

T  
1198

 XOXIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION  
ARCHIVO HISTORICO

1198

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Casa abierta al tiempo**

*“Evaluación de las alteraciones  
macroscópicas, microscópicas y en la expresión de caspasa-3  
en el tejido traqueal criopreservado por efecto  
de la solución, de la temperatura y del tiempo de congelación”*

## **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

M. en C. AVELINA SOTRES VEGA

COMITÉ TUTORIAL

CO-DIRECTORES

DRA. ANA MARÍA ROSALES TORRES

DR. CARLOS RAMOS ABRAHAM

ASESOR

DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

México, D.F.

ENERO 2010

“El Doctorado en Ciencias Biológicas  
de la Universidad Autónoma Metropolitana  
pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta  
con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93”

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las  
Unidades Iztapalapa y Xochimilco  
Aprobó la tesis que presentó

**AVELINA SOTRES VEGA**

El día 29 de enero del año 2010

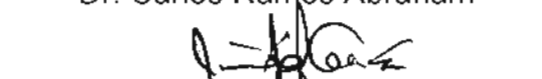
Jurado:



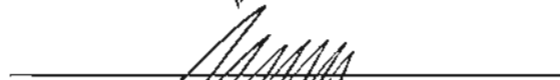
Co-Director y Presidente:  
Dra. Ana María Rosales Torres



Co-Director:  
Dr. Carlos Ramos Abraham



Asesor:  
Dr. Luis Felipe Jiménez García



Sinodal y Secretario:  
Dr. Jaime Villalba Caloca



Sinodal:  
Dr. Víctor Ruiz López

Este proyecto se realizó con financiamiento del Departamento de Investigación en Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" bajo la asesoría del Dr. Jaime Villalba Caloca, Dr. Miguel O. Gaxiola Gaxiola, Dra. Ana María Rosales Torres, Dr. Carlos Ramos Abraham y Dr. Luis Felipe Jiménez-García.

*A mi Mamá  
A mi Titita  
A mi hermana Ana Cristina  
Por estar siempre conmigo*

*A Don Jaime, Lulú, Matilde, Miguel, Alfredo, Beto, Sergio, Juan Carlos, Lupita,  
Ericka, Ana María, Carlos, Luis Felipe, Angélica, Raúl y Dr. Jasso, gracias.*

## Acerca de la Función y del Trasplante de Órganos

*“Había una vez un pequeño pájaro que nació sin alas y sus papás se propusieron conseguir unas alas para el bebé. Fueron a buscar a la avestruz para pedirle unas alas, pero se dieron cuenta que eran demasiado grandes, después fueron a buscar a los pingüinos, pero notaron que esas alas no volaban, hasta que por fin encontraron un aguilucho que estaba muriendo y dijo, que le donaría sus alas cuando ya no las necesitara para que el pequeño bebé pájaro pudiera volar para siempre”.*

\*Sebastián Sotres Olavarria

*“Había una vez una tortuguita que tenía las orejas muy grandes y todas las demás tortugas le decían orejitas. Cierta día nadando en el mar, logró escuchar a lo lejos que los cazadores de tortugas hablaban entre ellos, que querían atrapar a todas las tortugas del océano. Orejitas al escucharlos nadó y nadó rápido para avisar que los cazadores venían en camino y todas las tortugas se escondieron en la cueva de los tiburones y nunca las encontraron y desde entonces se dieron cuenta que orejitas, escuchaba mejor que todas”*

\*Samantha Sotres Olavarria

\*Ellos También Cuentan. Creaciones de nuestros pequeños grandes escritores. Campaña de promoción y desarrollo de literatura infantil. Cancún QR, México. Grupo Sur Editorial Océano. 2004.

## RESUMEN

Actualmente, no existen alternativas quirúrgicas definitivas para la reparación de lesiones traqueales de gran longitud. La criopreservación ha demostrado tener utilidad en el mantenimiento de los parámetros estructurales y funcionales en diferentes células y tejidos. Los procesos de congelación y descongelación inherentes a la criopreservación disminuyen la viabilidad celular. La apoptosis es un tipo de muerte celular controlado por la activación de caspasas. La caspasa-3 está implicada en el daño tisular por efecto de la isquemia, reperfusión, hipoxia, intubación orotraqueal y criopreservación. Los modelos experimentales de reconstrucción con segmentos traqueales criopreservados difieren en los resultados obtenidos acerca del mantenimiento estructural del cartílago, esto ha limitado la aplicación clínica del procedimiento. En este proyecto, se evaluaron las alteraciones macroscópicas, microscópicas y en la expresión de caspasa-3 que ocurren en el tejido traqueal por efecto de la solución, de la temperatura y del tiempo de congelación. Mediante las técnicas quirúrgicas habituales se obtuvieron las tráqueas de 9 perros mestizos. Las tráqueas se cortaron en segmentos (ST) de 5 anillos que fueron divididos al azar en 8 grupos de estudio (n=6 /grupo) y sometidos a criopreservación durante: 48 horas a (-70°C) (Grupos 2 y 3), 15 días a (-70°C) (Grupos 4 y 5), 48 horas a (-70°C) + 15 días de almacenamiento inmediato posterior en nitrógeno líquido (NL) (-196°C) (Grupos 6 y 7) y 15 días a (-70°C) + 15 días de almacenamiento inmediato posterior en NL (-196°C) (Grupos 8 y 9). Se incluyó un grupo control (Grupo 1) en el que los ST no fueron sometidos a ningún tipo de criopreservación. Las soluciones de criopreservación utilizadas incluyeron medio F12K complementado con 20% de Suero Bovino Fetal (SBF) (Grupos 2, 4, 6 y 8) y SBF al 90% (Grupos 3, 5, 7 y 9). Concluido el tiempo de criopreservación, los ST fueron descongelados, enjuagados en medio F12K, sumergidos en formol al 10%/24 horas y cortados en anillos. Los anillos medio y de ambos extremos (superior, e inferior) (n=54/grupo de estudio) fueron procesados para evaluaciones microscópica del tejido traqueal y de la expresión de caspasa-3 por inmunohistoquímica, éstas se realizaron inmediatamente después de la obtención de los ST en el grupo control y una vez concluido el tiempo de criopreservación en el resto de los grupos de estudio. Independientemente de la solución, de la temperatura y del tiempo de congelación, la criopreservación provoca: alteraciones en la tinción del cartílago, éstas fueron más evidentes en el anillo localizado en el extremo inferior del ST y una disminución en el porcentaje de los condrocitos nucleados ubicados en la región central del anillo de cartílago. El uso de SBF como solución de criopreservación y el almacenamiento de los segmentos traqueales en NL genera alteraciones importantes en la matriz del cartílago y una disminución importante en la expresión de caspasa-3 en tejido traqueal, estos resultados sugieren que la criopreservación no ocurre de manera homogénea ni a lo largo del ST ni a lo largo del anillo de cartílago, el uso de SBF con NL compromete la consistencia del cartílago y la expresión de caspasa-3 en el tejido traqueal no refleja el daño ocasionado por efecto de la criopreservación.



## ABSTRACT

At the moment, there are not definitive surgical alternatives for tracheal lesions longer than 6 cms. Cryopreservation has showed to be useful keeping the structure and function in different cells and tissues. The freezing and thawing processes of cryopreservation decrease cell viability. Apoptosis is programmed cell death, controlled by Caspase activation. Caspase-3 is implicated in tissue damage due to hypoxia, ischemia-reperfusion, orotracheal intubation and cryopreservation. The research works of experimental tracheal reconstruction with cryopreserved tracheal segments are controversial, showing a wide range of structural damage in tracheal cartilage, limiting its clinical application. This research work assessed the macroscopic and microscopic changes as well as Caspase-3 expression in tracheal tissue with 2 cryopreservation solutions, temperature and freezing storage time. Nine tracheas were harvested from nine mongrel dogs. The tracheas were cut in 5 rings segments (TS) which were randomly designated into 8 study groups (n=6). Group one as the control group without cryopreservation; groups 2 and 3 were cryopreserved 48 h at -70°C; group 4 and 5 were cryopreserved 15 days at -70°C; groups 6 and 7 were cryopreserved 48 h at -70°C + 15 days storage in liquid nitrogen (LN) at -196°C; groups 8 and 9 were cryopreserved 15 days at -70°C + 15 days liquid nitrogen at -196°C. The F12K cryopreservation medium was used in groups 2, 4, 6 and 8, while Fetal Bovine Serum (FBS) was used in groups 3,5,7 and 9. When finished the cryopreservation time, all the TS were thawed and rinsed with F12K medium, submerged in 10% formaldehyde during 24 h and cut in single tracheal rings. The superior, inferior and middle rings (n=54/group) were evaluated macroscopic and microscopically to assess tracheal tissue changes, and immunohistochemically for Caspase-3 expression after finishing the cryopreservation time. The same evaluation was carried out in group 1 tracheas, immediately after harvesting. Cryopreservation alters cartilage staining, independently of cryopreservation medium, temperature and freezing storage time. This staining change is more evident in the inferior ring of the TS. The percentage of nucleated chondrocytes were decreased in the central portion of the cartilage's ring. The FBS medium used in LN storage, evoked important changes in cartilage matrix as well as a pronounced decrease of Caspase-3 expression in tracheal tissue. These results suggest that cryopreservation is not homogenous, neither on the TS nor the cartilage ring. The FBS + NL alter cartilage consistency. Finally, Caspase-3 expression in tracheal tissue does not show the damage caused by cryopreservation.

# Índice

<b>1.Introducción</b>	1
<b>1.1. Generalidades</b> .....	1
<b>1.2. Antecedentes Bibliográficos</b>	3
1.2.1. <i>Modelo Animal</i> .....	4
1.2.2. <i>Solución de Criopreservación</i> .....	4
1.2.3. <i>Temperatura de Congelación</i> .....	5
1.2.4. <i>Tiempo de Criopreservación</i> .....	6
<b>1.3. Tráquea</b>	10
1.3.1. <i>Anatomía</i> .....	10
1.3.2. <i>Irrigación</i> .....	11
1.3.3. <i>Inervación</i> .....	11
1.3.4. <i>Fisiología</i> .....	12
1.3.5. <i>Histología</i> .....	13
1.3.6. <i>Cartilago traqueal</i> .....	14
1.3.7. <i>Patología traqueal</i> .....	17
1.3.8. <i>Muerte Celular</i> .....	22
<b>2. Planteamiento del Problema</b> .....	25
<b>3. Objetivos</b>	27
3.1. <i>Objetivos Generales</i> .....	22
3.2 <i>Objetivos Particulares</i> .....	27
<b>4. Hipótesis</b> .....	27
<b>5. Material y Métodos</b> .....	28
5.1. <i>Diseño Experimental</i> .....	28
5.2. <i>Técnica Quirúrgica</i> .....	28
5.3. <i>Obtención de los Segmentos Traqueales</i> .....	29
5.4. <i>Soluciones de Criopreservación</i> .....	32
5.5. <i>Esquema de Tratamiento de los Segmentos Traqueales</i> .....	32

5.6. Grupos de Estudio.....	33
5.7. Evaluaciones.....	35
5.7.1. Evaluación Macroscópica.....	35
5.7.2. Evaluación Microscópica.....	36
5.7.3. Evaluación de la Expresión de Caspasa-3.....	41
5.7.4. Análisis Estadístico .....	44
<b>6.- Resultados</b> .....	<b>44</b>
6.1. Evaluación macroscópica.....	44
6.2. Evaluación microscópica.....	46
6.2.1. Cartílago Traqueal.....	46
6.2.1.1. Estructura.....	46
6.2.1.2. Captación de Colorante.....	48
6.2.1.3. Degeneración Celular.....	59
6.2.2. Epitelio de la Mucosa Traqueal.....	67
6.2.3. Glándulas Traqueales.....	67
6.2.4. Fibras de Colágena y de Músculo Liso.....	69
6.3. Expresión de Caspasa-3.....	71
6.3.1. Cartílago Traqueal.....	71
6.3.2. Epitelio de la Mucosa Traqueal.....	74
6.3.3. Glándulas traqueales.....	76
<b>7. Discusión</b> .....	<b>79</b>
<b>8. Conclusiones</b> .....	<b>83</b>
<b>9. Referencias</b> .....	<b>85</b>

## **1. INTRODUCCION**

### **1.1. Generalidades**

La tráquea es una vía aérea de conducción, su función básica es permitir el paso del aire hacia y desde los pulmones, desde el punto de vista histológico, está integrada por anillos de cartílago interconectados entre sí, que constituyen la estructura de soporte y mantienen la permeabilidad de la luz. Fundamentalmente, existen diferentes alteraciones traqueales relacionadas con la función del cartílago, que con base en el número de pacientes que ingresan anualmente al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, incluyen principalmente y en orden de frecuencia, estenosis (disminución de la luz), tumores y malacias (reblandecimiento del cartílago). Estas alteraciones, son capaces de provocar en el paciente, un colapso dinámico con obstrucción de la vía aérea e insuficiencia respiratoria (1).

El tratamiento de elección para los pacientes que presentan este tipo de patología, consiste en reseca de manera definitiva el segmento traqueal dañado, sin embargo, es importante mencionar que este procedimiento, es útil exclusivamente para la reparación de defectos traqueales con una longitud máxima de 7cm, lo que excluye a los pacientes portadores de lesiones con mayor extensión, en los que es necesario entonces, tratar de paliar la insuficiencia respiratoria ocasionada por obstrucción de la vía aérea mediante la aplicación de procedimientos recurrentes y no definitivos como traqueostomías, aplicación de rayo láser, dilataciones traqueales o colocación de diferentes tipos de "stents" (1,2).

Actualmente, no existen estrategias quirúrgicas definitivas para la reparación de lesiones traqueales mayores de 7cm, a pesar de numerosos intentos realizados con prótesis sintéticas, tejidos autólogos y trasplante traqueal, sin embargo, con ninguna de estas alternativas ha sido posible realizar una reconstrucción funcional, ya que con todas ellas se generan complicaciones como devascularización, estenosis, necrosis, dehiscencia, infección, reacciones inmunológicas y la formación de tejido de granulación, lo que demanda la búsqueda de una estrategia quirúrgica definitiva

para los pacientes portadores de extensas lesiones en los que no existe la posibilidad de realizar una resección traqueal y debe de resolverse la insuficiencia respiratoria que les provoca, fatales complicaciones funcionales e infecciosas (1,2).

La reconstrucción de lesiones traqueales de gran longitud es un problema clínico importante, que exige la búsqueda de estrategias quirúrgicas contundentes.

Considerando que con la práctica de la criopreservación, ha sido posible mantener diferentes células y tejidos durante periodos prolongados de tiempo sin dañar la estructura, la función y la actividad bioquímica de los mismos, se han desarrollado diseños experimentales de reconstrucción, en los que tradicionalmente, una vez que se crea un defecto mediante la resección de un segmento traqueal de varios anillos de longitud, la lesión se repara por sustitución de un segmento traqueal criopreservado de igual longitud, sin embargo; aunque en estos diseños está bien establecido que al parecer, la criopreservación ejerce un efecto inmunomodulatorio sobre el tejido traqueal al favorecer el desprendimiento del epitelio, reduciendo la antigenicidad del injerto utilizado en la reconstrucción, los resultados reportados acerca del efecto que ejerce la criopreservación sobre el cartílago, son contradictorios y ésto, ha limitado la aplicación clínica del procedimiento (1,2).

Es posible, que los segmentos de tráquea criopreservados representen una opción viable para la reconstrucción de las lesiones traqueales de gran longitud y es necesario, continuar con el desarrollo de protocolos de investigación capaces de reflejar el efecto que ejercen diferentes condiciones de congelación sobre el tejido traqueal, hasta establecer la temperatura, el tiempo y la solución de criopreservación que en conjunto, permitan mantener sin alteraciones la integridad estructural del cartílago al mismo tiempo que favorezcan la destrucción del epitelio.

## 1.2. Antecedentes Bibliográficos

La criopreservación es una técnica que ha demostrado tener utilidad en el mantenimiento estructural y funcional de diferentes células y tejidos, es probablemente el método más efectivo para la protección de los parámetros morfológicos y bioquímicos, ésta, consiste básicamente en sumergir el biomaterial que se desea preservar dentro de una solución adicionada con un agente crioprotector capaz de evitar o de disminuir el daño osmótico y mantenerlo almacenado bajo temperaturas extremas de congelación, tal como con el uso de nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C} = -321^{\circ}\text{F}$ ) (2).

Los diseños experimentales de criopreservación para segmentos traqueales cubren esencialmente el mismo procedimiento, considerando que además de la solución, de la temperatura y del tiempo de congelación, intervienen dos factores adicionales que incluyen el modelo animal utilizado y la longitud del segmento traqueal sometido a criopreservación, el cual, es utilizado en la reconstrucción (2).

Estas variables (modelo animal, longitud del segmento traqueal, solución, tiempo y temperatura) integran en conjunto, las condiciones experimentales en que se realiza la criopreservación y se establecen con base en las hipótesis propuestas de manera particular por los diferentes grupos de trabajo a nivel mundial, lo que determina y diferencia los tratamientos de criopreservación a los que han sido sometidos los segmentos traqueales. La continua modificación de los tratamientos (solución, tiempo y temperatura) de criopreservación para segmentos traqueales de longitud variable y obtenidos de diferentes modelos animales ha generado resultados contradictorios, por ejemplo; los resultados reportados del efecto que ejerce la criopreservación sobre el cartílago de un segmento traqueal obtenido de un modelo experimental de rata, con una longitud de tres anillos y congelado durante 15 días a ( $-85^{\circ}\text{C}$ ) en solución de eurocollins adicionada con 20% de suero bovino fetal (SBF) +10% de dimetilsulfóxido (DMSO) son diferentes a los reportados al criopreservar un segmento traqueal de diez anillos de longitud obtenido de un modelo experimental

porcino y criopreservado durante 6 horas a (-140°C) en forma previa a su almacenamiento en nitrógeno líquido (-196°C) durante 12 meses, utilizando como solución de criopreservación medio DMEM adicionado con 15% de SBF + 10% de glicerol + 10% de DMSO. A continuación se puntualizan los parámetros que modifican intrínsecamente y diferencian los diseños experimentales de criopreservación traqueal.

### **1.2.1. Modelo animal y longitud del segmento traqueal**

Los diseños experimentales de reconstrucción con segmentos traqueales criopreservados se han desarrollado utilizando diferentes especies animales que incluyen, ratas, conejos, perros, cerdos, primates no humanos que básicamente, pueden dividirse en "donadores" y "receptores" del segmento traqueal sometido a criopreservación. Mediante la aplicación de las técnicas quirúrgicas habituales que incluyen, disección y sección quirúrgica del órgano, en los animales "donadores" se procura la tráquea, que es procesada para la obtención de varios segmentos que son sometidos a criopreservación; mientras que en los animales "receptores; se reseca un segmento traqueal para crear un defecto quirúrgico, el cual es reparado al sustituir el segmento traqueal resecado con un segmento traqueal criopreservado de igual longitud.

De acuerdo con la literatura, la longitud del segmento traqueal sometido a criopreservación y utilizado en la reparación, ha variado entre 3 y 10 anillos, lo que aunado a las dimensiones anatómicas de la tráquea implícitamente determinadas por el modelo animal utilizado y que difieren drásticamente entre algunas especies, incrementa la variabilidad entre los diseños (1,2).

### **1.2.2. Solución de criopreservación**

En los diseños de criopreservación para segmentos traqueales, tradicionalmente se han empleado como soporte para la congelación, 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, ampliamente utilizada para la preservación de diferentes órganos con fines de trasplante. Todas estas soluciones de criopreservación se han complementado con la adición de suero bovino fetal y agentes crioprotectores en concentración variable (2).

La incorporación de agentes crioprotectores a la solución de preservación, en forma previa al proceso de congelación disminuye el daño tisular ocasionado por efecto de la criopreservación. Entre los agentes crioprotectores más investigados en la congelación de segmentos traqueales con objeto de mantener las características histológicas y las propiedades mecánicas de la tráquea, se encuentran el dimetilsulfóxido (DMSO) y el glicerol, solos o en combinación con (Hidroxietil-piperazona-etano-ácido sulfónico) HEPES y albúmina. También se ha reportado el uso de trealosa, un disacárido que actúa reemplazando las moléculas de agua que interfieren con los fosfolípidos de la membrana celular (2).

