) Expresión de caspasa-3 pre y post criopreservación (18 segmentos traqueales)

Se cuantificó el porcentaje de condrocitos positivos para caspasa-3 en los anillos de cartílago traqueal pre-criopreservación (18 anillos traqueales) y post-criopreservación (18 anillos traqueales). De los 36 (100%) anillos de cartílago traqueal se encontró que únicamente 4 (12.5%) de ellos presentaron expresión de caspasa-3 positiva en las células del cartílago traqueal. Estos 4 anillos corresponden a la pre-criopreservación. Estos resultados se muestran en la **Tabla 10** y en la **Gráfica 7**.

La expresión de caspasa-3 en el cartílago traqueal fue prácticamente nula y disminuye por efecto de la criopreservación, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar expresión de caspasa-3 en forma previa y posterior a la congelación de los segmentos traqueales (t-student:  $p=0.775$ ).

#### 1b) Expresión de caspasa-3 Pre-post criopreservación y post-reconstrucción traqueal (6 segmentos traqueales)

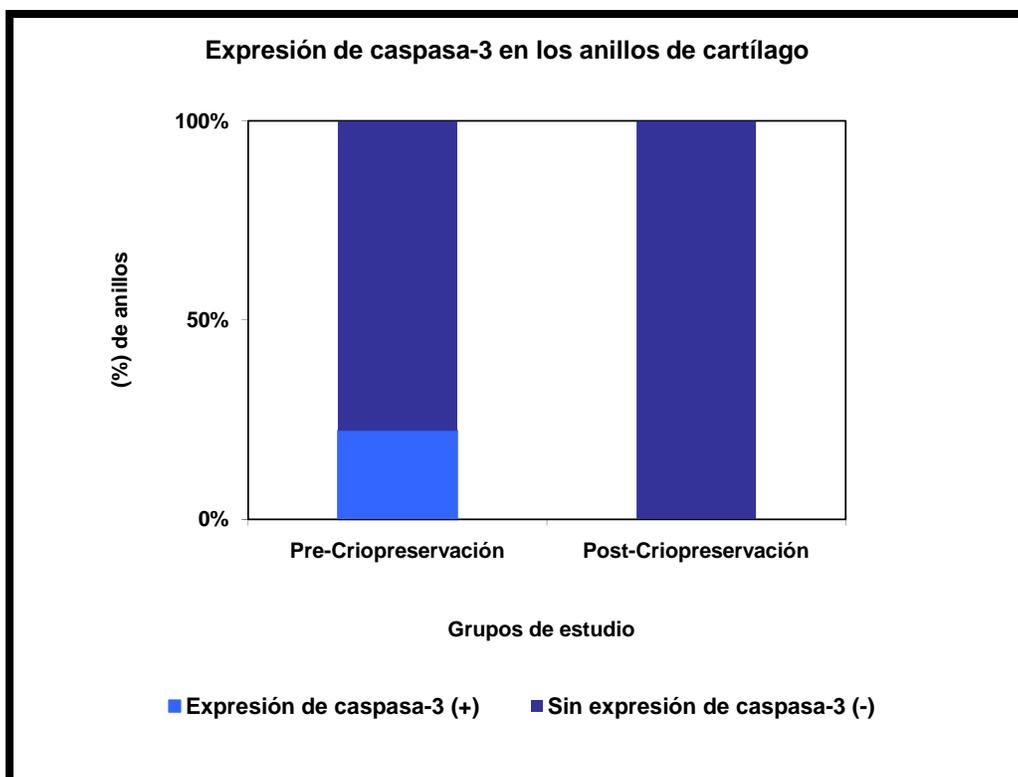
Se cuantificó el porcentaje de condrocitos positivos para caspasa-3 en los anillos de cartílago traqueal pre-criopreservación (6 anillos traqueales), post-criopreservación (6 anillos traqueales) y fin de estudio (6 anillos traqueales). De los 18 (100%) anillos de cartílago traqueal se encontró que únicamente 3 (16.7%) de ellos presentaron expresión de caspasa-3 positiva en las células del cartílago traqueal, 2 corresponden a los anillos pre-criopreservación y 1 corresponde a los anillos de fin de estudio. Estos resultados se muestran en la **Tabla 11** y en la **Gráfica 8**.