### **1.2.3. Temperatura de congelación**

El daño tisular por efecto de la congelación, se clasifica como "directo" cuando depende del rango de temperatura. En general, los diseños experimentales de criopreservación para segmentos traqueales incluyen un proceso de congelación programada dentro de untracongeladores, en los que la temperatura se disminuye de manera gradual entre (-1°C/minuto) y (-5°C/minuto) hasta alcanzar un rango que habitualmente fluctúa entre (-80°C) y (-100°C). Durante este proceso, ocurren alteraciones celulares que en su mayoría, se presentan cuando el tejido alcanza la denominada "temperatura de riesgo" que oscila entre (0°C) y (-60°C), sin embargo, al parecer, una disminución gradual a razón de (-1°C/minuto) evita la cristalización que ocurre durante el proceso de congelación (2).

Una vez que se alcanza un rango de temperatura entre (-80°C) y (-100°C), los autores difieren en cuanto al almacenar o no, de manera inmediata posterior, los



segmentos traqueales en nitrógeno líquido (-196°C, fase de vapor). Con base en la temperatura de congelación que ha sido utilizada, así como en el uso de nitrógeno líquido, es posible clasificar, los modelos experimentales de reconstrucción básicamente en dos tipos: a) modelos experimentales de reconstrucción que han sido realizados con segmentos traqueales congelados bajo un rango de temperatura que fluctúa entre (-60°C) y (-140°C) seguido del almacenamiento inmediato posterior de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido (3-18) y b) modelos experimentales de reconstrucción que han sido realizados con segmentos traqueales congelados bajo un rango de temperatura más homogéneo que fluctúa entre (-80°C) a (-85°C) sin el almacenamiento inmediato posterior de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido (19-22).

#### **1.2.4. Tiempo de criopreservación**

El daño tisular por efecto de la congelación, se clasifica como "indirecto" cuando se presenta como consecuencia de un periodo prolongado de criopreservación. Independientemente de que los modelos experimentales de reconstrucción contemplen o no el almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido, las reparaciones quirúrgicas reportadas en la literatura advierten que éstas, se han realizado utilizando segmentos traqueales que fueron criopreservados durante periodos de tiempo disímiles que van desde 7 hasta 730 días. Al respecto, algunos autores refieren que los periodos prolongados de criopreservación favorecen el deterioro del epitelio y del cartilago (14,15,19,22,), mientras que otros indican, que la viabilidad del cartilago 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 (16,18).

Una vez 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 (2).

En resumen, se han criopreservado segmentos traqueales de longitud variable obtenidos de diferentes modelos animales, empleando como soporte para congelar los segmentos de tráquea principalmente, medios de cultivo celular complementados con concentraciones variables de suero bovino fetal y diversos agentes crioprotectores, de los que se puede concluir que: a) los procesos de congelación y descongelación inherentes al proceso de criopreservación disminuyen la viabilidad del epitelio lo que ejerce un efecto inmunomodulatorio sobre el tejido traqueal, disminuyendo la antigenicidad del injerto utilizado en la reconstrucción, sin embargo, también disminuye la viabilidad del cartilago, b) en forma posterior a la reconstrucción, el epitelio se regenera. La morfología del segmento criopreservado obtenido del donador se adapta a la tráquea del receptor, aún en ausencia de una terapia inmunosupresora. El epitelio del receptor, migra gradualmente sobre el segmento traqueal criopreservado a partir del sitio de las anastomosis, regenerando la capa epitelial y cubriendo totalmente el aloinjerto, pero no ocurre lo mismo con el cartilago, el cual puede permanecer severamente dañado como consecuencia de la congelación (2), c) los resultados reportados acerca del efecto que ejerce la criopreservación sobre el cartilago son heterogéneos y atribuibles, muy probablemente a las diferencias que existen entre las temperaturas y los tiempos de criopreservación que se han utilizado, está bien establecido que las alteraciones en el mantenimiento estructural del cartilago interfieren con la función y con la durabilidad del injerto utilizado en la reconstrucción, lo cual, es importante mencionarlo dado que la pérdida del apoyo cartilaginoso por traqueomalacia provoca estenosis, colapso dinámico y obstrucción de las vías aéreas (1,2) y d) destacan la importancia de la realización de proyectos experimentales relacionados con el mantenimiento del cartilago hasta encontrar las condiciones de criopreservación adecuadas que permitan asegurar la calidad del tejido traqueal para su uso en una reconstrucción.

Las alteraciones en el cartilago ocasionadas por efecto de la criopreservación, están relacionadas con las complicaciones postoperatorias. En forma posterior a la

criopreservación y previa a la reconstrucción, los segmentos traqueales criopreservados muestran aparentemente la estructura normal característica, con mantenimiento de la vía aérea permeable, sin traqueomalacia, viabilidad celular y con la matriz cartilaginosa intacta, está reportado que después de la reconstrucción puede presentarse contracción del tejido cartilaginoso (3), dislocación de los anillos traqueales (1,23), calcificación del cartílago traqueal (4), pérdida de las propiedades elásticas y estructurales de las paredes del cartílago (5), destrucción de los anillos traqueales o absorción del cartílago (1,2,5,6,19,20,24) y como consecuencia, obstrucción de la vía aérea con falla respiratoria aguda acompañada de estenosis y/o traqueomalacia (1,2,5,6,19,24). La presencia de estenosis depende del daño en el cartílago y se acompaña de la pérdida de tejido con presencia de fibrosis (25), mientras que la regeneración del cartílago mantiene la integridad del lumen traqueal (26).

En el cuadro 1 se presentan a manera de resúmen, los tratamientos y condiciones de criopreservación reportados hasta el momento.

(Referencia)	Unidad	Solución de Criopreservación	Esquema de Congelación	Almacenamiento	Esquema de Descongelación
Primates no Humanos (3)	5A	RPMI-1640-SBF(20%)-DMSO(10%)	→ (-4°C) [3°C/min] → (-50°C) [1°C/min] → (-80°C) [5°C/min]	NL (-180°C) 9-12m	(37°C)-RPMI-1640-SBF(5%)
Porcino (7)	(2.6 ± 0.2) cm	RPMI-1640-glucamina-SBF(11.11%) + DMSO(12.34%)	→ (-4°C) 20min → (-90°C) 200min	NL (-196°C) > 21d	No menciona
Porcino (5)	(10 - 50) mm	No específica Solución-Albumina(20%)-DMSO(10%)	→ (-40°C) [2°C/min] → (-140°C) [5°C/min]	NL (-180°C) 2s	(40°C) → SF-DMSO 8, 6, 4, 2 y 0%
Canino (8)	5A	RPMI-1640-SBF(10%)-DMSO(10%)-HEPES(5%)	(-100°C)	NL (-196°C) 160d	(40°C) → RPMI-1640-SBF(10%)-HEPES(5%) DMSO 7.5, 5 y 2.5%
Canino (9)	5A	TC-199+ SBF(10%) -DMSO(10%) -HEPES(5%)	(-80°C)	NL (-196°C) 10-1m	(40°C)
Canino (21)	6-10 A	DMEM-SBF(20%)-DMSO(10%)+Tetrasol(0.1mg/L)	(-85°C)	(-85°C) 257 - 313 d	(37°C)-SF
Canino (10,11)	2.5cm	DMEM-SBF(20%)-DMSO(10%)	→ (-90°C) [1°C/min]	NL (-196°C) 1s	Etanol(37°C)-DMEM
Canino (12)	7A	DMEM-SBF(20%)-DMSO(10%)-Sacarosa(0.1mg/L)	(-80°C) 24h	NL (-196°C) 7d-6m	(37°C)
Canino (13)	7A	TC199+(10%)DMSO+(5%)HEPES	→ (-80°C) [1°C/min]	NL (-196°C) 1m	(40°C)
Canino (6)	S-6A	Eurocollins	→ (-60°C) [0.01-20 X/min] 15min	NL (-196°C) 3-8 s	(42°C) → Eurocollins DMSO: 5 y 0%
Canino (19)	7A	No utiliza Solución de Criopreservación	(-80°C)	(-80°C) 1-3m	(35°C)
Conejo (4)	7A	RPMI-1640-SBF(20%)-DMSO(10%)	→ (-80°C) [1°C/min]	NL (-196°C) 1s	(37°C)
Rata (14,15)	5A	RPMI-1640 con L-glutamina+(20%)SBF+(10%)DMSO	→ (-4°C) 60min → (-80°C) [1°C/min]	NL (-196°C) 1s-12m	(37°C)
Rata (16,18)	3A	TC-199+(10%)DMSO+(5%)HEPES	→ (-80°C) [1°C/min]	NL (-196°C) 1-24m	(40°C)
Rata (22)	3A	RPMI-1640 con L-glutamina+(20%)SBF+(10%)DMSO	→ (-80°C) [1°C/min] 1s-12m	(-80°C) 1s-12m	(37°C)
Rata (20)	6A	RPMI-1640+(20%)SBF+(10%)DMSO	→ (-12°C) 60 min	(-85°C) No reporta tiempo	Agua Fria, No reporta temperatura

Cuadro # 1. Modelos experimentales de criopreservación traqueal. Únicamente 3 autores reportan tratamiento pre-criopreservación del segmento traqueal: RPMI-1640+SBF (3), DMEM+DMSO+SBF+Sacarosa (12) y con la misma solución de criopreservación (11). Abreviaturas: Anillos (A), cm (centímetro), Medio de cultivo tisular (TC), Dimetil Sulfoxido (DMSO), Suero Bovino Fetal (SBF), Hidroxi-Etil-Starch (HES), Hidroxi-Etil-Piperazona-Etano-Ácido Sulónico (HEPES), Solución Eurocollins (EC), Medio Dulbecco Modificado de Eagle (DMEM), Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI). →: desde-hasta, d=día, s=semana, m=mes. \*Lavados seriados disminuyendo de manera gradual la concentración de DMSO.

## 1.3.Tráquea

### 1.3.1. Anatomía

La tráquea, es un órgano impar de forma tubular, semirígido y flexible, que se extiende por la parte ventral del cuello, desde el borde inferior de la laringe justo por 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 (Figura 1) (1,27).

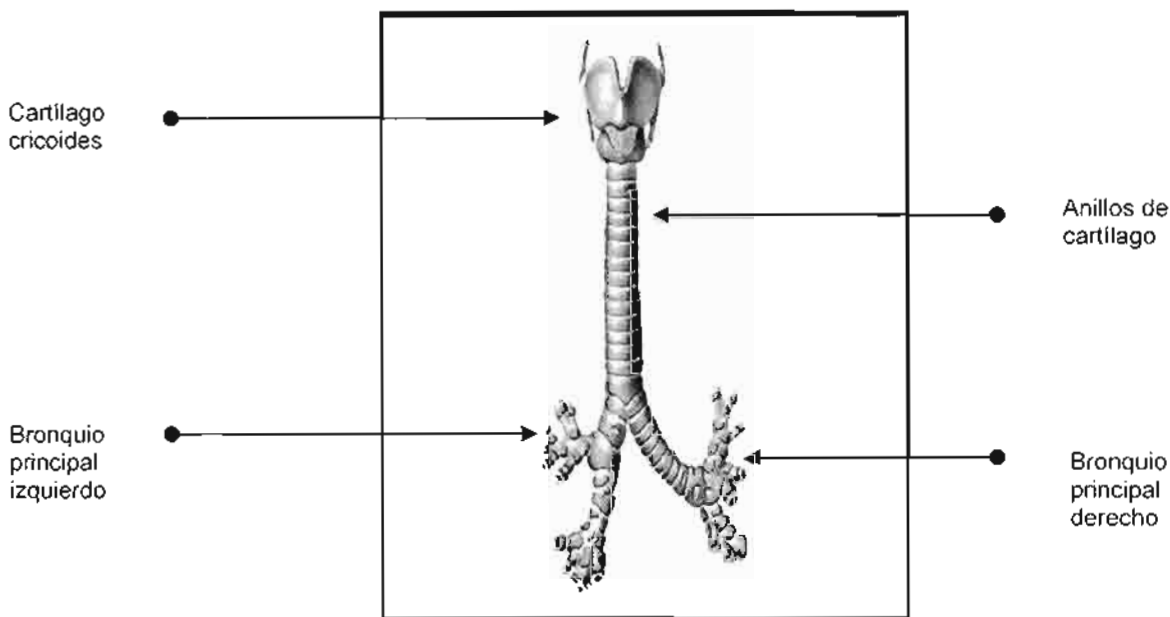


Figura 1: Tráquea y bronquios principales

La tráquea está formada por anillos de cartílago en forma de "C", incluidos dentro de tejido muscular liso a intervalos regulares e incompletos por la parte posterior en donde se unen a través de una membrana elástica a la que se denomina porción membranosa de la tráquea (Figura 2). Cada anillo de cartílago se conecta al anillo adyacente por tejido conectivo fibroelástico. El cartílago cricoides de la laringe que surge con el primer anillo traqueal, es el único anillo cartilaginoso completo (1,27,28).

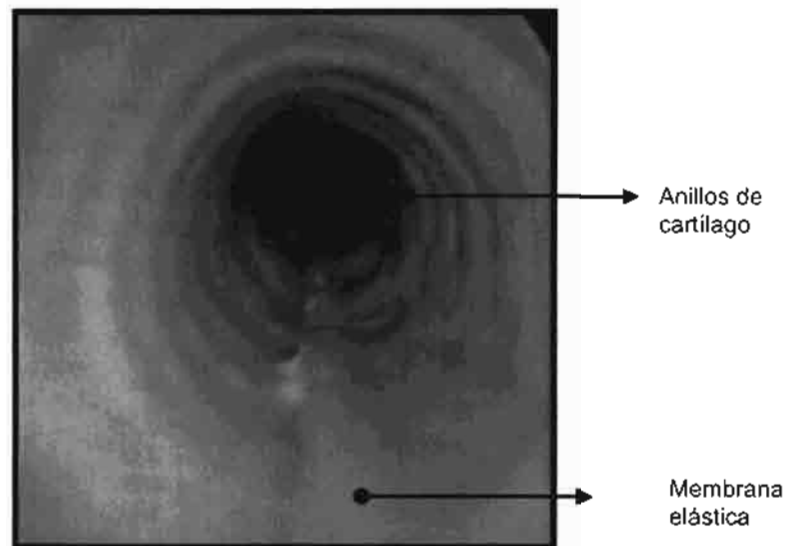


Figura 2: Vista endoscópica de la tráquea  
(Imagen, Departamento Cirugía Experimental, INER)

### **1.3.2. Irrigación**

La tráquea recibe irrigación de las arterias tiroidea inferior, subclavia, intercostal superior, mamaria y de la arteria bronquial media. Estas arterias originan anastomosis paralelas a la tráquea de las que surgen vasos que ingresan en el tejido cartilaginoso. Estos vasos, originan una red que nutre a la mucosa traqueal. Las arterias esofágicas irrigan la parte membranosa de la tráquea (1,28).

### **1.3.3. Inervación**

En la inervación de la tráquea intervienen fibras simpáticas y 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 posganglionares que van a la parte baja de la tráquea, en su mayor parte a través del plexo pulmonar (1,28).

Las fibras parasimpáticas son ramas craneales de los nervios vago y laringeo recurrente, las cuales controlan la contracción del músculo traqueal, la secreción glandular y la vasodilatación. Todas las fibras parasimpáticas preganglionares 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 (Figuras 3 y 4) (1,28).

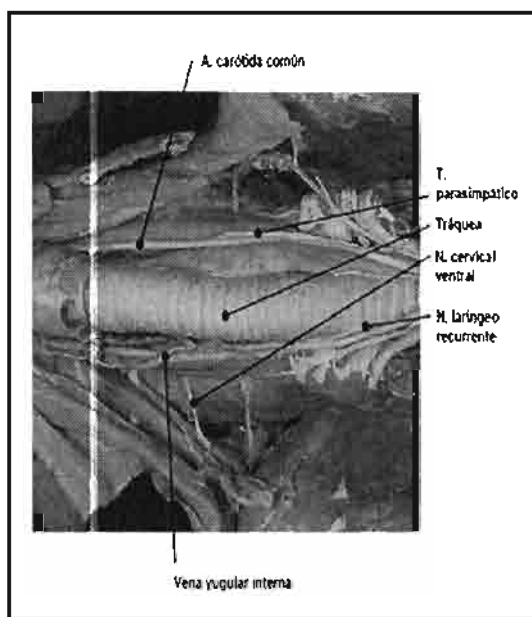


Figura 3: Irrigación e inervación traqueal

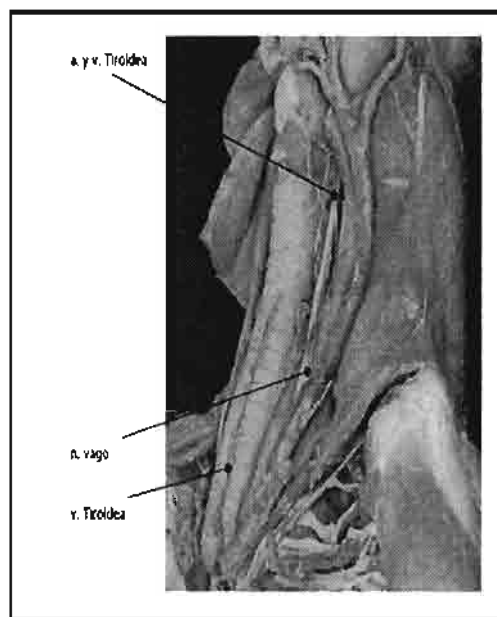


Figura 4. Arteria tiroidea, vena tiroidea y nervio vago

### 1.3.4. Fisiología

La tráquea es una vía aérea de conducción, su función básica es permitir el paso del aire hacia y desde los pulmones. Las fibras elásticas longitudinales permiten el descenso traqueal en la inspiración y junto con los pedículos pulmonares su elasticidad ayuda a la retracción pulmonar durante la espiración (1,29).

La tráquea participa en la conducción, en el acondicionamiento (calentamiento, humidificación) y en la depuración del aire inspirado ya sea por la nariz o boca hacia las zonas de intercambio gaseoso, posee función mucociliar, interviene en la protección de las vías respiratorias bajas y en el proceso de fonación (1,29).

### **1.3.5. Histología**

La tráquea está revestida internamente por epitelio respiratorio que deriva del endodermo. La pared de la tráquea se compone de cuatro capas: (de adentro hacia fuera): 1) La mucosa, (epitelio pseudoestratificado ciliado y una lámina propia fibroelástica), 2) La submucosa (tejido conectivo), 3) Los cartílagos hialinos y 4) La adventicia (tejido conjuntivo laxo) (Figura 5) (1,30).

La mucosa está formada por epitelio pseudoestratificado ciliado que tiene como función actuar como una barrera protectora, ya que produce moco, que filtra y remueve a través de los cilios las partículas atrapadas en él hacia la parte proximal de la tráquea, además de una lámina propia de tejido conjuntivo laxo compuesta principalmente de fibras elásticas. La submucosa, separada de la mucosa por una membrana elástica, está integrada por una capa de fibras elásticas entremezcladas con abundantes fibras colágenas. La capa submucosa termina en donde las fibras del tejido conectivo se mezclan con el pericondrio de la capa cartilaginosa (1,30).

El cartílago traqueal es de tipo hialino, está revestido por pericondrio que se continúa con un tejido conectivo fibroso que une a los cartílagos entre sí y cuya función es proporcionar estabilidad a la tráquea. La brecha entre los extremos libres de los cartílagos en la parte posterior de la tráquea y adyacente al esófago, está cubierta por tejido fibroelástico y musculatura lisa. Las glándulas son especialmente abundantes 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. La adventicia es la cubierta externa de la tráquea y se encuentra



formada por tejido conectivo laxo y su función es unir a la tráquea con los tejidos adyacentes del cuello y el mediastino y es periférica a los anillos cartilagosos y al músculo traqueal (1,30).