La expresión de caspasa-3 en el cartílago traqueal fue prácticamente nula y disminuye por efecto de la criopreservación; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar expresión de Caspasa-3 en

forma previa y posterior a la congelación de los segmentos traqueales ni al finalizar el estudio (t-student:  $p>0.05$ ).

**Tabla 10. Expresión de caspasa-3 en los 18 anillos de cartílago traqueal pre-criopreservación y post-criopreservación**

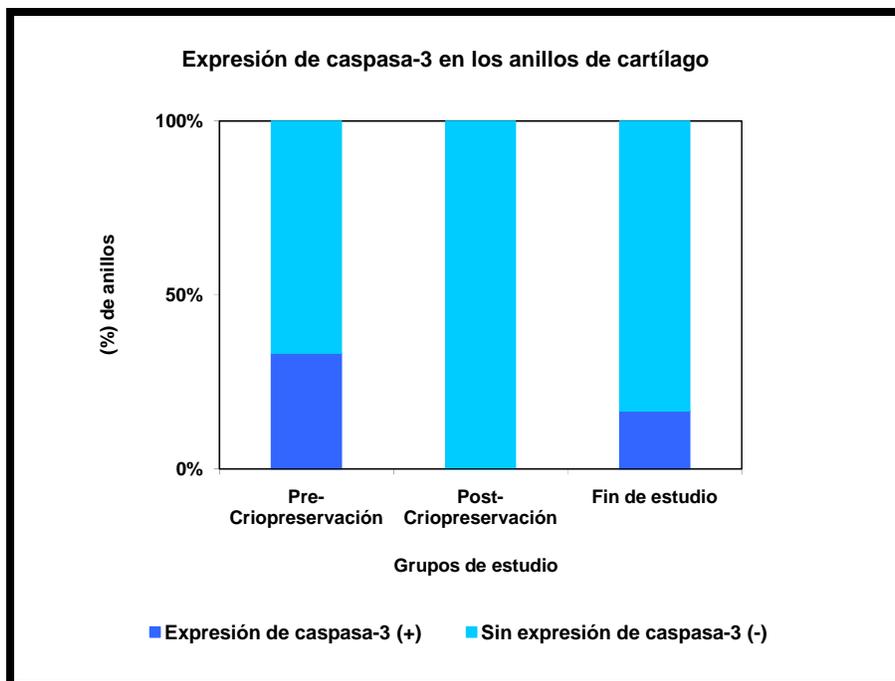
Anillo de Cartílago	Pre-Criopreservación	Post-Criopreservación
	Condrocitos positivos para Caspasa-3	Condrocitos positivos para Caspasa-3
1	1	0
2	14	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	1	0
10	0	0
11	2	0
12	0	0
13	0	0
14	0	0
15	0	0
16	0	0
17	0	0
18	0	0



Gráfica 7. Porcentaje de anillos que presentaron expresión de caspasa-3 en el cartílago

Tabla 11. Expresión de caspasa-3 en los 6 anillos de cartílago traqueal pre-criopreservación, post-criopreservación y fin de estudio

Anillo de cartílago	Pre-Criopreservación	Post-Criopreservación	Fin de estudio
	Condrocitos positivos para caspasa-3	Condrocitos positivos para caspasa-3	Condrocitos positivos para caspasa-3
1	1	0	0
2	14	0	0
3	0	0	0
4	0	0	3
5	0	0	0
6	0	0	0



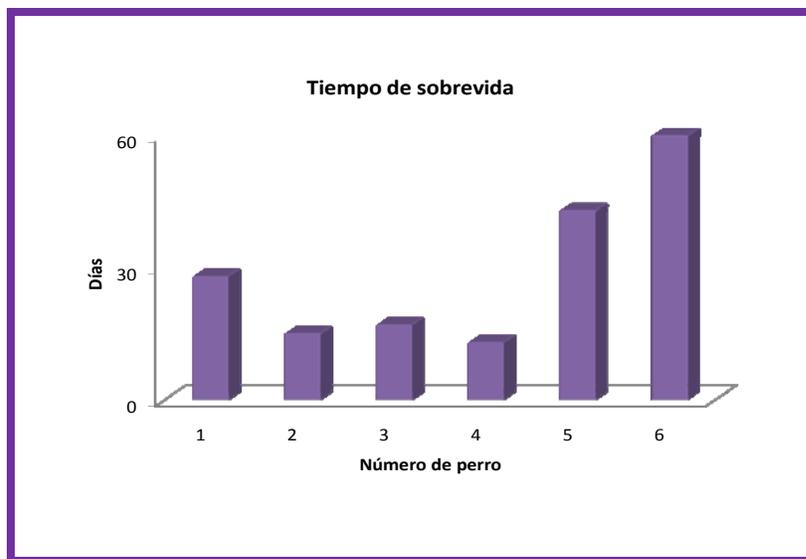
Gráfica 8. Porcentaje de anillos que presentaron expresión de caspasa-3 en el cartilago

#### 6.4. Tiempo de sobrevida

En forma posterior a la reconstrucción, el tiempo promedio de sobrevida  $\pm$  error estándar fue de  $(29.33 \pm 7.64)$  días. Estos resultados se muestran en la **Tabla 12** y se ilustran en la **Gráfica 9**.

Tabla 12. Tiempo de sobrevida expresado en días que presentaron los seis animales en los que se realizó la reconstrucción

Número de Perro	Sobrevida (días)
1	28
2	15
3	17
4	13
5	43
6	60



Gráfica 9. Tiempo de sobrevida expresado en días que presentaron los seis animales de cada uno de los grupos de estudio

Tabla 13. Expresión de caspasa-3 y tiempo de sobrevida

Número de perro	Pre-criopreservación	Post-criopreservación	Fin de estudio	Tiempo de sobrevida (días)
	Expresión de caspasa-3	Expresión de caspasa-3	Expresión de caspasa-3	Expresión de caspasa-3
1	1	0	0	28
2	14	0	0	15
3	0	0	0	17
4	0	0	3	13
5	0	0	0	43
6	0	0	0	60

## 7. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo radicó en evaluar los cambios microscópicos y en la expresión de caspasa-3 que ocurren en el tejido cartilaginoso de segmentos traqueales sometidos a criopreservación y utilizados como bioprótesis en una reconstrucción traqueal. Proponiendo como hipótesis que la criopreservación, provocaría un incremento en la muerte celular por apoptosis sin afectar la integridad estructural del tejido cartilaginoso, y que mientras mayor fuera la expresión de caspasa-3 en el cartílago, menor sería la utilidad del segmento traqueal criopreservado en la reconstrucción.

Bajo las condiciones experimentales establecidas en este proyecto, los resultados obtenidos fueron:

### ***a) Hallazgos macroscópicos***

A la observación macroscópica, la criopreservación de segmentos traqueales durante 60 días a una temperatura de (-196°C) y utilizando medio RPMI-1640 como soporte para realizar la congelación, no provocó alteraciones aparentes en la integridad estructural de los segmentos traqueales.

### ***b) Hallazgos microscópicos en el cartílago***

Inmediatamente después de la obtención de los segmentos traqueales y en forma previa a la criopreservación, el porcentaje de condrocitos sin alteraciones se mantuvo alrededor del 10% y, consecuentemente, el porcentaje de condrocitos con alteraciones nucleares (picnosis, cariólisis y cariorrexis) fue del 90% y no se modificó de manera significativa por efecto de la criopreservación. Sin embargo, al finalizar el estudio (cuando los animales fueron sometidos a eutanasia para retirar el segmento traqueal criopreservado utilizado como bioprótesis) el porcentaje de condrocitos sin alteraciones se redujo al 6%. Esta disminución fue estadísticamente significativa con respecto a los porcentajes encontrados en forma previa y posterior a la criopreservación de los segmentos traqueales y con