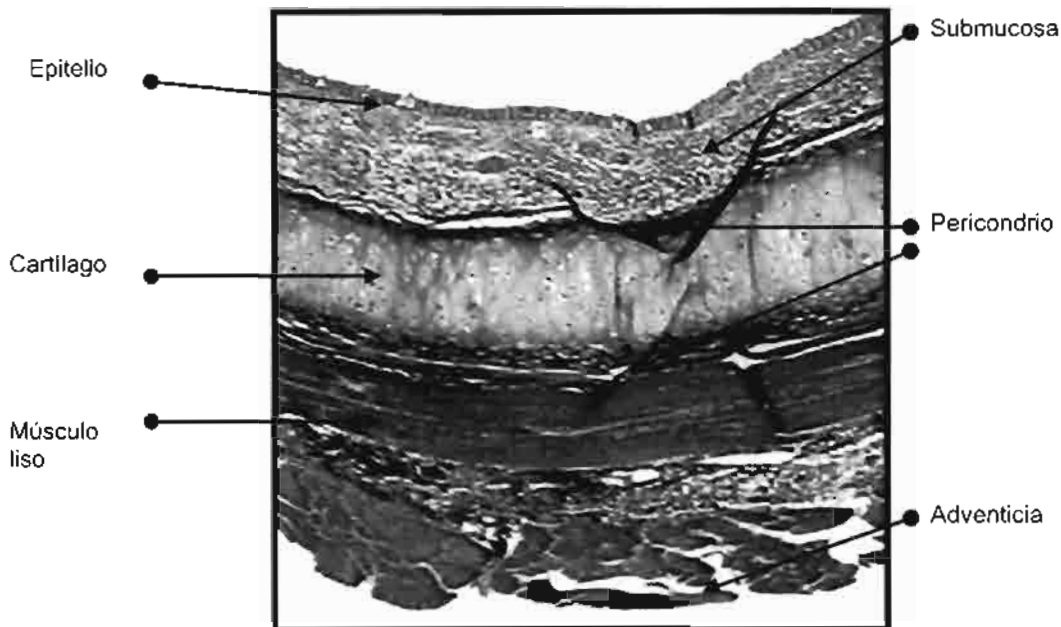


Figura 5: Histología traqueal (Tricrómica de Masson, 10X)  
(Imagen, Departamento Cirugía Experimental, INER)

### 1.3.6. Cartílago traqueal

El tejido cartilaginoso es una modalidad especializada del tejido conjuntivo de consistencia firme que carece de vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. El cartílago traqueal (Figura 6) 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 (1,30).

El cartílago está integrado por células denominadas condrocitos y por el material extracelular que constituye la matriz. La matriz extracelular es un gel formado por macromoléculas de proteoglicanos y glicoproteínas estructurales que rellena el

espacio entre las células y las fibras del tejido conjuntivo (30). Los condrocitos renuevan las macromoléculas de la matriz del cartílago, sintetizan colágeno principalmente de tipo II, proteoglicanos y condronectina (30,31).

Las cavidades de la matriz ocupadas por los condrocitos reciben el nombre de "lagunas". Una laguna puede contener uno o más condrocitos. En la periferia del cartílago hialino, los condrocitos presentan una forma alargada con su eje mayor paralelo a la superficie mientras que en la parte central, son más redondeados y aparecen en grupos isógenos hasta de ocho células que se originan en un único condroblasto (Figura 7) (30).

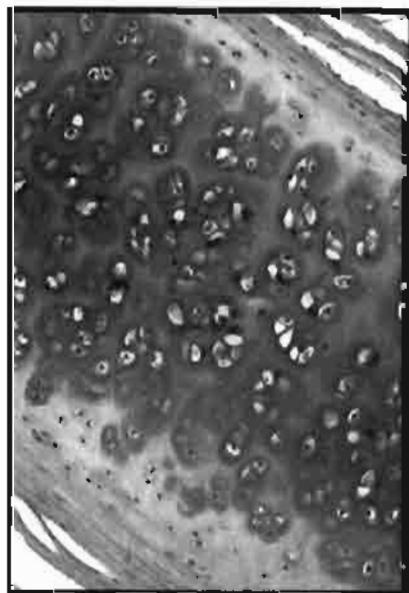


Figura 6: Cartílago traqueal (Hematoxilina-Eosina, 10X)  
(Imagen, Departamento Cirugía Experimental, INER)

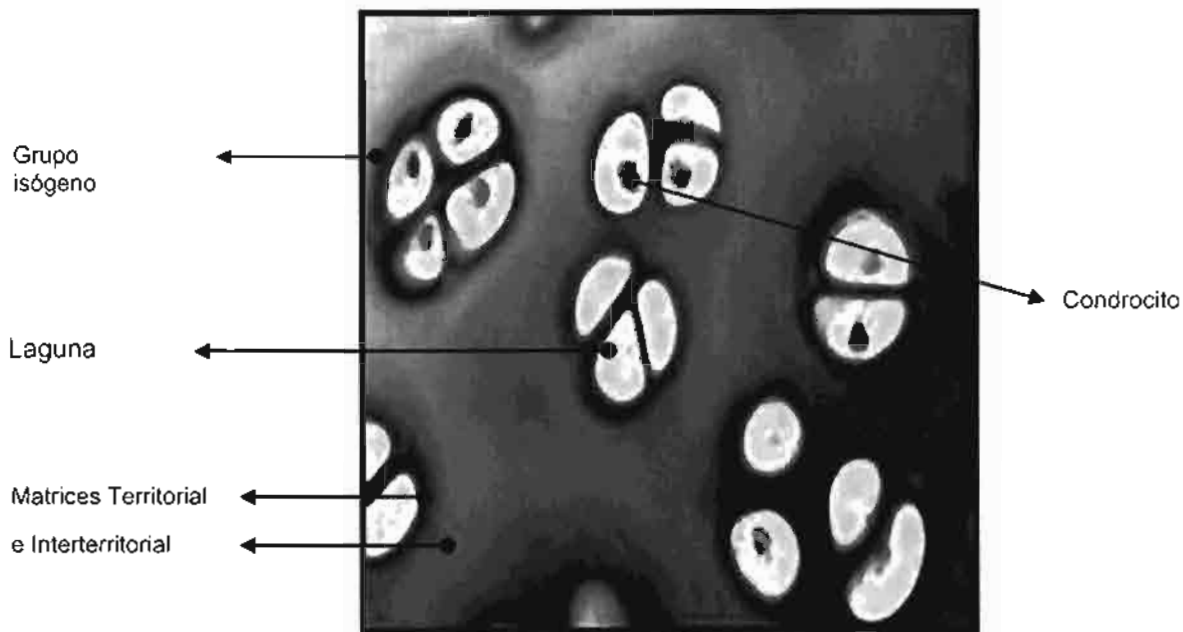


Figura 7: Cartílago traqueal (Hematoxilina-Eosina, 40X)  
(Imagen, Departamento Cirugía Experimental, INER)

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 cartilago, que es semejante a la de un amortiguador (30). En el cartilago, la mayor parte de los proteoglicanos interactúan específicamente con el ácido hialurónico y forman estructuras agregadas que intervienen en las interacciones entre los condrocitos y entre éstos con la matriz extracelular (30-33). La condronectina es la proteína responsable de la adherencia entre las células, las fibras y las macromoléculas de la matriz extracelular con los condrocitos. La fibronectina y la laminina son glicoproteínas estructurales del tejido conjuntivo que promueven la unión entre las células con las fibras de colágena y los glucosaminoglicanos, así como con la matriz extracelular de las membranas basales (lámina basal) y las células respectivamente (30).

Los anillos de cartilago forman una estructura de soporte para las paredes anterior y lateral de la tráquea, le confieren rigidez al mismo tiempo que permiten los movimientos de flexión, extensión y torsión, mantienen la permeabilidad de la luz durante la respiración forzada, durante la espiración y cuando se presentan accesos de tos. La pérdida del apoyo cartilaginoso permite el colapso dinámico y obstrucción de las vías respiratorias (1,34).

### **1.3.7. Patología traqueal**

Desde mediados del siglo veinte, se ha realizado investigación clínica-quirúrgica para resolver diferentes tipos de patología traqueal, desafortunadamente, hasta la fecha, no se cuenta con avances substanciales médico-quirúrgicos que resuelvan, lesiones extensas de este órgano. La traqueostomía se practica desde hace muchos años, mientras que las plastias o reconstrucciones de tráquea, como parte de la cirugía general de tórax, llevan poco tiempo de realizarse (1,35,36). El pensamiento que se tenia de que "el cartilago traqueal difícilmente cicatrizaba y que la máxima extensión, que se podía reseca de la tráquea eran dos o tres anillos", originó que se incrementara la investigación quirúrgica para resolver, traqueopatías con extensiones mayores a dos centímetros. El pionero en la búsqueda de soluciones para esta patología es el Dr. Hermes C. Grillo, quien ideó diferentes procedimientos quirúrgicos, para poder reseca más de "dos o tres anillos" (2.1 anillos por centímetro), logrando buenos resultados en extirpaciones de 4 cm (1,37,38). En México, en 1954, Pacheco y cols., publicaron un trabajo de alotrasplante traqueal en "fresco" en el que describen la destrucción y fibrosis del injerto (39).

El tratamiento de elección para diferentes alteraciones traqueales como estenosis (Figura 8), malacias, neoplasmas (Figura 9) y malformaciones congénitas entre otras, incluye una resección quirúrgica con anastomosis término-terminal (Figuras 10-13), sin embargo, este procedimiento presenta dos inconvenientes importantes: 1) frecuentemente está obstaculizado por la falta de tejido sano y 2) es útil exclusivamente en reparaciones que comprometen menos de la mitad de la longitud

de la tráquea en adultos (1,2,5,13,40) y hasta la tercera parte de la longitud traqueal en niños (2,5,9,13,40,41), con lo que la aplicación del procedimiento se limita a la reconstrucción de segmentos traqueales con una extensión entre 5 y 7 cm (2,8,19,42).



Figura 8: Imagen de una estenosis traqueal

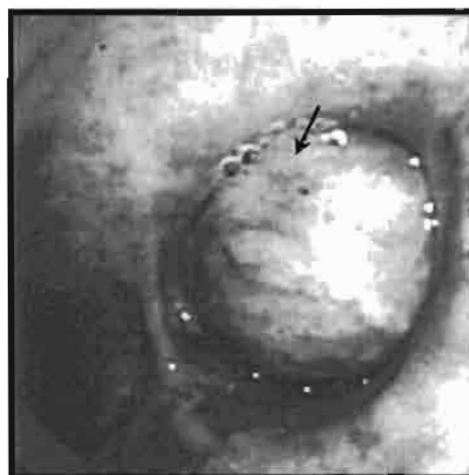


Figura 9: Imagen de un neoplasma en humano

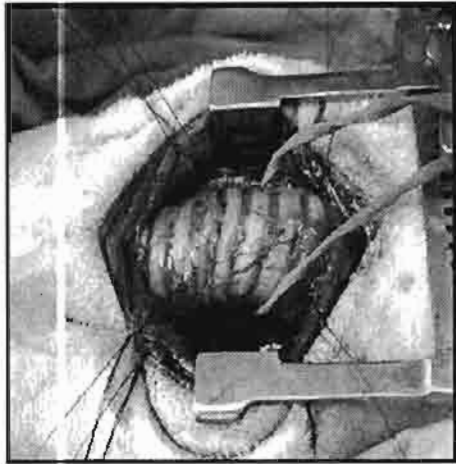


Figura 10: Tráquea disecada y referida

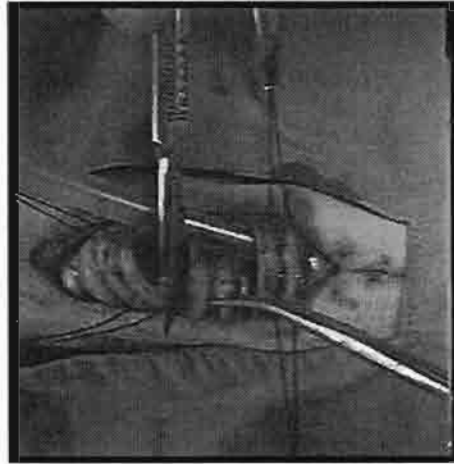


Figura 11: Resección de los anillos traqueales

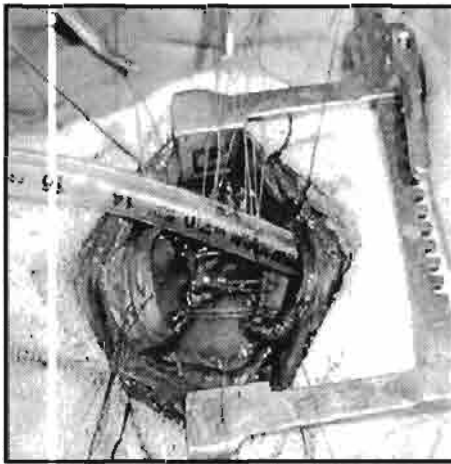


Figura 12: Puntos separados durante la realización de la anastomosis

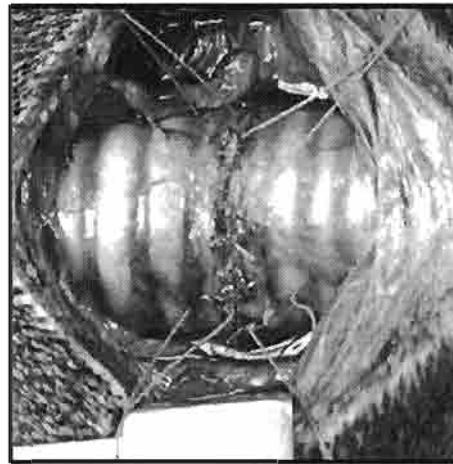


Figura 13: Anastomosis traqueal finalizada

(Imágenes, Departamento Cirugía Experimental, INER)

Así que, por lo extenso de las lesiones traqueales y por no ser posible la anastomosis término-terminal, se idearon "prótesis de diferentes materiales sintéticos", para sustituir a la tráquea y dar una solución más definitiva a la insuficiente ventilación que sufren estos enfermos (1,2,43-45). Actualmente, no existen estrategias quirúrgicas definitivas para la reparación de defectos traqueales mayores de 7 cm, a pesar de que para tratar de reparar la lesión se han utilizado numerosas opciones tanto sintéticas como biológicas (Figura 14) que incluyen el uso

de prótesis de diferentes materiales (dacrón, silicón, poliuretano, politetrafluoroetileno, propileno y metal), tejidos autólogos (fascia, piel, hueso, periostio, cartílago, pericondrio, músculo, esófago, pericardio, duramadre, intestino delgado; así como el uso de “colgajos” para favorecer la vascularización) (1,2,10,17,46-50), trasplante traqueal con aloinjertos no vascularizados (1) aloinjertos frescos desvascularizados, aloinjertos preservados desvascularizados (21), injertos vascularizados y aloinjertos frescos o preservados e indirectamente vascularizados (1). En cuanto a la “ingeniería de tejidos”: siembra de condrocitos que son colocados en un armazón de un polímero sintético biodegradable (1). Sin embargo, con ninguna de estas alternativas quirúrgicas ha sido posible realizar una reconstrucción funcional (2,40,41,51), ya que con todas ellas se generan complicaciones como devascularización, estenosis, necrosis, dehiscencia, infección, reacciones inmunológicas y la formación de tejido de granulación (2,3,6,19).

Esto hace ver que el alotrasplante traqueal se encuentra en la actualidad en fase experimental, no es una realidad clínica y demanda como solución potencial la búsqueda de una bioprótesis biocompatible con el receptor, que sea de tamaño suficiente para realizar la reparación, que asegure estabilidad mecánica, rigidez estructural, una vascularización adecuada y promueva la cobertura del lumen con epitelio ciliado en ausencia de tejido de granulación (2-6,41,52,53) considerando que el trasplante inmediato ha demostrado no ser funcional. Toda esta problemática ha causado en diferentes países, que las investigaciones quirúrgicas de reconstrucción traqueal se enfoquen prioritariamente a la preservación de segmentos traqueales a través de diferentes técnicas (por ejemplo, criopreservación) para ser transplantados en individuos de la misma especie, portadores de extensas lesiones, en los que no existe la posibilidad de realizar anastomosis término-terminal y debe resolverse la insuficiencia respiratoria, que provoca en el paciente fatales complicaciones funcionales e infecciosas (1,51,54,55).

Aunque la criopreservación ejerce un efecto inmunomodulatorio sobre el tejido traqueal reduciendo la antigenicidad del injerto utilizado en la reconstrucción, atribuible a una disminución en la expresión del antígeno clase II como consecuencia del desprendimiento que ocurre en el epitelio y en las glándulas por efecto de la congelación y de la descongelación, el ciclo congelación-descongelación inherente al proceso de criopreservación, genera, al mismo tiempo, pérdida de la viabilidad celular en el cartílago, lo que afecta la función del injerto utilizado en la reconstrucción, generando la búsqueda de marcadores de muerte celular indicativos del mantenimiento estructural del cartílago y capaces de asegurar la calidad del tejido traqueal para su uso en una reconstrucción.

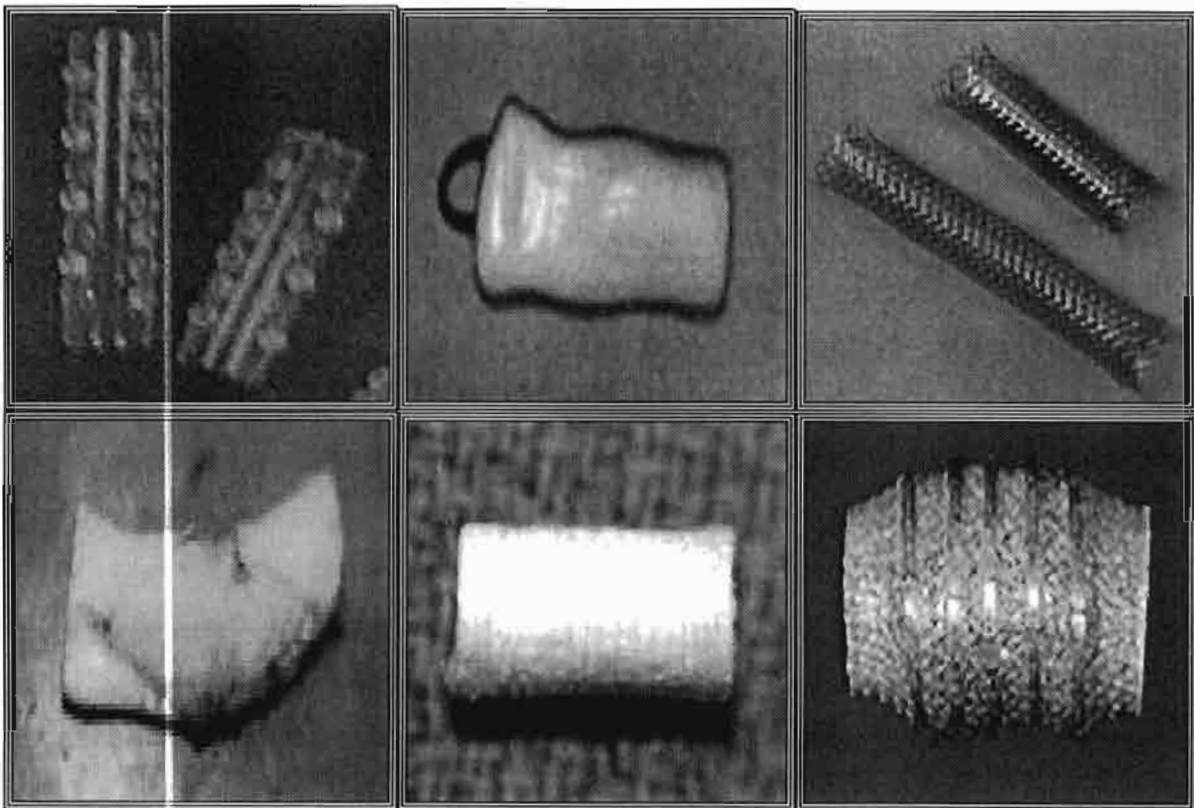


Figura 14: Diferentes tipos de prótesis y bioprótesis traqueales



#### **1.4. Muerte Celular y Caspasa-3**

La apoptosis, es un mecanismo de muerte celular programado que se caracteriza por cambios bioquímicos y morfológicos bien definidos, se ha propuesto como un evento crítico para mantener la homeostasis celular y se restringe a células individuales con la producción de citocinas que inhiben la inflamación, y sin la liberación de material intracelular al medio intersticial (56-59).

La muerte celular por apoptosis comienza con la fase de iniciación, la cual ocurre en respuesta a señales externas, cambios farmacológicos, fisiológicos o patológicos en las condiciones celulares internas por efecto de diferentes estímulos, tales como radiaciones, quimioterapia, hipoxia, temperatura, pérdida de adhesión celular, glucocorticoides y factores de crecimiento. Continúa con la segunda fase, conocida como fase de activación, en la que sucede el reconocimiento y la transducción de la señal de muerte celular, cuyo resultado metabólico conlleva a la tercera ó última fase, que es la conocida como fase de ejecución de la muerte celular. En esta fase se hidrolizan las proteínas de la lámina nuclear, ocurre la fragmentación del ácido desoxiribonucleico (ADN) y del contenido celular con deterioro de la morfología celular (56-59).

Entre los cambios morfológicos que ocurren en la célula durante la fase terminal de la apoptosis se incluyen la condensación y fragmentación de la cromatina nuclear, condensación del citoplasma, engrosamiento del retículo endoplásmico, disminución del tamaño celular, pérdida de la estructura de la superficie celular y la formación de cuerpos apoptóticos, los cuales son fagocitados por células vecinas o por macrófagos (56-61), (Figura 15).

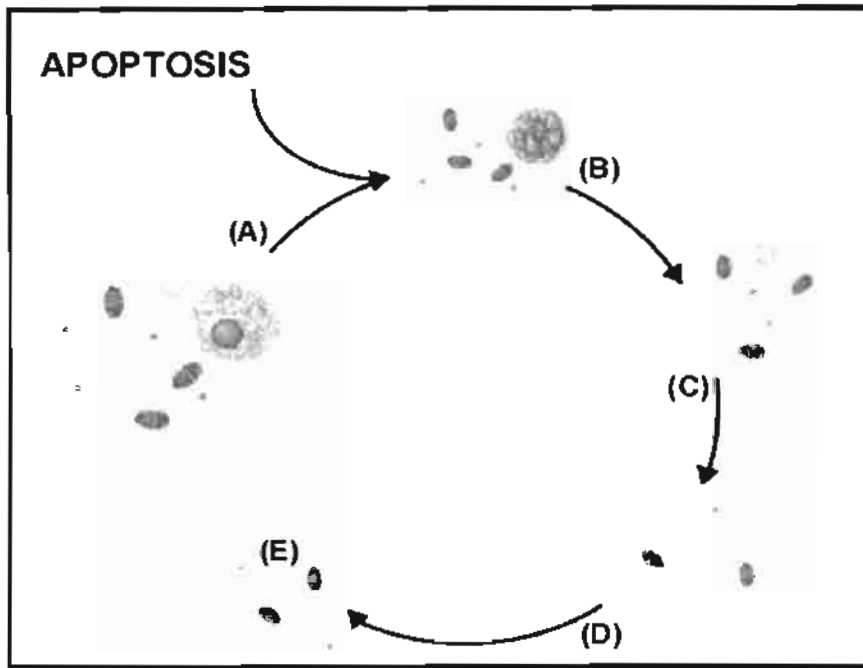


Figura 15: Los cambios morfológicos que ocurren la célula (A) durante la muerte celular por apoptosis incluyen disminución del tamaño celular, condensación de la cromatina nuclear, (B), fragmentación del ácido desoxiribonucleico (C) y la formación de cuerpos apoptóticos (D) que son fagocitados por macrófagos o por células vecinas (E). (The Science Creative Quarterly, Philip Yau. [www.scq.ubc.ca/apoptosis](http://www.scq.ubc.ca/apoptosis))

Las caspasas (cisteín **aspartato**-proteasas) son las enzimas que median las fases de activación y ejecución durante la apoptosis, se identifican de manera individual con un número asignado de acuerdo con el orden de su publicación (60), constituyen la familia denominada enzimas responsables de la conversión del precursor de la interleucina1 $\beta$  (ICE por sus siglas en inglés), integrada por 14 cisteinil-aspartato proteasas que participan en la muerte celular por apoptosis con mecanismos de acción similares pero con modelos de actividad y especificidad diferentes que se activan mediante la hidrólisis en secuencias específicas de cuatro residuos que cortan un enlace peptídico localizado estrictamente después de un residuo de ácido aspártico (62).

Las vías de señalización a través de las que procede la muerte celular por apoptosis incluyen: a) la vía extrínseca que requiere de la activación de la caspasa-8

principalmente y está mediada por receptores de muerte localizados en la membrana plasmática (por ejemplo FAS o APO1), activados por ligandos de muerte específicos (FasL para FAS o APO1) promoviendo la oligomerización del receptor y la proteína adaptadora (FADD), y b) la vía intrínseca, en la que ocurre despolarización de la membrana mitocondrial, acompañada generalmente de la liberación de citocromo C y activa principalmente la caspasa-9. La activación de proteínas pro-apoptóticas (Bid, Bim) de la familia de Bcl-2 promueve la liberación de citocromo-c que activa un complejo proteico (apoptosoma) que activa directamente a la caspasa-9. Además de la salida de citocromo c desde la mitocondria ocurre la liberación de otra proteína (SMAC/DIABLO) que neutraliza a los inhibidores de las caspasas (IAPS). La vía mitocondrial puede conectarse también con la vía de receptores de muerte, ya que una vez activada la caspasa-8 por dichos receptores, esta caspasa activa a la proteína Bid, lo que provoca la apertura del poro mitocondrial y la activación de la caspasa-9 (Figura 16). En los mamíferos, las dos rutas de iniciación de la apoptosis que se disparan por eventos separados convergen en la activación de la caspasa-3 que actúa como ejecutor central de muerte (56-60).

La caspasa-3, conocida también como CPP32 (cisteín-proteasa de 32 KDa), Yama ó Apopainá, 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 (58,60,61-63), derivadas del precursor proteico por corte en Asp<sup>28</sup>-Ser<sup>29</sup> y Asp<sup>175</sup>-Ser<sup>176</sup> (60).

La activación de la 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 substratos que contienen la secuencia común de residuos Asp-Xaa-Xaa-Asp (DXXD) similar a la descrita originalmente para PARP (58,60), está implicada en el daño tisular por efecto de la isquemia (64,65), de la reperfusión (66), de la hipoxia (67), de la intubación orotraqueal debido al volumen corriente (68,69) y con los procesos de congelación y descongelación inherentes a la criopreservación de

diferentes células y tejidos (70-73).

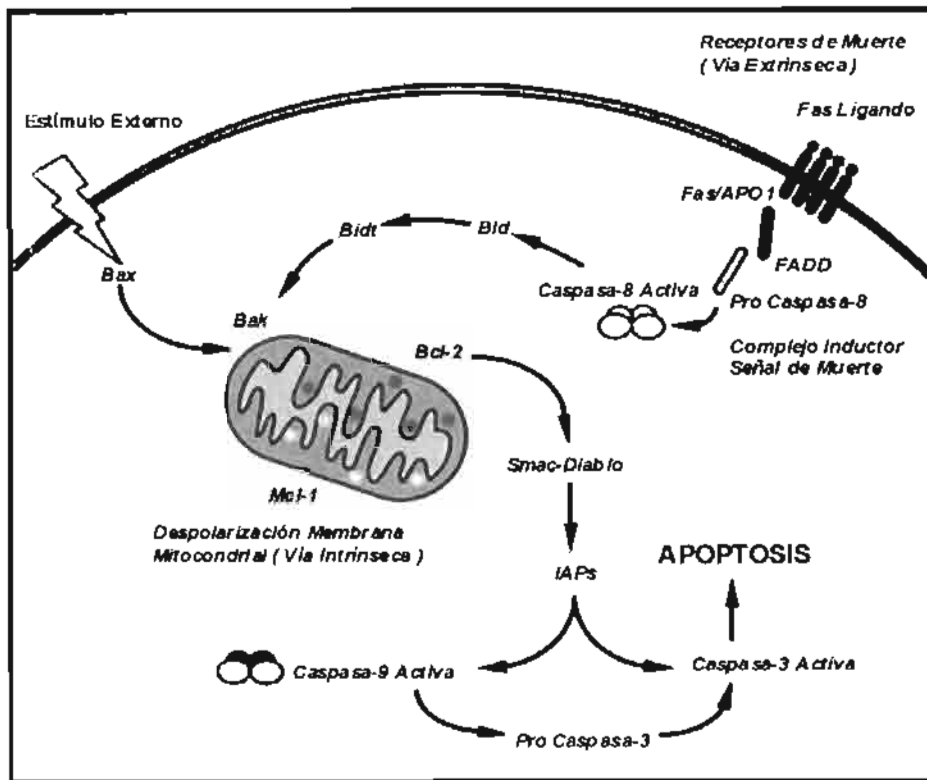


Figura 16: Las dos rutas de iniciación de la apoptosis convergen en la activación de la caspasa-3. (The Science Creative Quarterly, Philip Yau. [www.scq.ubc.ca/apoptosis](http://www.scq.ubc.ca/apoptosis))

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen diferentes alteraciones traqueales como estenosis, tumores y malacias relacionadas con la función del cartílago que culminan en una insuficiencia respiratoria. El tratamiento de ideal para este tipo de patología, consiste en resear 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 y en los que es necesario tratar de paliar la insuficiencia respiratoria ocasionada por obstrucción de la vía aérea mediante la aplicación de procedimientos

recurrentes y no definitivos como traqueostomías, aplicación de rayo láser, dilataciones traqueales o colocación de diferentes tipos de "stents".

A pesar de numerosos intentos realizados con prótesis sintéticas, bioprótesis, tejidos autólogos, ingeniería de tejidos y trasplante, actualmente no existen alternativas quirúrgicas definitivas para la reparación de lesiones traqueales de gran extensión, lo que evidentemente constituye un problema clínico importante todavía no resuelto que demanda, la búsqueda de una opción funcional con la que sea posible realizar una reconstrucción adecuada y definitiva para los pacientes portadores de extensas lesiones en los que no existe la posibilidad de realizar una resección traqueal y debe de resolverse la insuficiencia respiratoria que les provoca, fatales complicaciones funcionales e infecciosas.

La reconstrucción de lesiones traqueales de gran longitud es un problema clínico importante, que exige la búsqueda de estrategias quirúrgicas contundentes. 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, lo que 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, y es necesario, 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 que favorezcan el desprendimiento del tejido epitelial con la finalidad de disminuir la antigenicidad del injerto utilizado en la reparación. Es entonces, que 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 el cual mantiene el soporte de la estructura traqueal y por otro, sea posible promover la total destrucción del tejido epitelial para reducir la antigenicidad del injerto utilizado en la reconstrucción. Considerando que el índice de muerte celular permitirá evaluar y calificar la calidad de los segmentos traqueales tratados bajo diferentes esquemas de criopreservación, a continuación se describen los objetivos de este proyecto de investigación.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. *Objetivo general***

1) Evaluar las alteraciones macroscópicas, microscópicas y en la expresión de caspasa-3 en el tejido traqueal criopreservado bajo diferentes esquemas de tratamiento.

2) Determinar las condiciones de criopreservación más adecuadas para mantener viable el tejido traqueal y que aseguren la calidad del injerto en una reconstrucción.

#### **3.2. *Objetivos particulares***

1) Evaluar el efecto de la solución de criopreservación sobre los cambios macroscópicos, microscópicos y en la expresión de caspasa-3 en el tejido traqueal.

2) Evaluar el efecto de la temperatura de criopreservación sobre los cambios macroscópicos, microscópicos y en la expresión de caspasa-3 en el tejido traqueal.

3) Evaluar el efecto del tiempo de criopreservación sobre los cambios macroscópicos, microscópicos y en la expresión de caspasa-3 en el tejido traqueal.

### **4. HIPOTESIS**

Las alteraciones macroscópicas, microscópicas y en la expresión de caspasa-3 en el tejido traqueal dependerán principalmente del esquema de temperatura/tiempo más que de la solución de criopreservación utilizada.

## **5. MATERIAL Y METODOS**

### **5.1. Diseño experimental**

Se procuraron las tráqueas de 8 perros mestizos con un peso corporal entre 5 y 30 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 traqueal).

Los animales se mantuvieron en condiciones habituales de biotero y se manejaron con base en los lineamientos establecidos en las Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999 (74) y en la Guide for Care and Use of Laboratory Animals, U.S.A. (75).

### **5.2. Técnica Quirúrgica**

Los perros 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 (6mg/kg, Diprivan, Astra Zeneca) y se mantuvo con isofluorano al 2% durante todo el acto quirúrgico.

Los animales se colocaron sobre la mesa de cirugía en posición decúbito dorsal, se intubaron con una sonda orotraqueal y se conectaron a un ventilador (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<sub>2</sub> del 100% (Figura 17).

Se realizó tricotomía, asepsia y antisepsia de la zona toraco-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. Se resecó el tejido subcutáneo hasta llegar a la tráquea que se disecó en toda su circunferencia y se resecó en toda su longitud, utilizando las técnicas quirúrgicas

convencionales (Figura 18). Inmediatamente después y sobre una charola de mayo apoyada sobre una cámara de hielo se realizó una disección fina de la tráquea (Figura 19).

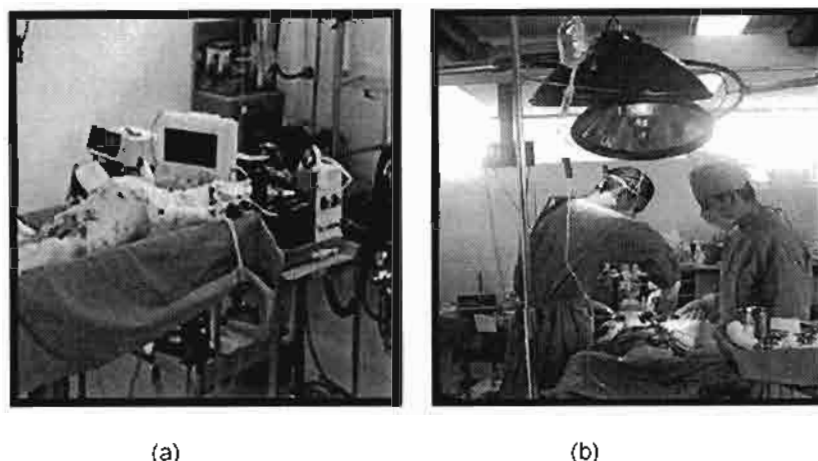


Figura 17: Anestesia e intubación de los animales (a) y procuración de la tráquea (b).

### **5.3. Obtención de los segmentos traqueales**

Concluida la disección fina de la tráquea, con ayuda de un bisturí se resecó el cartílago cricoides que fue eliminado del estudio. El resto de la tráquea se cortó en segmentos de cinco anillos (Figura 20), obteniendo un total de 54 segmentos traqueales (6 segmentos traqueales por grupo de estudio). Con base en la posición anatómica de los anillos extremos de cada uno de los segmentos traqueales obtenidos, los anillos fueron enumerados del uno (proximal al cartílago cricoides) al cinco (distal al cartílago cricoides). El anillo número “1” de cada segmento traqueal de cinco anillos se refirió con seda (2-0) para su identificación (Figura 21).

Los segmentos traqueales se lavaron durante tres minutos en una solución glucosada fría y mantenida en hielo, con recambio de la solución cada minuto. La solución glucosada utilizada para lavar los segmentos traqueales se preparó con glucosa 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



estreptomomicina (Sulfastrep, PISA), 1000000U de penicilina (PISA) y 0.1ml de una solución antibiótica-antimicótica (SIGMA, A5955) por cada litro de solución (Figura 22).

Para integrar el grupo control, de cada una de las tráqueas, se separó el primer segmento de cinco anillos, contando a partir del primer anillo colocado justo por debajo del cartilago cricoides e inmediatamente después de separar el segmento control, el resto de los segmentos fueron divididos al azar en 8 grupos de criopreservación (Figura 23). En cuatro de los grupos de estudio, se utilizó medio F12K para congelar los segmentos y en los otros cuatro, suero bovino fetal, ubicando siempre, el anillo referido en la parte superior del criovial (Figura 24).



Figura 18  
Resección traqueal



Figura 19  
Disección fina de la tráquea



Figura 20  
Segmentos traqueales

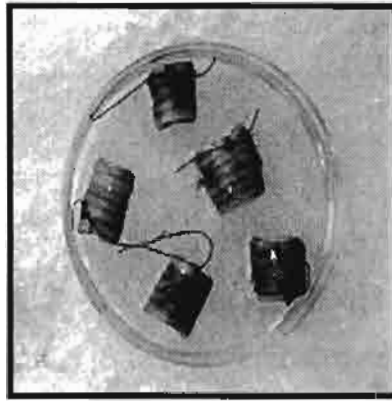


Figura 21: Referencia del anillo 1 (proximal al cartilago cricoides)

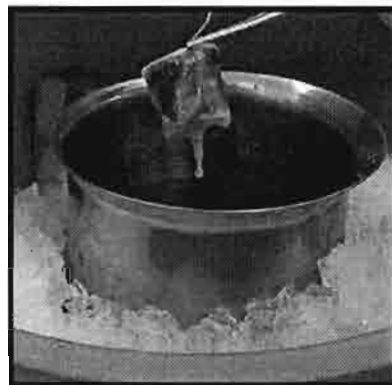
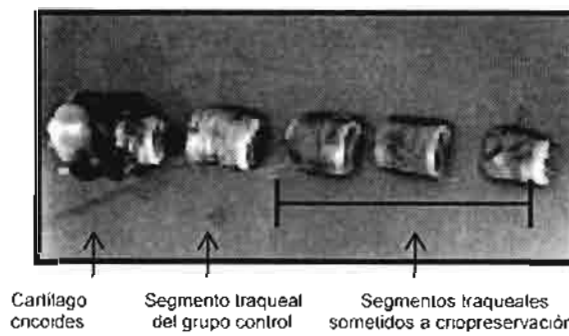


Figura 22: Lavado de los segmentos traqueales con solución glucosada



Cartilago cricoides      Segmento traqueal del grupo control      Segmentos traqueales sometidos a criopreservación

Figura 23: Cartilago cricoides y segmentos traqueales de los grupos control y de criopreservación

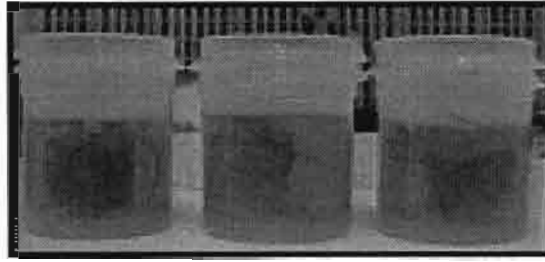


Figura 24: Segmentos traqueales sometidos a criopreservación

#### **5.4. Soluciones de criopreservación**

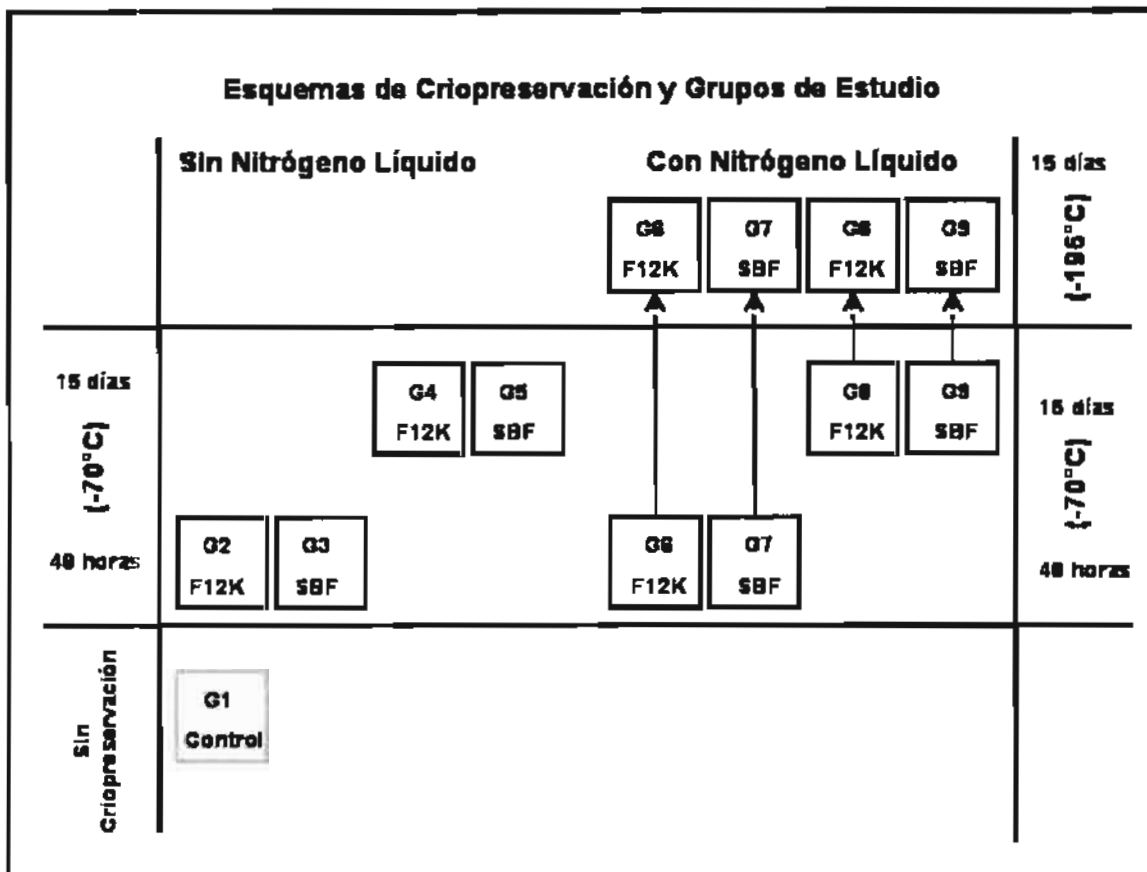
Las soluciones utilizadas para criopreservar los segmentos traqueales fueron: 1) Medio F12K ( GIBCO, 21700-026) adicionado con 10% de dimetilsulfóxido, (SIGMA, D2650), 20% de suero bovino fetal (GIBCO,16000-044), 20% de una solución de ácido hialurónico al 0.1% (FLUKA, 53730) y 0.1ml de una solución antibiótica-antimicótica (SIGMA, A5955) por cada litro de solución y 2) Suero Bovino Fetal al 90% (GIBCO,16000-044), adicionado con 10% de dimetilsulfóxido (SIGMA, D2650) y 0.1ml de una solución antibiótica-antimicótica (SIGMA, A5955) por cada litro de solución.