predominio de condrocitos con picnosis y cariólisis, alteraciones que se incrementaron significativamente por efecto de la criopreservación. Más aún, esto se dio al retirar la bioprótesis (ANDEVA, t-Student y ANDEVA+Tukey:  $p < 0.05$ ). En este trabajo también se observó que en forma previa a la criopreservación, el porcentaje de condrocitos ubicados en los extremos del anillo de cartílago fue 13-17% de células sin alteraciones + 83-87% de condrocitos con picnosis, cariólisis y cariorrexis. En la región central del anillo, se observó mayor porcentaje de condrocitos sin alteraciones (21-24%) con un menor porcentaje (71-74%) de condrocitos con picnosis, cariólisis y cariorrexis. La criopreservación provocó una disminución importante en el porcentaje de condrocitos sin alteraciones pero solamente en los que se encontraron ubicados en los extremos del anillo (5-7% vs 13-17% pre-criopreservación) lo que incrementó el porcentaje de células degeneradas aproximadamente en un 10% (93-97% post-criopreservación vs 83-87% pre-criopreservación) y no ocurrió lo mismo con los condrocitos ubicados en el centro del anillo, en donde el porcentaje de células sin alteraciones se mantuvo alrededor del 20%. Estos resultados indican que en el cartílago traqueal, la disminución en la viabilidad celular ocasionada por efecto de criopreservación ocurre principalmente en los extremos del anillo y sugieren que los mecanismos de protección y/o penetración de la solución de criopreservación en el cartílago durante el proceso de congelación no son homogéneos y ocurren de manera diferente a lo largo del anillo<sup>2</sup>. Contrariamente a lo encontrado en este trabajo, Sotres-Vega<sup>2</sup> reporta que el mayor porcentaje de condrocitos nucleados en el cartílago traqueal se ubica en los extremos y disminuye significativamente en la región central del anillo y señala que esta región está visiblemente caracterizada por una degeneración celular. Muldrew y colaboradores<sup>41</sup>, y Ohlendorf y colaboradores<sup>42</sup>, indican que durante el proceso de congelación para cartílago articular, los condrocitos de las capas superficial y profunda se mantienen sin cambios, pero no ocurre lo mismo con las células ubicadas en la zona intermedia. Al parecer, éstas son más susceptibles al daño ocasionado por la criopreservación, sugiriendo que 1) existen diferencias biológicas entre los condrocitos de las diferentes zonas morfológicas, 2) la proximidad física a la

superficie permite una mayor recuperación después de la formación de hielo<sup>41</sup> y 3) la adición de dimetilsulfóxido incrementa la viabilidad celular solamente en las células ubicadas en la capa superficial de la matriz del cartílago pero no mejora la viabilidad de las células ubicadas en las zonas centrales del cartílago<sup>42</sup>.

Todos estos hallazgos, en conjunto, sugieren que los mecanismos de protección y penetración de la solución de criopreservación en el cartílago durante el proceso de congelación parecen no ser homogéneos y ocurrir de manera diferente a lo largo del anillo y del segmento traqueal y evidencian que, en todos los diseños experimentales de criopreservación para segmentos traqueales reportados hasta la fecha y sin importar las condiciones de congelación, el porcentaje de condrocitos nucleados disminuyen por efecto de la criopreservación<sup>2,9,11,21,24</sup>.

A la tinción con hematoxilina-eosina y con base en la tinción basófila característica del cartílago, los resultados indicaron que el 42.9% de los anillos analizados presentó alteraciones en la captación de colorante por efecto de la criopreservación. Estas alteraciones se caracterizaron ya sea por una captación intensa del colorante o una tenue tinción del cartílago.

Al analizar los resultados obtenidos con la tinción tricrómica de Masson se observó que, al finalizar el estudio, 5 anillos (27.78%) presentaron cambios drásticos en la coloración de la matriz extracelular.