#### **5.5. Esquemas de tratamiento de los segmentos traqueales**

La criopreservación de los segmentos traqueales incluyó dos esquemas básicos de tratamiento, diferenciados por la aplicación de nitrógeno líquido. 1) Esquema de criopreservación sin el almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido: En forma inmediata posterior a la obtención y lavado de los segmentos traqueales, estos fueron sumergidos en la solución de criopreservación y sometidos a 48 horas ó 15 días de congelación a (-70°C), y 2) Esquema de criopreservación con el almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido: En forma inmediata posterior a la obtención y lavado de los segmentos traqueales, estos fueron sumergidos en la solución de criopreservación y sometidos a 48 horas ó 15 días de congelación a (-70°C). Concluido el tiempo de criopreservación a (-70°C) los segmentos traqueales fueron transferidos al tanque de nitrógeno en donde se

mantuvieron almacenados a (-196°C) durante 15 días.

En ambos esquemas de criopreservación, la solución de criopreservación y el tiempo de congelación a (-70°C) se determinó de acuerdo con el grupo de estudio establecido (Cuadro 2).



Cuadro 2: Esquemas de tratamiento de los segmentos traqueales (tiempos de almacenamiento, temperatura de congelación y soluciones utilizadas) de acuerdo con el grupo de estudio

## 5.6. Grupos de Estudio

### Grupo control (sin criopreservación)

**Grupo 1 (n=6):** Los segmentos traqueales no fueron sometidos a ningún tipo de criopreservación, únicamente fueron enjuagados en la solución glucosada.

***Grupos de criopreservación sin almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido:***

**Grupo 2: F12K (n=6):** Los segmentos traqueales se congelaron a (-70°C) sumergidos en medio F12K durante 48 horas.

**Grupo 3: SBF (n=6):** Los segmentos traqueales se congelaron a (-70°C) sumergidos en solución de Suero Bovino Fetal durante 48 horas.

**Grupo 4: F12K (n=6):** Los segmentos traqueales se congelaron a (-70°C) sumergidos en medio F12K durante 15 días.

**Grupo 5: SBF (n=6):** Los segmentos traqueales se congelaron a (-70°C) sumergidos en solución de Suero Bovino Fetal durante 15 días.

***Grupos de criopreservación con almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido:***

**Grupo 6: F12K (n=6):** Los segmentos traqueales se congelaron a (-70°C) en medio F12K durante 48 horas. Transcurrido el tiempo de criopreservación a (-70°C), los segmentos traqueales se almacenaron en nitrógeno líquido (-196°C) durante 15 días.

**Grupo 7: SBF (n=6):** Los segmentos traqueales se congelaron a (-70°C) durante 48 horas en la solución de suero bovino fetal. Transcurrido el tiempo de criopreservación a (-70°C), los segmentos traqueales se almacenaron en nitrógeno líquido (-196°C) durante 15 días.

**Grupo 8: F12K (n=6):** Los segmentos traqueales fueron criopreservados durante 15 días a (-70°C) en medio F12K. Transcurrido el tiempo de criopreservación a (-70°C), los segmentos traqueales se almacenaron en nitrógeno líquido (-196°C) durante 15 días.

**Grupo 9: SBF (n=6):** Los segmentos traqueales fueron criopreservados durante 15 días a (-70°C) en la solución de Suero Bovino Fetal. Transcurrido el tiempo de criopreservación a (-70°C), los segmentos traqueales se almacenaron en nitrógeno líquido (-196°C) durante 15 días.

Una vez que concluyeron los tiempos de criopreservación de los segmentos traqueales de todos los grupos de estudio (Grupos de estudio 2 al 9), los crioviales fueron colocados en un baño maría a 37°C durante 30 minutos para su descongelación, inmediatamente después, fueron retirados del criovial y se enjuagaron durante 3 minutos en medio F12K mantenido a 37°C, con tres recambios de la solución.

## **5.7. EVALUACIONES**

### **5.7.1. Evaluación macroscópica**

Todos los segmentos traqueales fueron sometidos a una evaluación macroscópica que incluyó una apreciación visual del segmento traqueal para registrar: a) la integridad estructural, b) los cambios en la coloración del cartilago, c) la presencia de vasos sanguíneos, d) la presencia de moco y e) la ocurrencia de fracturas al descongelar los segmentos traqueales (Figura 24).

En los segmentos del grupo control, la evaluación macroscópica 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. Independientemente del tratamiento de criopreservación establecido de acuerdo con el grupo de estudio, los segmentos los segmentos traqueales de los grupos de estudio 2 al 9 fueron sometidos a dos 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 la segunda; "evaluación macroscópica post-criopreservación", inmediatamente después de que los segmentos traqueales fueron descongelados al concluir el tiempo de criopreservación.

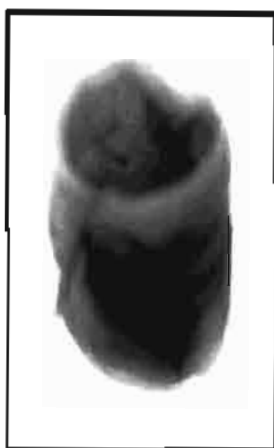


Figura 24: Evaluación macroscópica: Apreciación visual del segmento traqueal

### **5.7.2. Evaluación microscópica**

Todos los segmentos traqueales fueron sometidos a una evaluación microscópica del tejido traqueal, que con base en la histología de la tráquea se dividió en cartílago, epitelio de la mucosa, glándulas y fibras (colágena y musculares).

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 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, se determinó el porcentaje (promedio de tres conteos) de condrocitos conservados (nucleados) y de condrocitos con alteraciones (degeneración celular). Esta evaluación se realizó en la zona central de los anillos de cartílago ubicada entre los dos extremos del mismo y en cualquiera de los dos extremos (elegido de manera alterna al evaluar las laminillas de manera consecutiva). Asimismo, se evaluó la continuidad y el desprendimiento del epitelio pseudoestratificado ciliado a lo largo de la mucosa traqueal, la estructura de las glándulas seromucosas y de las fibras musculares y de colágena.

En todos los grupos de estudio, la evaluación microscópica se realizó en forma

inmediata posterior a la evaluación macroscópica para lo cual, los segmentos traqueales fueron sumergidos en una solución amortiguada de formaldehído al 10% para su fijación y 24 horas después fueron retirados del formol. Con ayuda de bisturí y sobre una caja de petri, de cada uno de los segmentos traqueales (integrados por cinco anillos), se separaron, el anillo del extremo superior, identificado como anillo 1 (A1) para fines de este trabajo (referido con sutura, proximal al cartílago cricoides, situado en la parte superior del crivial para su criopreservación), el anillo medio (anillo central del segmento traqueal) identificado como el anillo 3 (A3) y el anillo del extremo inferior (distal al cartílago cricoides y situado en la parte inferior del crivial para su criopreservación) e identificado como (A5). Los anillos ubicados entre el anillo del extremo superior y el anillo medio (A2) y entre el anillo del extremo inferior y el anillo medio (A4) fueron eliminados del estudio (Figura 25).

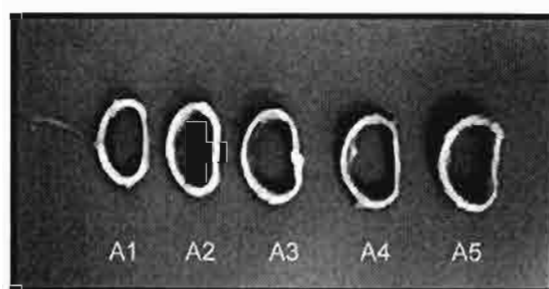


Figura 25: Anillos del segmento traqueal

Los anillos seleccionados (A1, A3, A5) fueron procesados para su inclusión en bloques de parafina y para la obtención de cortes de 4 $\mu$ m de grosor para tinciones con hematoxilina-eosina, safranina-O, azul alciano y trícromica de Masson (Figura 26).



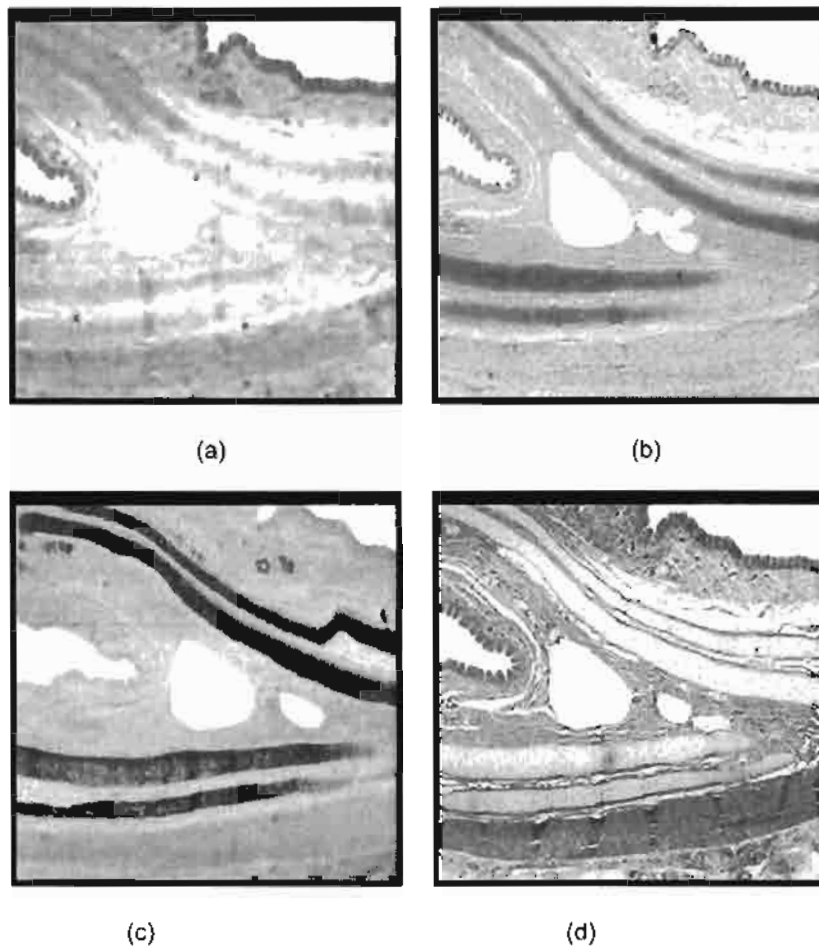

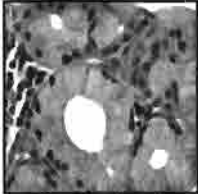
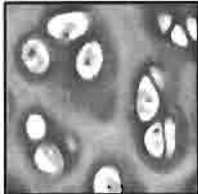


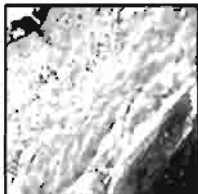
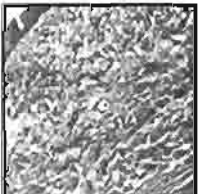
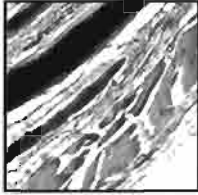
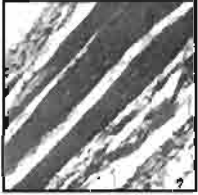


Figura 26: Tejido Traqueal (10X). Tinciones realizadas en cortes seriados obtenidos del mismo bloque: Hematoxilina-Eosina (a), Safranina-O (b), Azul Alciano (c), Tricrómica de Masson (d).

La eosina es un colorante ácido con densidad de carga negativa que se asocia a estructuras del citoplasma y de la matriz extracelular con carga catiónica, tales como filamentos citoplasmáticos, membranas intracelulares y fibras extracelulares. La hematoxilina, el azul alciano y la safranina actúan como colorantes básicos con densidad de carga positiva que se asocian a iones con carga aniónica (sulfatos, fosfatos y carboxilos) contenidos en la cromatina, en los nucleolos y en el caso de la matriz extracelular del cartílago, específicamente en el cartílago, los glucosaminoglicanos sulfatados que forman parte de los proteoglicanos además de grupos hialurónicos y condroitín sulfato (30).

La tinciones hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson se clasifican como coloraciones topográficas, éstas permiten obtener una visión general de las estructuras contenidas en un tejido y fueron utilizadas para evaluar la continuidad y el desprendimiento del epitelio pseudoestratificado ciliado a lo largo de la mucosa traqueal, 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; mientras que las tinciones azul alciano y safranina-O que se clasifican como coloraciones histoquímicas indican la presencia de compuestos químicos así como su distribución dentro de las células o espacios extracelulares de un tejido pero no proporcionan detalles estructurales y fueron utilizadas para observar los cambios en la matriz del cartílago a través de la captación de colorante. En el cuadro 3 se ilustran las tinciones utilizadas para realizar la evaluación histológica de cada uno de los tejidos analizados con base en las cuatro capas histológicas que componen la pared de la tráquea y las coloraciones correspondientes.

Estructura	Tinción H&E	Safranina-O	Azul Alciano	Tricrómica de Masson
<b>Epitelio Pseudoestratificado (Mucosa)</b>	 Cilios (rosa) Citoplasma (rosa) Núcleo (azul)			
<b>Glándulas (Epitelio) (Submucosa)</b>	 Crestas (rosa) Citoplasma (rosa) Núcleo (azul)			
<b>Cartilago</b>	 Matriz extracelular (violeta-púrpura) Núcleo (azul) Citoplasma (rosa)	 Matriz extracelular (naranja – rojo) Núcleo (negro)	 Matriz extracelular (azul) Citoplasma (rosa)	
<b>Fibras de Colágena (Submucosa y Adventicia)</b>				
<b>Fibras de Músculo Liso (Adventicia)</b>	 Fibras de Colágena (rosa) Fibras de Músculo liso (rosa)			 Fibras de Colágena (azul) Fibras de Músculo liso (rojo)

Cuadro 3: Tinciones utilizadas para la evaluación microscópica del tejido traqueal.

### **5.7.3. Evaluación de la expresión de caspasa-3**

Todos los segmentos traqueales fueron sometidos a una determinación inmunohistoquímica para detectar la presencia de caspasa-3 en el epitelio de la sumbucosa, en el epitelio glandular y en el cartílago.

Una vez que los segmentos traqueales de todos los grupos de estudio fueron fijados en formol y que de cada uno de ellos se separaron los anillos del extremo superior (A1), el anillo medio (A3) y el anillo del extremo inferior (A5) para su inclusión en bloques de parafina tal y como se describió en la sección anterior (evaluación microscópica); los anillos seleccionados (A1, A3, A5) fueron procesados para su inclusión en bloques de parafina y para la obtención de cortes de 2µm de grosor que fueron montados sobre laminillas silanizadas para la evaluar la expresión de caspasa-3 en el tejido traqueal.

La determinación de caspasa-3 en el tejido traqueal se realizó mediante la técnica inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo policlonal [Caspase 3 (CPP32) Ab-4, Rabbit Polyclonal Antibody. Neo Markers, Lab Vision, Co. RB-1197-P], el sistema biotina-avidina-peroxidasa, tinción con aminoetilcarbazol y contratinción con hematoxilina. 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. Las células con expresión positiva para caspasa-3 se tiñen de color marrón (Figura 27).

En el cartilago, se obtuvo el número total de condrocitos positivos para caspasa-3 con ayuda de un microscopio óptico y de un contador manual para células, sin embargo, para la cuantificar el número de células positivas para caspasa-3 en el cartilago fue necesario incluir una determinación morfométrica del área de cada uno de los anillos traqueales. El número de condrocitos en el cartilago varía de acuerdo con el área de los anillos de cartilago. El área de los anillos de cartilago depende del

diámetro de los mismos que a su vez, depende de la ubicación de los anillos en la tráquea. 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. Para calcular el área del cartilago, se obtuvo una imagen de los anillos traqueales utilizando un scanner y las laminillas de tejido traqueal teñidas con "hematoxilina-eosina".

Las imágenes escaneadas se ampliaron con base en una escala de referencia, sobre éstas y utilizando un programa para digitalización de imágenes (Image Pro Plus Versión 4) con interfase a un microscópio óptico (Figura 28), se trazó el perímetro del cartílago delimitándolo sobre ambos lados del pericondrio, obtenido el valor del perímetro, el programa calculó automáticamente el área del cartilago. Una vez que se registraron tanto el número total de condrocitos positivos y negativos para caspasa 3, se calculó la densidad celular positiva para caspasa-3 ajustando el número de condrocitos positivos por el área del cartilago (condrocitos positivos para caspasa 3/mm<sup>2</sup>).

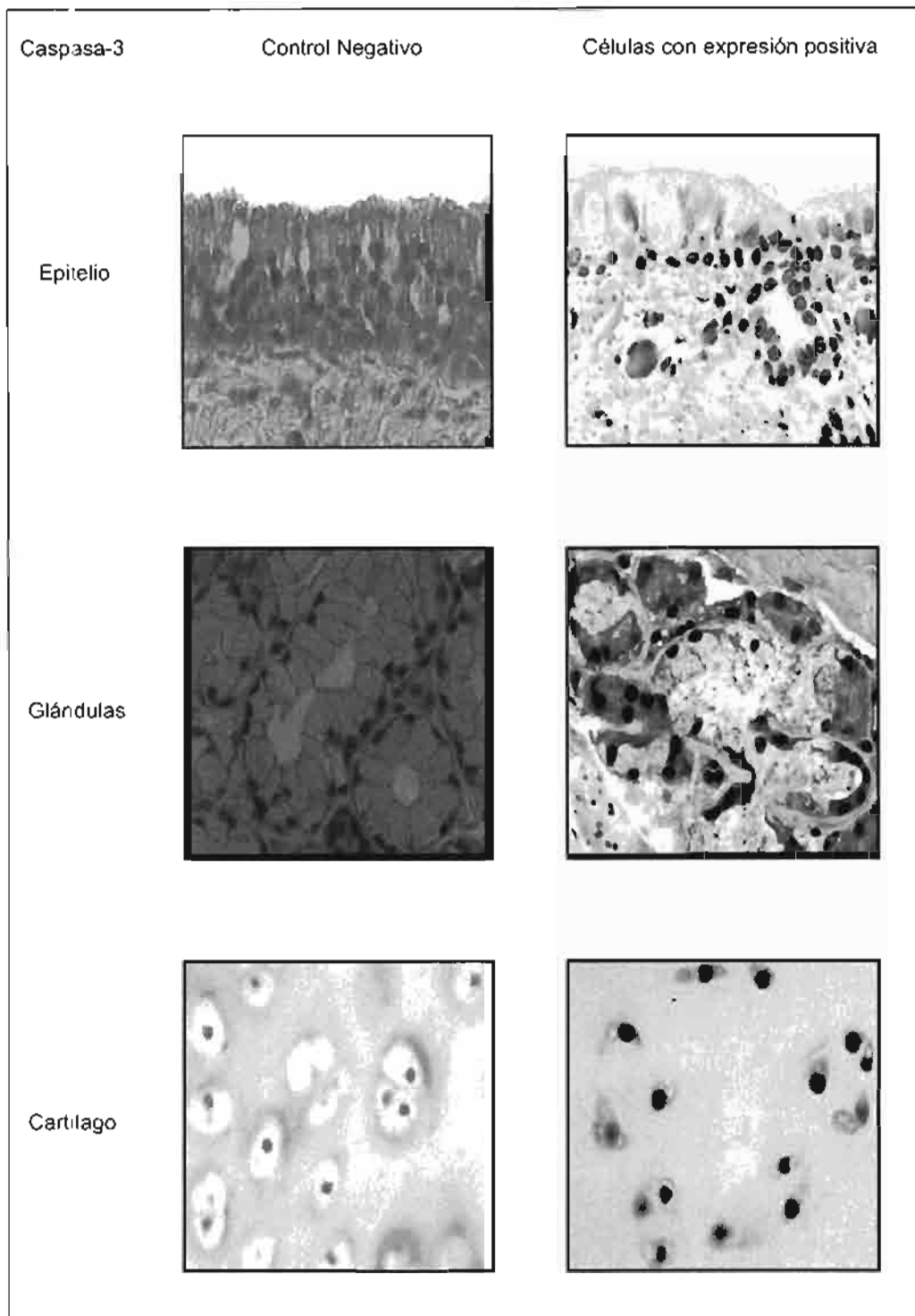


Figura 27: Determinación de caspasa 3 por inmunohistoquímica. Control negativo (columna izquierda) y células con expresión positiva para caspasa 3 (columna derecha). Epitelio pseudoestratificado, glándulas y cartilago traqueal (Aminoetilcarbazol-Hematoxilina, 40X).