Las tinciones hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson se clasifican como coloraciones topográficas porque permiten obtener una visión general de las estructuras contenidas en un tejido. Fueron utilizadas para evaluar la continuidad y el desprendimiento del epitelio pseudoestratificado ciliado a lo largo de la mucosa traqueal. También permitieron observar la estructura de las glándulas seromucosas, de los anillos de cartílago, de las fibras de colágena y de las fibras musculares, así como el porcentaje de condrocitos nucleados y de degeneración celular.

Considerando que la eosina es un colorante ácido con densidad de carga negativa puede asociarse a las estructuras del citoplasma y de la matriz extracelular con carga catiónica (tales como filamentos citoplasmáticos, membranas intracelulares y fibras extracelulares). La hematoxilina actúa como un colorante básico con densidad de carga positiva que se asocia a los iones con carga aniónica (sulfatos, fosfatos y carboxilos) contenidos en la cromatina, en los nucléolos. En el caso de la matriz extracelular del cartílago, específicamente en el cartílago, tiñe los glucosaminoglicanos sulfatados que forman parte de los proteoglicanos además de grupos hialurónicos y condroitín sulfato<sup>7</sup>. Con ello es posible indicar la presencia de compuestos químicos y su distribución dentro de las células o espacios extracelulares. Por lo tanto los cambios observados en la matriz del cartílago a través de la captación de colorante parecen indicar una exposición aumentada (hipertinción) o disminuida (tinción tenue) de los grupos sulfato, fosfato y carboxilo. Estos últimos grupos son característicos de los componentes responsables de la consistencia del cartílago (proteoglicanos, glucosaminoglucanos, ácido hialurónico y colágena tipo II), por lo que son capaces de remodelar la matriz extracelular del cartílago ocasionando cambios degenerativos<sup>2</sup>.

***c) Hallazgos microscópicos en el epitelio (submucosa y glándulas traqueales)***

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 la criopreservación provocó desprendimiento del epitelio de la submucosa traqueal y destrucción de las glándulas (epitelio glandular). Las células epiteliales expresan el antígeno de histocompatibilidad mayor clase II. 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>13,30</sup>.

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

La expresión de caspasa-3 en las células del cartílago fue prácticamente nula, no se modificó ni por efecto de la criopreservación ni cuando se retiró la bioprótesis y, por lo tanto, no correlacionó con ninguno de los parámetros evaluados en este trabajo incluyendo el tiempo de sobrevida. Roach, Aigner y Kouri<sup>36</sup> reportan que, aunque en los cultivos de condrocitos se observan células que muestran las características típicas de la muerte celular por apoptosis, 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. Ésta está caracterizada por expansión del retículo endoplásmico rugoso y del aparato de Golgi, extrusión 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 la condroptosis, se observa condensación del núcleo, de la cromatina y expresión de caspasas. Sin embargo, en este trabajo, ni el número de lagunas vacías ni la expresión de caspasa-3 se incrementaron significativamente por efecto de la criopreservación. Estos hallazgos pudieran explicarse por el incremento significativo en el porcentaje de condrocitos con cariólisis y de condrocitos con cariorrexis, aunado a la disminución en el porcentaje de condrocitos nucleados en los extremos del anillo de cartílago. Esto ocurrió por efecto de la criopreservación, además de considerar 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>37</sup> y altera la elastina<sup>39</sup>, incrementa la generación de mediadores inflamatorios<sup>37,38</sup> y la expresión de caspasa 3 en las células bronquiales<sup>40</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.

Con respecto al uso de los segmentos traqueales criopreservados como bioprótesis en una reconstrucción de gran longitud, se puede inferir que, aunque los tiempos de sobrevida variaron entre 13 y 60 días, los animales no recibieron ningún tipo de terapia inmunosupresora. En este trabajo, la criopreservación ocasionó pérdida de la estructura glandular, desprendimiento del epitelio de la mucosa traqueal y una disminución en la expresión de caspasa-3. Estos hallazgos, que coinciden con los reportados en la literatura<sup>13</sup> y pueden atribuirse a una disminución en la viabilidad celular como consecuencia de los procesos de congelación y descongelación inherentes al proceso de criopreservación, permiten inferir que la criopreservación ejerce un efecto inmunomodulatorio sobre la antigenicidad del segmento traqueal utilizado en la reconstrucción, atribuible al desprendimiento de las células epiteliales<sup>2</sup>.