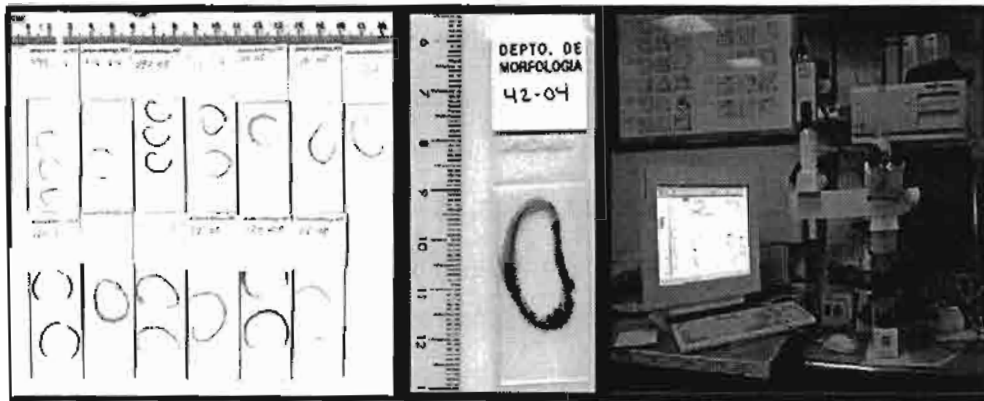


Figura 28: Laminillas escaneadas y Equipo para procesar las imágenes

#### 5.7.4. Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos de la la densidad celular positiva para caspasa-3 en el cartílago, en el epitelio de la mucosa traqueal y en el epitelio glandular y del número de condrocitos nucleados en el cartílago entre los grupos de estudio incluyó un Análisis de Varianza (ANDEVA) con prueba de TuKey para determinar el efecto de la solución, del tiempo, de la temperatura de criopreservación y de la localización del anillo en el segmento traqueal sobre estos parámetros. El número de condrocitos nucleados entre los extremos y la región central del anillo de cartílago se incluyó una prueba t-Student. Valores de "p" menores de 0.05 fueron considerados como significativos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Evaluación macroscópica

A la evaluación macroscópica e independientemente del grupo de estudio, ninguno de los 54 segmentos traqueales obtenidos presentó alteraciones aparentes en la integridad estructural, en la coloración, ni en la consistencia del cartílago. Aunque a la inspección visual, no en todos los segmentos traqueales se observaron vasos sanguíneos ni la presencia de moco, estos parámetros no se alteraron por efecto de la criopreservación. Tampoco ocurrieron fracturas aparentes después de

descongelar los segmentos traqueales (Figura 29, Cuadros 4-5).

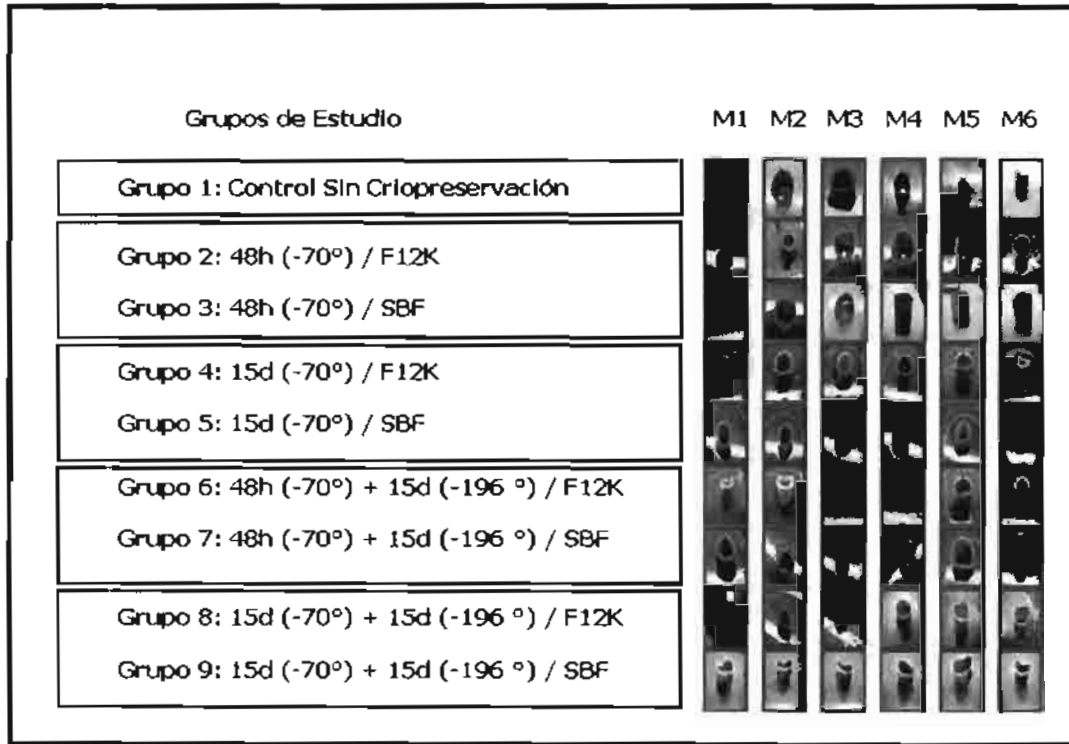


Figura 29: Evaluación macroscópica de los segmentos traqueales.

Grupo de Estudio (n/6)	Tiempo	Temperatura	Solución	Integridad Estructural	Coloración	Traqueomalacia
1: Control	----	----	Glucosada	6/6	6/6	0/6
2	48 h	(-70°C)	F12K	6/6 - 6/6	6/6 - 6/6	0/6 - 0/6
3	48 h	(-70°C)	SBF	6/6 - 6/6	6/6 - 6/6	0/6 - 0/6
4	15 d	(-70°C)	F12K	6/6 - 6/6	6/6 - 6/6	0/6 - 0/6
5	15 d	(-70°C)	SBF	6/6 - 6/6	6/6 - 6/6	0/6 - 0/6
6	48 h+15 d	(-70°C)+(-196°C)	F12K	6/6 - 6/6	6/6 - 6/6	0/6 - 0/6
7	48 h+15 d	(-70°C)+(-196°C)	SBF	6/6 - 6/6	6/6 - 6/6	0/6 - 0/6
8	15 d+15 d	(-70°C)+(-196°C)	F12K	6/6 - 6/6	6/6 - 6/6	0/6 - 0/6
9	15 d+15 d	(-70°C)+(-196°C)	SBF	6/6 - 6/6	6/6 - 6/6	0/6 - 0/6

Cuadro 4: Evaluación macroscópica: integridad estructural, coloración y traqueomalacia de los segmentos traqueales de todos los grupos de estudio (pre – post) criopreservación.



Grupo de Estudio (n/6)	Tiempo	Temperatura	Solución	Vasos Sanguíneos	Moco	Fracturas
1: Control	----	----	Glucosada	3/6	2/6	----
2	48 h	(-70°C)	F12K	6/6 - 6/6	6/6 - 6/6	0/6
3	48 h	(-70°C)	SBF	2/6 - 2/6	0/6 - 0/6	0/6
4	15 d	(-70°C)	F12K	6/6 - 6/6	1/6 - 1/6	0/6
5	15 d	(-70°C)	SBF	6/6 - 6/6	6/6 - 6/6	0/6
6	48 h +15 d	(-70°C)+(-196°C)	F12K	6/6 - 6/6	6/6 - 6/6	0/6
7	48 h+15 d	(-70°C)+(-196°C)	SBF	6/6 - 6/6	2/6 - 2/6	0/6
8	15 d+15 d	(-70°C)+(-196°C)	F12K	6/6 - 6/6	6/6 - 6/6	0/6
9	15 d+15 d	(-70°C)+(-196°C)	SBF	6/6 - 6/6	6/6 - 6/6	0/6

Cuadro 5: Evaluación macroscópica: vasos sanguíneos, presencia de moco y fracturas de los segmentos traqueales de todos los grupos de estudio (pre – post) criopreservación.

### **Resumen, Evaluación Macroscópica.**

*Independientemente de las condiciones experimentales de solución, tiempo y temperatura de congelación establecidas para cada uno de los tratamientos de acuerdo con el grupo de estudio, la integridad estructural aparente de los segmentos traqueales no se modifica por efecto de la criopreservación.*

### **6.2. Evaluación microscópica**

De cada uno de los 54 segmentos traqueales (n=6 / grupo de estudio) se separaron tres anillos (A1, A3 y A5) obteniendo un total de 162 anillos que fueron sometidos a una evaluación microscópica del cartílago, del epitelio de la mucosa, de las glándulas y de las fibras de colágena y de músculo liso.

#### **6.2.1. Cartilago traqueal**

##### **6.2.1.1. Estructura**

Sin importar el grupo de estudio ni las condiciones en que se realizó la criopreservación, en ninguno de los 162 anillos analizados se observaron alteraciones en el mantenimiento estructural característico del cartilago traqueal en forma de herradura o "C" (Figura 30).

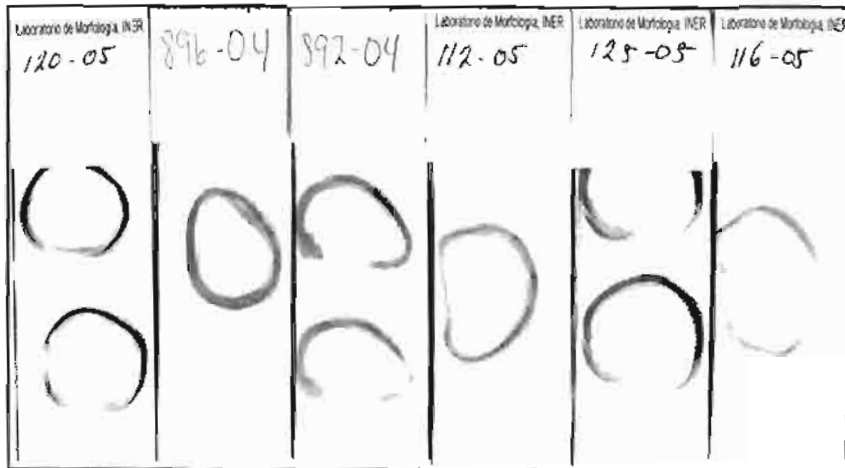
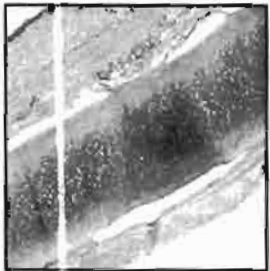
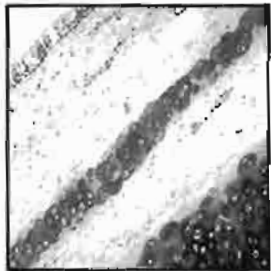
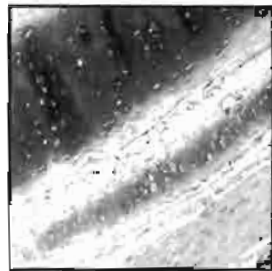
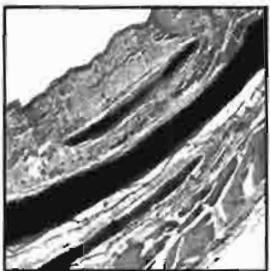


Figura 30: Evaluación histológica del cartilago (H&E). Mantenimiento de la estructura característica de los anillos de cartilago traqueal en forma de "C".

De los 162 anillos traqueales analizados, unicamente 33 de ellos (20.37%) presentaron el cartilago traqueal característico, los 129 anillos restantes (79.62%), incluyeron, además de éste, placas accesorias de cartilago de forma y tamaño variable ubicadas en la submucosa traqueal ( $n=90/129$ , 55.55%), entre anillo de cartilago y la adventicia ( $n=9/129$ , 5.55%) y en ambas zonas ( $n=30/129$ , 18.51%) (Cuadro 6).

Cartilago (H&E)				
Placas Accesorias de Fibrocartilago	Sin (2.5X)	En submucosa (10X)	En adventicia (10X)	En submucosa y adventicia (2.5X)
Anillos (n)/(%)	(17)/(18.88%)	(42)/(46.66%)	(12)/(13.33%)	(19)/(21.11%)

Cuadro 6: Número y porcentaje de anillos traqueales con placas accesorias de cartilago.

### 6.2.1.2. Captación de colorante

#### Tinción con Hematoxilina-Eosina (Visión panorámica)

A la tinción con hematoxilina-eosina, sin importar el grupo de estudio, con respecto a la coloración basófila del cartilago traqueal común y de un total de (n=162) anillos traqueales analizados, el 29.02% (n=47/162) no presentó alteraciones en la tinción del cartilago. Con base en el grupo de estudio, este porcentaje fue mayor en el grupo control y disminuyó por efecto de la criopreservación [G1: 34.04% (n=16/47), G2: 8.51% (n=4/47), G3 y G4: 0% (n=0/47), G5: 10.63% (n=5/47), G6: 17.02% (n=8/47), G7: 12.76% (n=6/47), G8 y G9: 8.51% (n=4/47)]. Con respecto a la localización del anillo en el segmento traqueal y sin considerar el grupo de estudio, 35 (74.46%) de los 47 anillos que no presentaron alteraciones en la tinción del cartilago fueron proximales al cartilago cricoides (anillos referidos con sutura y ubicados en la superior del crivial para su congelación), 8 correspondieron al anillo medio (22.85%, n=8/35) y 4 al anillo distal al cartilago cricoides (11.42%, n=4/35) (ubicado en la parte inferior del crivial para su congelación).

De manera complementaria, el 70.98% (n=115/162) de los anillos traqueales,

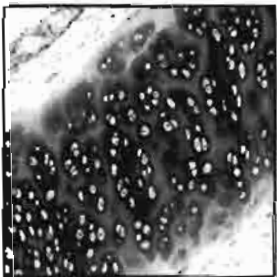
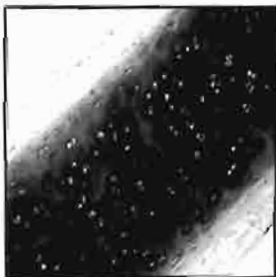
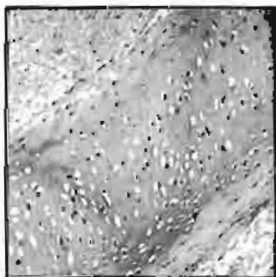
presentó alteraciones en la tinción del cartílago. Las alteraciones en la tinción del cartílago se caracterizaron tanto por una intensa captación del colorante (cartílago hipertenido) como por una captación tenue (cartílago débilmente teñido).

De los 115 anillos traqueales con alteraciones en la tinción del cartílago, 62 de ellos (53.91%) presentaron intensa captación del colorante y de éstos, el 77.41% (n=48/62) perteneció a cualquiera de los grupos de estudio 2, 4, 6 u 8, en los que se utilizó medio F12K como solución de criopreservación [vs 22.59% (n=14/62) de anillos que presentaron hipertinción del cartílago y correspondieron a los grupos de estudio 3,5,7 y 9 en los que se utilizó SFB como solución de criopreservación]. Con respecto a la localización del anillo en el segmento traqueal y sin considerar el grupo de estudio, 31 de los 62 anillos (50%) que presentaron hipertinción del cartílago fueron los ubicados en la parte media del segmento traqueal, 14 fueron proximales al cartílago cricoides (22.58%, n=14/62) y 17 distales al mismo (27.41%, n=17/62).

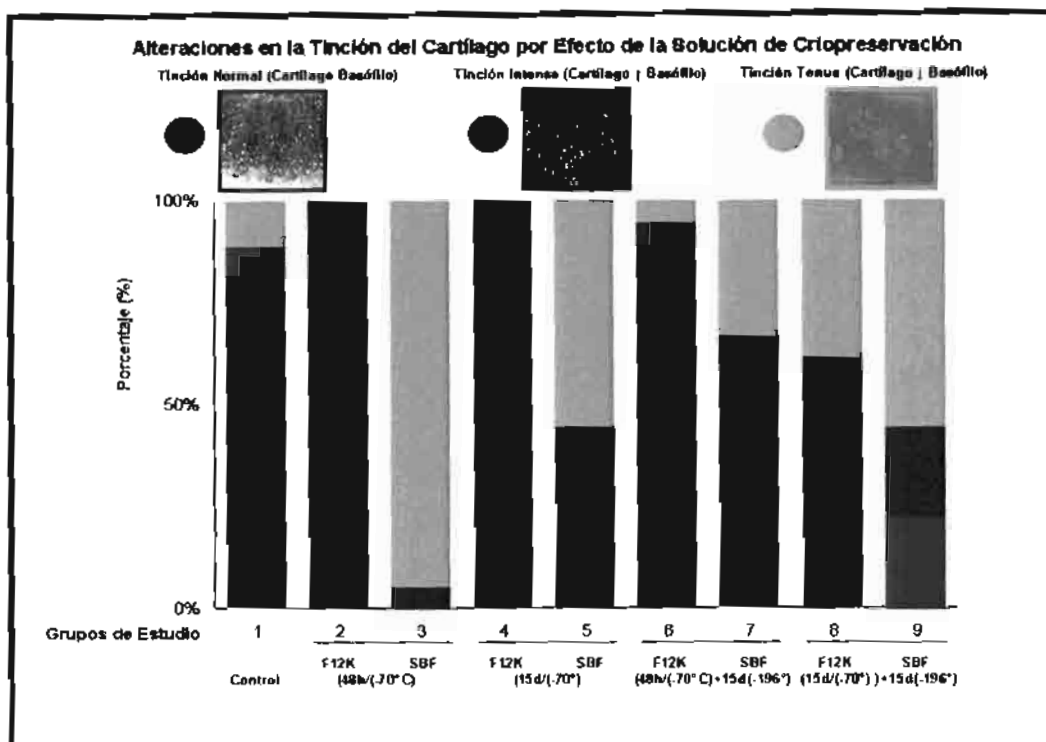
Cincuenta y tres (46.08%) de los 115 anillos que presentaron alteraciones en la tinción del cartílago mostraron tenue captación del colorante, de éstos, el 81.13% (n=43/53) se relacionó con cualquiera de los grupos de estudio 3, 5 7 y 9 en los que se utilizó SBF como solución de criopreservación [vs 18.86% (n= 10/53) de anillos traqueales con tinción tenue del cartílago de los grupos de estudio 2, 4, 6 y 8 en los que se utilizó medio F12K como solución de criopreservación]. Con respecto a la localización del anillo en el segmento traqueal y sin importar el grupo de estudio, 33 (62.26%) de los 53 anillos con tinción livida del cartílago correspondieron al anillo distal al cartílago cricoides (ubicado en el fondo del crivial para su criopreservación), 28.30% (n=15/53) al anillo medio del segmento traqueal y 9.43% (n=5/53) al anillo proximal al cartílago cricoides.