La importancia de este trabajo radicó en que diferentes alteraciones traqueales como estenosis, tumores y malacias relacionadas con la función del cartílago que culminan en una insuficiencia respiratoria y el tratamiento ideal para este tipo de patología, consiste en reseca de manera definitiva el segmento traqueal dañado. Sin embargo, este procedimiento es útil exclusivamente cuando la resección del defecto involucra una longitud máxima de 7cm, lo que excluye a los pacientes que presentan lesiones de mayor extensión. Para ellos, es necesario tratar de paliar la insuficiencia respiratoria ocasionada por obstrucción de la vía aérea mediante la aplicación de procedimientos recurrentes y no definitivos. Entre ellos, están las como traqueotomías, la aplicación de rayo láser, las dilataciones traqueales o la colocación de diferentes tipos de “stents”. Debe destacarse que, a pesar de los numerosos intentos realizados con prótesis sintéticas, bioprótesis, tejidos autólogos, ingeniería de tejidos y trasplantes, actualmente no existen opciones quirúrgicas definitivas para la reparación de lesiones traqueales de gran extensión. La criopreservación es una técnica que ha demostrado tener utilidad en el mantenimiento funcional de diferentes células y tejidos. En la actualidad, a nivel mundial, gran parte de las investigaciones relacionadas con la reparación de lesiones en tráquea están enfocadas en la criopreservación de segmentos traqueales para su uso como aloinjertos en una reconstrucción. Sin embargo; los

resultados experimentales obtenidos acerca del efecto que ejerce la criopreservación sobre el mantenimiento del cartílago son contradictorios. Esto ha limitado la aplicación clínica del procedimiento, dado que los anillos de cartílago constituyen la estructura de soporte que mantiene la vía aérea permeable para el libre movimiento del aire hacia y desde los pulmones, Por ello, se debe continuar investigando el efecto que ejercen diferentes condiciones de congelación sobre el tejido traqueal, hasta establecer la temperatura, el tiempo y la solución de criopreservación que permitan mantener sin alteraciones la integridad estructural del cartílago. Al mismo tiempo, debe favorecerse el desprendimiento del tejido epitelial con la finalidad de disminuir la antigenicidad del injerto utilizado en la reparación. Entonces, el reto a vencer consiste en encontrar las condiciones óptimas de criopreservación con las que, por un lado, sea posible mantener viable el tejido cartilaginoso que mantiene el soporte de la estructura traqueal. Por otro lado, se debe promover la total destrucción del tejido epitelial para reducir la antigenicidad del injerto utilizado en la reconstrucción.

## 8. CONCLUSIONES

Considerando el objetivo general y los particulares de esta investigación: Evaluar el efecto que ejerce la criopreservación con medio RPMI-1640 sobre los cambios microscópicos relacionados con muerte celular por apoptosis en el cartílago, en forma previa y posterior al procedimiento así como en forma posterior a su uso como bioprótesis en una reparación quirúrgica. Evaluar el efecto de la criopreservación sobre la expresión de caspasa-3 en el cartílago traqueal. Evaluar el efecto de la criopreservación sobre los cambios microscópicos en el cartílago traqueal. Evaluar la expresión de caspasa-3 y los cambios microscópicos relacionados con muerte celular en el cartílago en forma previa y posterior al uso de una bioprótesis de segmento traqueal criopreservado en una reparación quirúrgica; así como la hipótesis establecida: La criopreservación provocará un incremento en la expresión de caspasa-3 sin afectar la integridad estructural del tejido cartilaginoso y mientras mayor sea la expresión de caspasa-3 en el cartílago, menor será la utilidad del segmento traqueal criopreservado en la reconstrucción. A continuación se presentan las conclusiones derivadas de ellos:

A la evaluación macroscópica: la criopreservación no provoca alteraciones aparentes en la integridad estructural de los segmentos traqueales.