Los resultados indican que con respecto al grupo control e independientemente del tratamiento, la criopreservación de los segmentos traqueales provoca alteraciones en la tinción del cartílago. Al parecer, la criopreservación de los

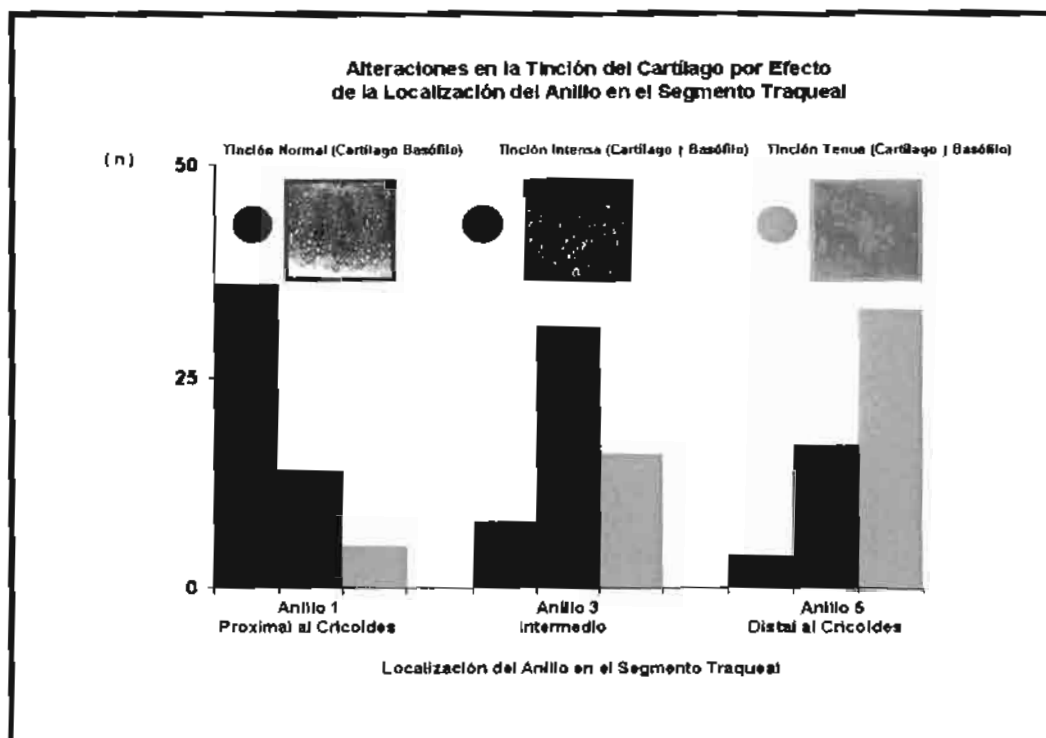
segmentos traqueales con medio F12K ocasiona una captación intensa del colorante, que se manifiesta principalmente en el anillo localizado en la región media del segmento traqueal, en comparación con los anillos ubicados en los extremos del mismo, mientras que el uso de SBF como solución de criopreservación se relaciona con una tenue tinción del cartílago que se manifiesta de manera progresiva a lo largo del segmento traqueal, afectando principalmente al anillo localizado en la parte inferior del segmento traqueal y en menor intensidad al anillo del extremo superior. Estos resultados se muestran en el cuadro 7 y se ilustran en las gráficas 1 y 2.

Anillos de C.artilago (H&E, 10X) n (%)	Tinción Basófila	↑ Tinción Basófila	↓ Tinción Basófila
			
Grupo de Estudio y Condiciones de la Criopreservación			
(G1):Control	16 (88.89%)		2 (11.11%)
(G2):48h (-70°C) F12K	4 (22.22%)	14 (77.77%)	
(G3):48h (-70°C) SBF		1 (5.55%)	17 (94.44%)
(G4):15d (-70°C) F12K		18 (100 %)	
(G5):15d (-70°C) SBF	5 (27.77%)	3 (16.66%)	10 (55.55%)
(G6):48h (-70°C) F12K+NL	8 (44.44%)	9 (50.00%)	1 (5.55%)
(G7):48h (-70°C) SBF+NL	6 (33.33%)	6 (33.33%)	6 (33.33%)
(G8):15d (-70°C) F12K+NL	4 (22.22%)	7 (38.88%)	7 (38.88%)
(G9):15d (-70°C) SBF+NL	4 (22.22%)	4 (22.22%)	10 (55.55%)

Cuadro 7: Número y (porcentaje) de anillos traqueales que presentaron alteraciones en la tinción del cartílago con Hematoxilina-Eosina. (n=18/ grupo de estudio).



Gráfica 1: Alteraciones en la tinción con hematoxilina-eosina del cartilago por efecto de la solución de criopreservación.



Gráfica 2: Alteraciones en la tinción del cartilago con hematoxilina-eosina por efecto de la localización del anillo en el segmento traqueal.

### **Tinciones con Safranina-O y Azul Alciano (Visión panorámica)**

Con las tinciones safranina-O y azul alciano, sin importar el grupo de estudio, con respecto a la coloración del cartilago de los segmentos traqueales del grupo control que no fueron sometidos a ningún tratamiento de criopreservación y de un total de 162 anillos traqueales analizados, el 33.95% (n=55/162) no mostró alteraciones en la tinción del cartilago. El porcentaje y número de anillos traqueales sin alteraciones en la tinción del cartilago de acuerdo con el grupo de estudio fue: G1:32.72% (n=18/55), G2:10.09% (n=6/55), G3:27.27% (n=15/55), G4:0% (n=0/55), G5:9.09% (n=5/55), G6:0% (n=0/55), G7:9.09% (n=5/55), G8:10.09% (n=6/55) y G9:0% (n=0/55) para los grupos uno al nueve respectivamente. Con base en la localización del anillo en el segmento traqueal y sin considerar el grupo de estudio, 21 de los 55 anillos (38.18%) sin alteraciones en la tinción del cartilago, correspondieron al anillo medio del segmento traqueal, 16 (29.09%, n=16/55) al anillo proximal al cartilago cricoides, referido con sutura y ubicado en la parte superior del crivial para su criopreservación y 18 (32.72%, n=18/55) al anillo distal al cartilago cricoides (ubicado en el fondo del crivial).

El resto de los anillos traqueales, (66.04%, n=107/162) presentó alteraciones en la tinción del cartilago. Las alteraciones en las tinciones del cartilago con safranina-O y azul alciano se caracterizaron tanto por una intensa captación del colorante (cartilago hiperteñido) como por una captación tenue (cartilago débilmente teñido).

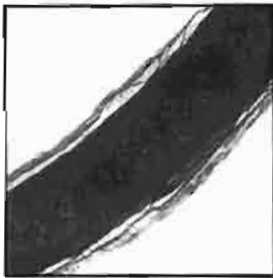


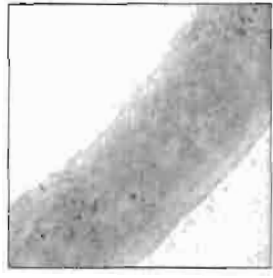


De los 107 anillos traqueales con alteraciones en la tinción del cartilago, 65 (60.74%) presentaron hipertinción, de éstos, el 83.90% (n=54/65) perteneció a cualquiera de los grupos de estudio 2, 4, 6 u 8 en los que se utilizó medio F12K como solución de criopreservación [vs 16.92% (n=11/65) de los anillos traqueales que mostraron hipertinción del cartilago teñido con safranina-O y azul alciano procedentes de los grupos de estudio 3, 5, 7 y 9 en los que se utilizó SFB como solución de criopreservación]. Con respecto a la localización del anillo en el segmento traqueal y sin considerar el grupo de estudio, 32 de ellos (49.23%,n=32/65)

correspondieron al anillo proximal al cartílago cricoides, localizado en la parte superior del crivial, 21 al anillo medio 32.30% (n=21/65) y 12 (18.46% n=12/65) al anillo distal al cartílago cricoides localizado en la parte inferior del crivial.

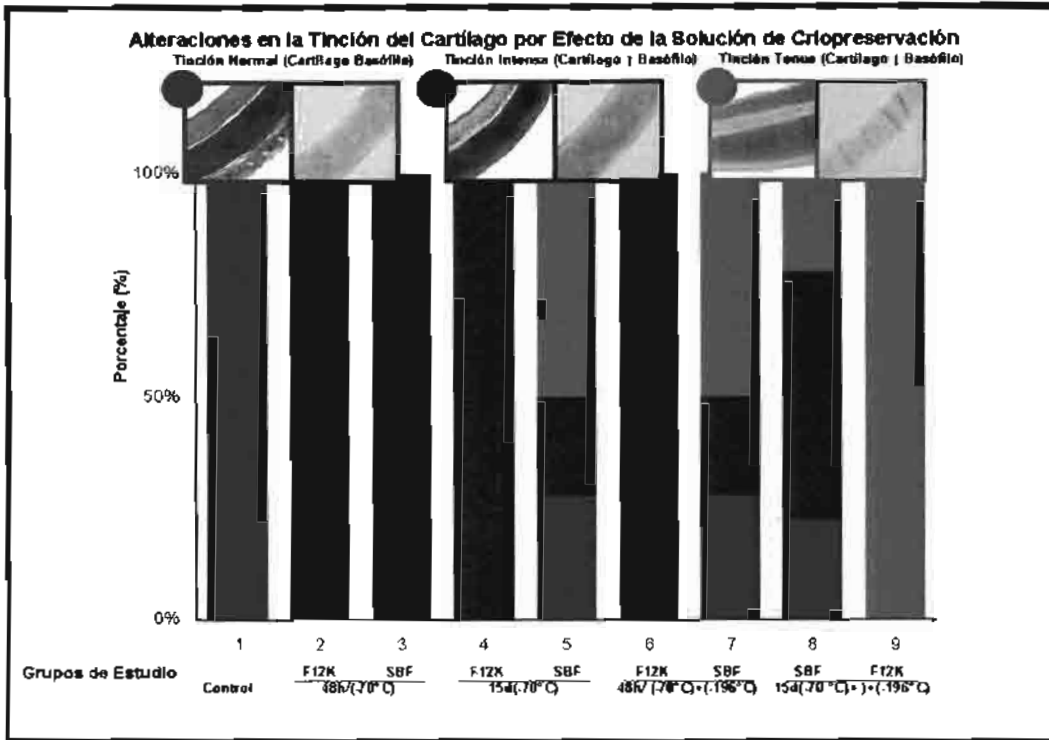
El 39.25% de los anillos traqueales (n=42/107) presentó una tinción tenue del cartilago, de éstos, el 85.71% (n=36/42) se incluyó en los grupos de estudio 3, 5, 7 y 9 en los que se utilizó SBF como solución de criopreservación y el 14.29% (n=6/42) perteneció a los grupos de estudio 2, 4, 6 u 8 en los que se utilizó medio F12K. Con base en la localización del anillo en el segmento traqueal y sin importar el grupo de estudio, 24 de los anillos con una tenue tinción del cartilago (57.14%) correspondieron a los anillos distales al cartílago cricoides ubicados en la zona inferior del crivial durante la criopreservación, 12 de ellos fueron anillos localizados en la región central del segmento traqueal (28.57%) y 6 (14.28%) fueron proximales al cartílago cricoides (ubicados en la parte superior del crivial).

Los resultados obtenidos indican que con respecto al grupo control e independientemente del tratamiento, la criopreservación de los segmentos traqueales provoca alteraciones en la tinción del cartilago las tinciones safranina-O y azul alciano y que al parecer, la criopreservación de los segmentos traqueales con medio F12K ocasiona una captación intensa del colorante que se manifiesta principalmente en cartilago de los anillos localizados en el extremo superior del segmento traqueal en comparación con los anillos ubicados en el centro y en el extremo inferior del mismo y de manera inversa, el uso de SBF como solución de criopreservación se relaciona con una tenue tinción del cartilago que afecta principalmente al anillo localizado en la parte inferior del segmento traqueal. Estos resultados se muestran en el cuadro 8 y se ilustran en las gráficas 3 y 4.

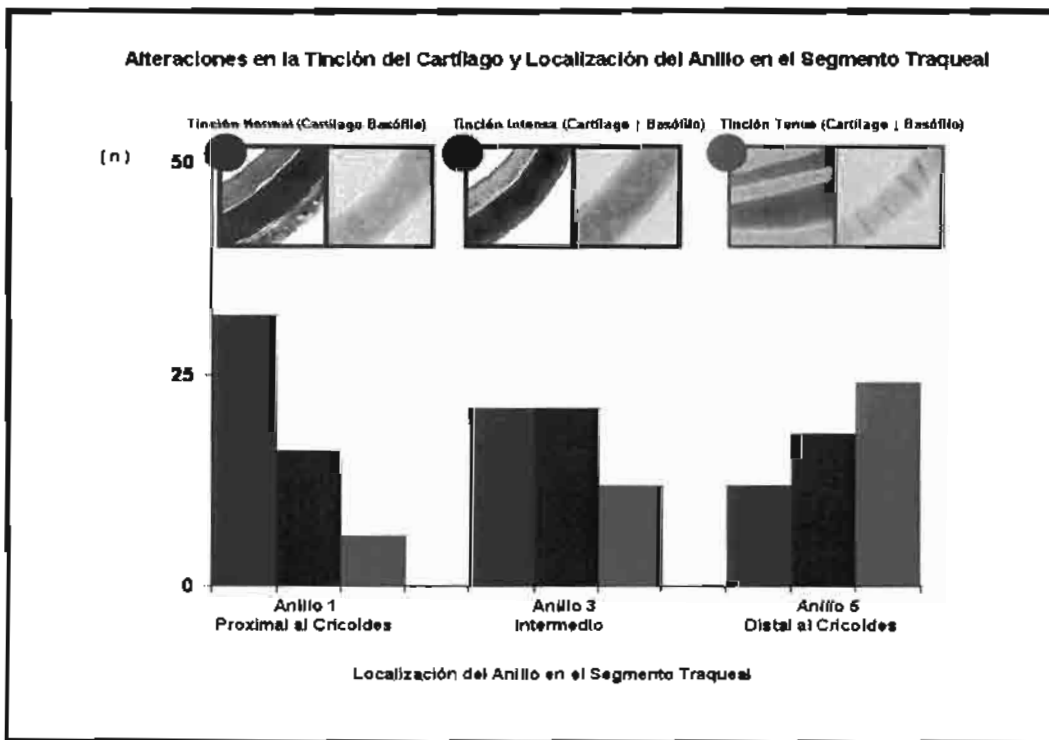


Anillos de Cartílago (2.5X), n (%)	Tinción Basófila	↑ Tinción Basófila	↓ Tinción Basófila
Safranina-O			
Azul Alciano			
Grupo de Estudio y Condiciones de la Criopreservación			
(G1):Control	18 (100%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
(G2):48h (-70°C) F12K	6 (33.33%)	12 (66.66%)	0 (0.00%)
(G3):48h (-70°C) SBF	9 (50.00%)	9 (50.00%)	0 (0.00%)
(G4):15d (-70°C) F12K	0 (0.00%)	18 (100%)	0 (0.00%)
(G5):15d (-70°C) SBF	5 (27.77%)	4 (22.23%)	9 (50.00%)
(G6):48h (-70°C) F12K+NL	0 (0.00%)	18 (100%)	0 (0.00%)
(G7):48h (-70°C) SBF+NL	5 (27.77%)	4 (22.23%)	9 (50.00%)
(G8):15d (-70°C) F12K+NL	4 (22.23%)	10 (55.54%)	4 (22.23%)
(G9):15d (-70°C) SBF+NL	0 (0.00%)	0 (0.00%)	18 (100%)

Cuadro 8: Número y (porcentaje) de anillos traqueales que presentaron alteraciones en la tinción del cartílago con Safranina-O y Azul Alciano por grupo de estudio (n=18).



Gráfica 3: Alteraciones en la tinción del cartilago con safranina-o y azul alciano por efecto de la solución de criopreservación.






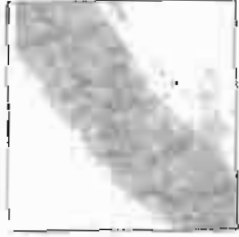








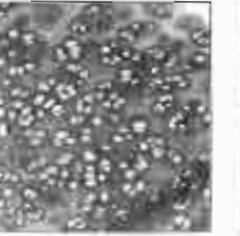
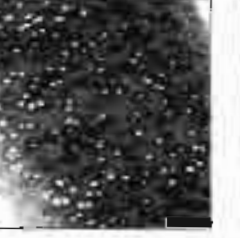
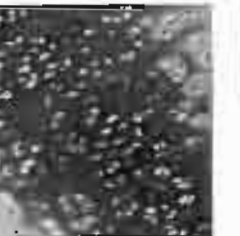
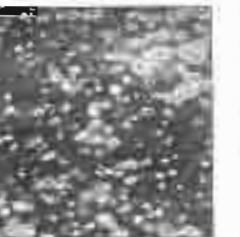
Gráfica 4: Alteraciones en la tinción del cartilago con safranina-o y azul alciano por efecto de la localización del anillo en el segmento traqueal.

### ***Matrices pericelular, territorial e interterritorial del Cartilago***

A las tinciones hematoxilina-eosina, safranina-O y azul alciano, el mayor porcentaje de anillos traqueales sin evidencia de alteraciones en la tinción de las matrices pericelular, territorial e interterritorial del cartilago correspondió a los grupos de estudio 1, (n=18, 100%) control sin criopreservación, 2 (n=15, 83.33%), 4 (n=18, 100%), 6 (n=12, 66.66%) y 8 (n=6, 33.33%) en los que la criopreservación de los segmentos traqueales se realizó a una temperatura de (-70°C) durante 48 horas (G2) y 15 días (G4) y durante 48 horas (G6) y 15 días (G8) en forma previa al almacenamiento en nitrógeno líquido (-196°C) respectivamente y a los grupos de estudio 3 (n=18, 100%) y 5 (n=2, 11.11%) en los que los segmentos traqueales fueron criopreservados durante 48 horas y 15 días a (-70°C) respectivamente, utilizando SBF como solución de criopreservación.

Las alteraciones encontradas en la tinción de las matrices pericelular, territorial e interterritorial del cartilago mostraron esquemas distintivos y caracterizados que involucraron: a) compromiso de grupos isógenos continuos, proximales al pericondrio y ubicados en su mayoría, en un solo lado del cartilago [grupo 5 (n=13 anillos, 72.22%), segmentos traqueales criopreservados 15 días a (-70°C) en SBF y grupos de estudio 2 (n=3, 16.66%), 6 (n=6, 33.33%) y 8 (n=2, 11.11%)], b) compromiso de grupos isógenos continuos, proximales al pericondrio ubicados en ambos lados del cartilago y evidentes en los grupos de estudio en los que los segmentos traqueales fueron criopreservados utilizando SBF como solución de criopreservación [grupo 5 (n=3 anillos, 16.66%)] y/o con almacenamiento en nitrógeno líquido [grupos de estudio 7 (n=4, 22.22%), 8 (n=10, 55.55%) y 9 (n=7, 38.88%)] independientemente de la solución de criopreservación utilizada y c) zonas de gran extensión con compromiso de grupos isógenos continuos proximales al pericondrio, ubicados en ambos lados del cartilago involucrando células ubicadas en la región central del cartilago (entre ambos pericondrios) y que se presentaron únicamente en los grupos de estudio en los que los segmentos traqueales fueron criopreservados utilizando SBF como solución de criopreservación y nitrógeno líquido [grupos 7 (n=13, 72.22%)

y 9 (n=11, 61.11%). Estos resultados se ilustran en el cuadro 9, figura 31 y gráfica 5.

<p>Cartilago Tinción Azul Alciano (2.5X)</p>							
	<p>Cartilago Tinción Safraína-O (2.5X)</p>						
		<p>Cartilago Tinción Hematoxilina-Eosina (2.5X)</p>					
			<p>Cartilago Tinción Hematoxilina-Eosina (10X)</p>				
Sin Criopreservación	18 (100%)						
<p>Tiempo-Temperatura-Solución</p> <p>48h(-70°C)</p> <p>15d(-70°C)</p>	<p>F12K</p> <p>G2:15 (83.33%)</p> <p>G4:18 (100%)</p>	<p>SBF</p> <p>G3:18 (100%)</p> <p>G5: 2 (11.11%)</p>	<p>F12K</p> <p>G2: 3 (16.66%)</p> <p>G5:13 (72.22%)</p>	<p>SBF</p> <p>G6: 6 (33.33%)</p> <p>G8: 2 (11.11%)</p>	<p>F12K</p> <p>G5: 3 (16.66%)</p> <p>G7: 4 (22.22%)</p>	<p>SBF</p> <p>G8: 10 (55.55%)</p> <p>G9: 7 (38.88%)</p>	<p>F12K</p> <p>G7: 13 (72.22%)</p> <p>G9: 11 (67.11%)</p>

Cuadro 9: Alteraciones en las matrices pericelular, territorial e interterritorial del cartilago. Tinciones Azul alciano, safraína-O y hematoxilina-eosina (40X).