A la evaluación microscópica, la criopreservación: a) disminuye la viabilidad de los condrocitos, b) no ocurre de manera homogénea a lo largo del anillo de cartílago, c) provoca alteraciones en la expresión de los grupos sulfato, fosfato y carboxilo característicos de los componentes 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, d) provoca desprendimiento del epitelio de la mucosa traqueal, e) destrucción de las glándulas (epitelio glandular), f) una disminución en la expresión de caspasa-3 y g) al parecer, disminuye la antigenicidad de los segmentos traqueales utilizados como bioprótesis.

## 9. REFERENCIAS

1. Villalba-Caloca J. Respuesta tisular del aloinjerto 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. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. 2007.
2. Sotres-Vega A. Evaluación de las alteraciones macroscópicas 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. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. 2010.
3. Gattner L.P., Hiatt J.L. Epitelio y glándulas. Cartílago y hueso. Atlas de Histología, Segunda Ed., Mc Graw Hill; México, D.F. 2002, 83-102, 127-132.
4. Maffet C.R. Anatomía General del Sistema Respiratorio. Anatomía general y del desarrollo II. 2005, 1-11.
5. Anónimo. Neoplasias del Tracto Respiratorio. 2007. Obtenido el 25 de agosto de 2010. Página web:  
[http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Neoplasias+Del+Tracto+Respiratorio&lang=2](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Neoplasias+Del+Tracto+Respiratorio&lang=2)
6. Salassa J.R., Pearson B. W., Payne W. S. Gross and microscopical blood supply of the trachea. Ann Thorac Surg 1997:24(2), 100-107.
7. Junqueira L.C., Carneiro J. Tejido conjuntivo. Tejido cartilaginoso. Histología Básica. Sexta Ed., Masson; México, D.F. 2005, 92-123, 130-135.

8. Mathisen D., Grillo H.C. The trachea. Oxford Textbook of Surgery. Oxford University Press. 2004.
9. Galarza J. 2010. Sistema respiratorio. Obtenida el 25 de Agosto de 2010. Página web: <http://bibliotecadelaesbn18ydelaepbn47.blogspot.com/2009/05/sistema-respiratorio.html>
10. Wu X., Lin M., Li Y., Zhao X., and Yan F. Effects of DMEM and RPMI 1640 on the biological behavior of dog periosteum-derived cells. Department of Periodontology, Fujian Medical University, 246 Yangqiao Zhong Road, Fuzhou, 350002 China. May 18, 2009.
11. Parrino J., Hotchkiss R.S., Bray M. Prevention of immune cell apoptosis as potential therapeutic strategy: Mechanism and regulation of apoptosis. Emer Infect Diseases 2007:13(2), 191-198.
12. Jordán J. Apoptosis: muerte celular programada. OFFARM, 2003:22, 100-106.
13. Sotres-Vega A., Villalba-Caloca J., Jasso-Victoria R., Olmos-Zúñiga R., Gaxiola-Gaxiola M., Baltazares-Lipp M., Santibañez-Salgado A., Doherty P.S. Cryopreserved tracheal grafts: A review of the literature. Journ Invest Surg 2006:19(2), 125-135.
14. Hutchinson I. Trasplante y rechazo. En Roitt I. Brostoff J, Male D. Trasplante y rechazo. Inmunología. Harcoot; España. 1998, 353-366.
15. Gamundi-Palanas M.C., Aumente M.D. Trasplantes. Farmacia hospitalaria. Tomo II. Actualización de conocimientos para farmacéuticos de hospital en tres campos en medicamentos, el sistema sanitario y el paciente. Fundación Española de Farmacia Hospitalaria. 2002, 1563-1600.

16. Barranco-Ruiz J., Blasco-Morilla A., Mérida-Morales M.A., Muñoz-Sanchez A., Jareño-Chaumel J. Agentes inmunosupresores en el trasplante de órganos sólidos. 25 de agosto 2010. Página Web: <http://tratado.uninet.edu/c080301.html>
17. Ueda M., Yokomise H., Wada H., Hitomi S. Experimental tracheal transplation for possible clinical application. *Transplant Proc* 1997;29, 871-873.
18. Nakanishi R., Shirakusa T., Hanagiri T. Early histopathologic of tracheal allotransplant rejection: A study in nonimmunosuppressed dogs. *Transplant Proc* 1994;26, 3715-1718.
19. Liu Y., Nakamura T., Shimizu Y., Ueda H., Yoshitani M., Toba T., Fukuda S. Tracheal allotransplation in Beagle dogs without immunosuppressants. *Ann Thorac Surg* 2001;72, 1190-1194.
20. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. En profundidad apoptosis en los linfocitos. *Inmunología Celular y Molecular*. ELSEVIER Saunders; Sexta Ed. 2006, 256-259.
21. Olmos-Zuñiga R., Rubi V.E., Jasso-Victoria R., Sotres-Vega A., Gaxiola-Gaxiola M., Santibañez-Salgado A., Baltazares-Lipp M., Doherty P.S., Villalba-Caloca J. Trasplante experimental de tráquea cervical combinado con la aplicación de factor de crecimiento de fibroblastos. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx* 2006, 172-179.
22. Grillo H.C., Development of tracheal surgery: a historical review. Part 1: Techniques of tracheal surgery. *Ann Thorac Surg* 2003;75, 610-619.

23. Borro-Mate J.M. Estado actual de la cirugía traqueal en Galicia. *Pneuma* 2006;6, 129-130.
24. Álvarez S.G., Gómez F.G., Delgado I.G., Manceras A.C. Riesgos de los líquidos criogénicos. *Téc Indust* 2007(268), 31-37.
25. Crioprotector. 2006. Obtenido el 16 de agosto de 2010. Página web: <http://motoroil-antifreeze.com/es/crioprotector.html>
26. Elinos-Báez C.M., Maldonado V. Meléndez J. Caspasas: Moléculas inductoras de apoptosis. *Gac Méd México* 2003;139(5), 493-500.
27. Richard S., Hotchkiss R.S., Strasser A., McDunn J.E., Swanson P.E. Cell death. *N Engl J Med* 2009;361(16), 1570-1583.
28. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4), 495-516.
29. Sánchez Torres LI.E., Diosdado-Vargas F. Apoptosis: El fenómeno y su determinación. *Tec Pecu Mex* 2003;41(1), 49-62.
30. 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 Surg Cardiovasc Surg* 1998, 116, 624-627.
31. Fink S.L., Cookson B.T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* 2005;73(4), 1907-1916.
32. Chang H.Y., Yang X. Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases. *Microb Molec Biol Rev.* 2000;64(4), 821-846.

33. Especificaciones Técnicas para la Producción Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Diario Oficial de la Federación. Estados Unidos Mexicanos. 1999, Diciembre 6.
34. Guide for Care and Use of Laboratory Animals. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. 1985.
35. Michael O. Hengartner. The Biochemistry of Apoptosis. *Nature*. 2000:407, 770-776.
36. Roach H.I., Algnier T., Kouri J. B. Chondroptosis: A variant of apoptotic cell death in chondrocytes?; *Apoptosis*. 2004:9:3, 265-277.
37. Hirsch J., Hansen KC., Sapru 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.
38. Wilson M.R., Choudhury S., Goddard ME. High tidal volume upregulates intrapulmonary cytokines in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol*. 2003:95, 1385-1393.
39. Bland R.D., Ertsey R., Mokres L.M. 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(1), 3-14.
40. Hu G.D., Cai S.X., Chen Y.H. 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. Abstract en Inglés (medline).

41. Muldrew K., Novak K., Yang H., Zernicke R., Schachar N.S., McGann L.E. Cryobiology of articular cartilage: Ice morphology and recovery of chondrocytes. *Cryobiology* 2000;40(2), 103-104.
  
42. Ohlendorf C., Tomford W., Mankin H.J. Chondrocyte survival in cryopreserved osteochondral articular cartilage. *J Orthop Res* 1996;14(3), 413-416.