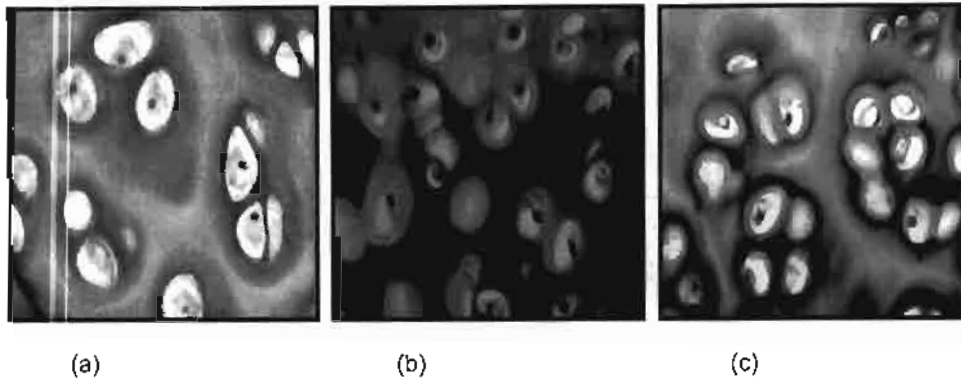
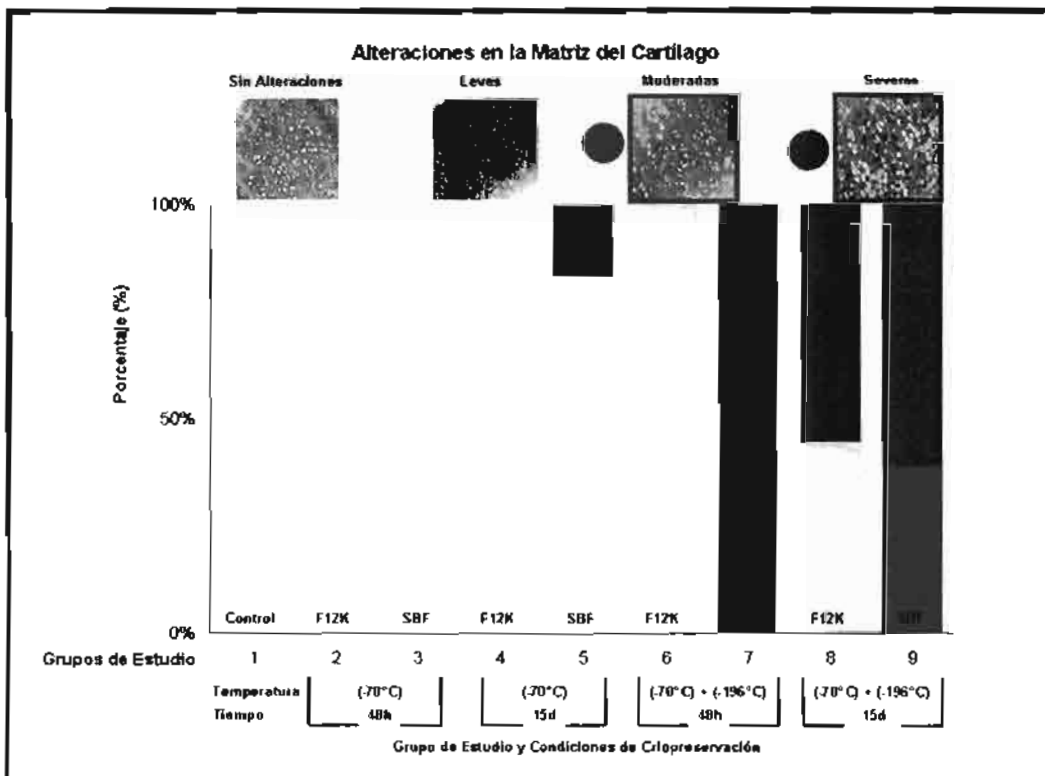


Figura 31: Cartilago traqueal sin alteraciones (a) y con alteraciones evidentes en la tinción de las matrices pericelular, territorial e interterritorial (b,c).



Gráfica 5 Alteraciones en la tinción de las matrices pericelular, territorial e interterritorial del cartilago.

### 6.2.1.3. Degeneración celular

El porcentaje de condrocitos conservados "sin alteraciones" y de degeneración celular obtenido tanto en los extremos como en la región central de los anillos de cartilago de acuerdo con su localización en el segmento traqueal [proximal al

cartílago cricoides (A1), intermedio (A3) y distal al cartílago cricoides (A5)] para todos los grupos de estudio se reporta en los cuadros 10 y 11 respectivamente.

En ninguno de los grupos de estudio, la localización del anillo de cartílago en el segmento traqueal influyó en el porcentaje de condrocitos conservados y de degeneración celular ni en los extremos ni en la región central del anillo de cartílago ( $p>0.05$ ). Con base en este resultado, se obtuvo el porcentaje promedio de condrocitos conservados y el porcentaje promedio de degeneración celular tanto en los extremos como en la región central de los 18 anillos de cartílago de cada uno de los grupos de estudio sin importar su localización en el segmento traqueal (Cuadro 12).

En todos los grupos de estudio, el porcentaje de condrocitos nucleados fue significativamente mayor en los extremos del anillo de cartílago que en la región central del mismo ( $p<0.001$ ) y de manera inversamente proporcional, el porcentaje de degeneración celular en la región central del anillo de cartílago fue significativamente mayor que en los extremos del anillo de cartílago ( $p<0.001$ ), (Gráfica 6).

Los segmentos traqueales del grupo control que no fueron sometidos a ningún tratamiento de criopreservación, presentaron el mayor porcentaje de condrocitos nucleados en los extremos del anillo de cartílago, con respecto al resto de los grupos de estudio independientemente del tratamiento de criopreservación, aunque este resultado fue significativamente diferente únicamente contra los grupos de estudio 4 y 6 ( $p<0.003$ ), (Gráfica 6). La disminución en el porcentaje de condrocitos nucleados y de degeneración celular que ocurrió en los extremos del anillo de cartílago de los segmentos traqueales criopreservados correspondientes a los grupos de estudio 4 y 6 con respecto al grupo control resultó al criopreservar los segmentos traqueales utilizando medio F12K como solución de criopreservación ( $p<0.001$ ), durante 15 días ( $p<0.001$ ) sin importar el almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno

líquido (control vs -70, control vs -196°C,  $p < 0.001$ ).

Sin importar las condiciones de tiempo, temperatura, solución de criopreservación y con respecto al grupo control, el porcentaje de condrocitos nucleados en la región central del anillo de cartílago disminuyó significativamente por efecto de la congelación ( $p < 0.001$ ), (Gráfica 6).

La diferencia porcentual de condrocitos nucleados y de degeneración celular entre los extremos y la región central del anillo de cartílago fue (20.50%), (41.72%), (34.78%), (36.00%), (30.72%), (29.95%), (33.50%), (32.16%) y (38.73%) para los grupos de estudio 1 al 9 respectivamente. Con respecto al grupo control, esta diferencia se incrementó significativamente por efecto de la congelación sin importar el tratamiento de criopreservación ( $p < 0.001$ ), (Gráfica 7).


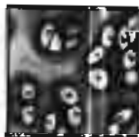


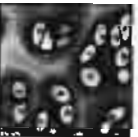



Segmento Traqueal	Anillo y Región	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
1 2 3 4 5 6	(A1)	79	80	73	64	68	58	64	58	41	21	20	27	36	32	42	36	42	59
		60	75	71	40	67	47	83	41	60	40	25	29	60	33	53	17	59	40
		98	55	47	37	64	39	76	69	54	2	45	53	63	36	61	24	31	46
		53	69	71	67	55	17	56	61	65	47	31	38	33	45	83	44	39	35
		57	62	53	47	48	27	69	38	61	43	23	38	47	53	73	31	62	39
		77	62	55	13	41	76	61	57	73	73	23	38	45	87	59	24	39	43
Promedio	70.67	67.17	61.67	44.67	57.16	44.00	68.17	54.00	59.00	29.33	32.83	38.33	55.33	42.83	56.00	31.83	46.00	41.00	
±EE	6.99	3.79	4.60	8.08	4.51	8.70	4.078	4.91	4.42	6.99	3.79	4.60	8.08	4.51	8.70	4.07	4.91	4.42	
1 2 3 4 5 6	(A3)	69	50	52	30	39	68	75	67	80	31	50	48	70	61	32	25	33	40
		75	75	68	50	46	62	64	58	77	25	25	32	50	54	38	36	42	23
		68	78	84	68	53	39	86	54	52	32	22	16	32	47	61	14	46	48
		74	49	43	38	68	43	69	45	51	26	51	57	62	34	57	31	55	49
		68	59	84	17	59	25	24	67	59	32	41	41	16	83	41	75	76	33
		62	51	65	30	63	49	56	60	52	38	38	49	35	70	37	51	44	40
Promedio	69.33	60.33	66.00	38.83	54.33	47.67	62.33	58.50	58.50	30.67	39.67	34.00	61.17	45.66	52.33	37.67	41.50	41.50	
±EE	1.92	5.32	6.77	7.32	4.24	6.40	8.71	3.41	4.02	1.92	5.32	3.77	7.32	4.24	6.40	8.71	3.41	4.02	
1 2 3 4 5 6	(A5)	62	68	74	78	70	65	74	51	48	38	32	26	22	30	35	26	49	52
		72	31	54	65	72	41	68	71	70	28	69	46	35	28	59	32	29	30
		71	65	73	80	61	58	73	33	50	29	35	27	20	39	42	27	67	50
		63	45	46	30	50	63	75	52	64	37	55	54	70	50	37	25	48	36
		76	55	73	15	57	56	65	57	87	24	45	27	28	85	43	44	35	43
		66	48	72	69	43	80	71	63	83	34	34	52	28	31	57	20	29	37
Promedio	68.33	52.00	65.33	56.17	58.83	60.50	71.00	54.50	67.00	31.67	48.00	34.67	43.83	41.16	39.50	29.00	45.50	33.00	
±EE	2.26	5.59	4.96	11.05	4.60	5.20	1.57	5.26	6.64	2.26	5.59	4.96	11.05	4.60	5.20	1.57	5.26	6.64	
A1vsA3vsA5	(p)	0.925	0.112	0.839	0.382	0.774	0.243	0.535	0.772	0.491	0.925	0.112	0.839	0.382	0.774	0.243	0.535	0.772	0.491

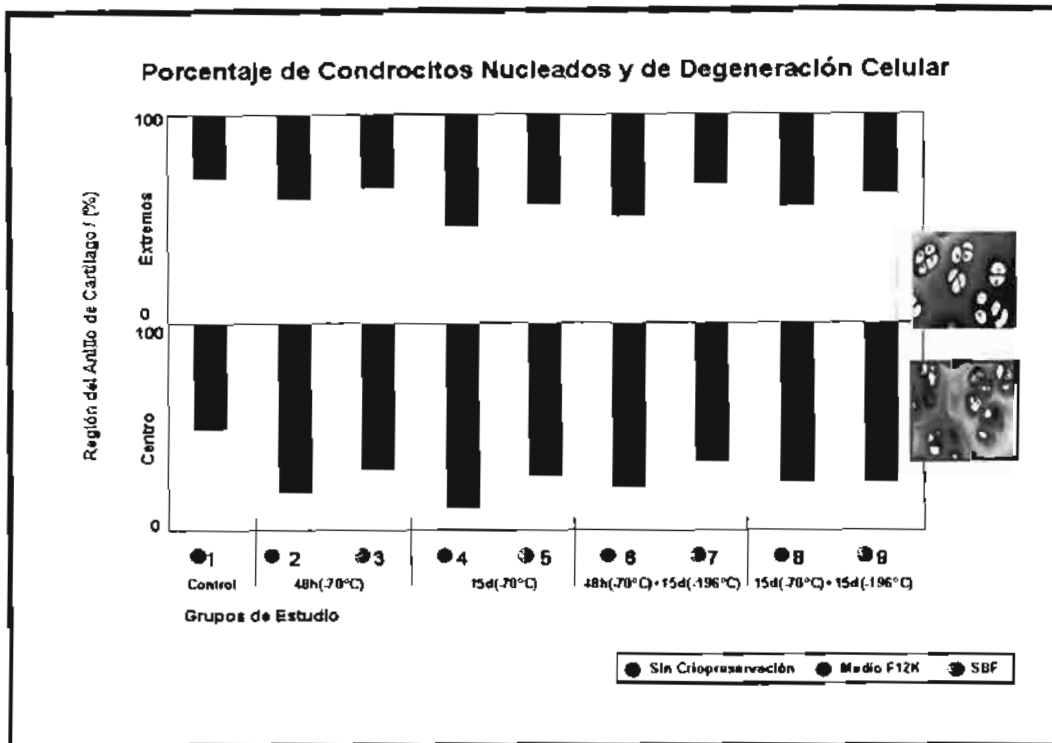
Cuadro 10: Porcentaje de condrocitos nucleados y degeneración celular en los extremos del cartilago de acuerdo con la localización de los anillos en el segmento traqueal, (n = 6 anillos A1), (n = 6 anillos A3) y (n = 6 anillos A5) / grupo de estudio. Valores de significancia "p" (A1vsA3vsA5).

Segmento Traqueal	Anillo y Región	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	
1	(A1)	49	5	18	4	27	24	42	31	12	51	85	82	96	73	76	58	69	88	
		59	14	28	5	25	22	38	32	29	29	41	86	72	95	75	78	62	68	71
		54	5	37	8	22	19	36	22	30	30	46	95	63	92	78	81	64	78	70
		21	19	32	10	19	10	38	17	17	20	79	81	68	90	81	90	62	83	80
		49	18	20	4	27	14	29	4	4	32	51	82	80	96	73	86	71	96	68
		22	22	17	2	18	21	31	28	28	26	78	78	83	98	82	79	69	72	74
		42.33	15.50	25.33	5.50	23.00	18.33	35.66	22.33	24.83	57.67	84.50	74.67	94.50	77.00	81.67	64.33	77.67	75.17	75.17
±EE	6.76	2.40	3.36	1.20	1.61	2.17	1.97	4.34	3.08	6.76	2.40	3.36	1.20	1.61	2.17	1.97	4.34	3.08		
2	(A3)	62	16	28	11	29	25	30	39	17	38	84	72	89	71	75	70	61	83	
		63	17	21	19	24	16	35	22	27	27	37	83	79	81	76	84	65	78	73
		54	7	42	11	26	19	42	18	18	29	46	93	58	89	74	81	58	82	71
		48	25	73	10	25	9	29	19	19	18	52	75	27	90	75	91	71	81	82
		57	35	40	1	16	23	25	16	16	13	43	65	60	99	84	77	76	84	87
		47	14	23	14	32	66	36	28	28	30	53	86	77	86	68	34	64	72	70
		55.17	19.00	37.83	11.00	25.33	26.33	32.66	23.67	22.33	44.83	81.00	62.17	89.00	74.66	73.67	67.33	76.33	77.67	2.94
±EE	2.77	3.97	7.87	2.40	2.21	8.26	2.57	3.50	2.94	2.77	3.97	7.87	2.40	2.21	8.26	2.57	3.50	2.94		
3	(A5)	56	18	13	23	23	22	29	35	22	44	82	87	77	77	78	71	65	78	
		63	35	21	29	27	19	38	37	18	37	65	79	71	73	81	62	63	82	
		59	19	34	14	31	19	39	11	11	34	41	81	66	69	69	61	89	66	
		42	17	32	2	34	21	36	20	5	58	83	68	98	66	79	64	80	95	
		48	10	34	0	40	10	25	20	23	23	52	90	66	100	60	90	75	80	77
		28	30	19	23	24	15	29	24	24	25	72	70	81	77	85	71	76	75	
		49.33	21.50	25.50	15.17	29.83	17.67	32.66	24.50	22.78	50.67	78.50	74.50	84.83	70.16	82.33	67.33	75.50	77.22	
±EE	5.27	3.46	3.67	4.85	2.65	1.82	2.34	4.03	1.84	5.27	3.76	3.67	4.89	2.65	1.82	2.34	4.03			
A1vsA3vsA5	(p)	0.222	0.455	0.259	0.119	0.117	0.463	0.583	0.922	0.722	0.222	0.455	0.259	0.119	0.117	0.463	0.583	0.922	0.722	

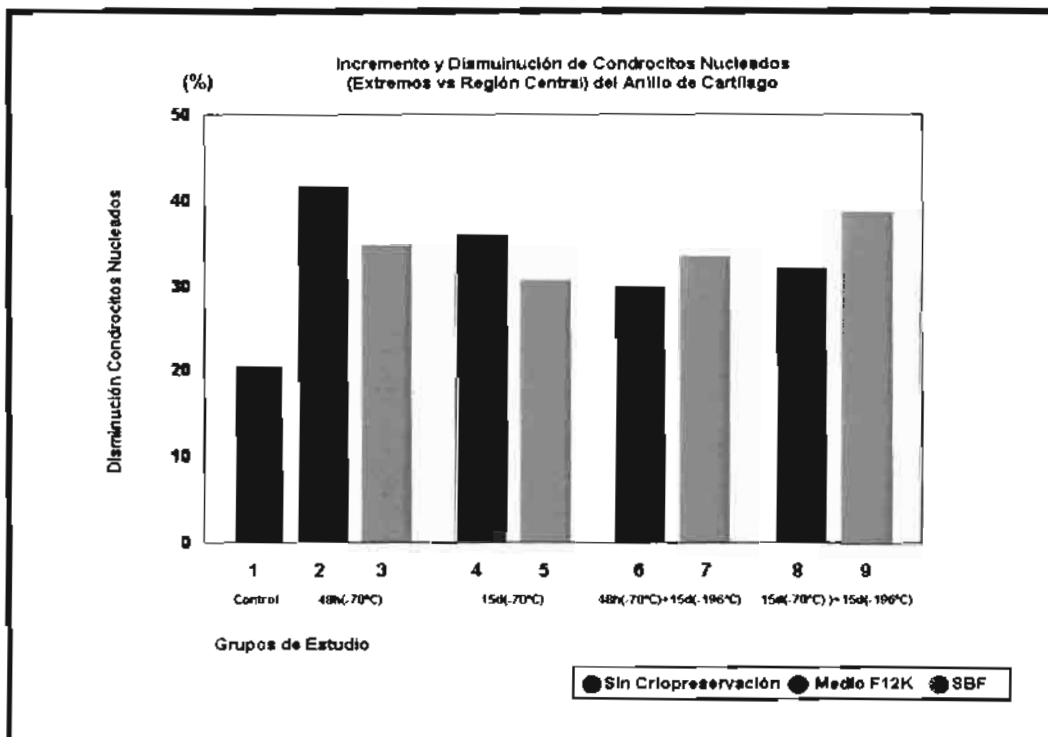
Cuadro 11: Porcentaje de condrocitos nucleados y degeneración celular en la región central de acuerdo con la localización de los anillos de cartilago en el segmento traqueal. (n = 6 anillos A1), (n = 6 anillos A3) y (n = 6 anillos A5) / grupo de estudio. Valores de significancia "p" (A1vsA3vsA5).

Grupo de Estudio	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9									
<b>Región del Anillo</b>																		
																		
<b>Extremos</b>																		
<b>Promedio</b>	69.44	59.83	64.33	46.55	56.77	50.72	67.17	55.66	61.50	30.55	40.16	35.66	53.44	43.22	49.27	32.83	44.33	38.50
<b>±EE</b>	2.39	3.08	3.03	5.16	2.45	4.12	3.17	2.54	2.95	2.39	3.08	3.03	5.16	2.45	4.12	3.17	2.54	2.95
<b>(p)</b>	0.516	0.975	0.000	0.000	0.159	0.003	1.000	0.090	0.752	0.516	0.975	0.000	0.159	0.003	1.000	0.090	0.752	0.000
<b>Región del Anillo</b>																		
																		
<b>Centro</b>																		
<b>Promedio</b>	48.94	18.11	29.55	10.55	26.05	20.77	33.67	23.50	22.77	51.05	81.33	70.44	89.44	73.94	79.22	66.33	76.50	77.22
<b>±EE</b>	3.09	2.10	3.24	1.99	1.37	2.89	1.30	2.16	1.84	3.09	1.96	3.24	1.99	1.37	2.89	1.30	2.16	1.84
<b>(p)</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Cuadro 12: Porcentaje promedio de condrocitos nucleados y degeneración celular en los extremos y en la región central de los anillos de cartilago. (n = 18) anillos / grupo de estudio. Valores de significancia "p" (vs Grupo 1, control "sin criopreservación").



Gráfica 6: Porcentaje de condrocitos nucleados y de degeneración celular en los extremos y en la región central del anillo de cartilago.



Gráfica 7: Porcentaje diferencial de condrocitos nucleados y de degeneración celular en los extremos y en la región central del anillo de cartilago.

## **Resumen, Evaluación Microscópica del Cartílago**

*Independientemente del tratamiento de congelación establecido para cada uno de los tratamientos de acuerdo con el grupo de estudio:*

**a) Estructura:** *La estructura característica del anillo de cartílago traqueal “en forma de herradura” no se modifica por efecto de la criopreservación.*

**b) Captación de colorante:** *La criopreservación de los segmentos traqueales provoca alteraciones en la tinción del cartílago con hematoxilina-eosina, safranina-O y azul alciano caracterizadas tanto por una intensa captación del colorante (cartílago hiperteñido) como por una captación tenue (cartílago débilmente teñido), que al parecer están relacionadas con la solución de criopreservación utilizada y con la localización del anillo en el segmento traqueal.*

*La criopreservación de los segmentos traqueales con medio F12K provoca una intensa captación del colorante en el cartílago, que predomina en los anillos localizados en la región media del segmento traqueal (H&E) y en el extremo superior (Safranina-O y Azul Alciano), contrariamente, el uso de SBF como solución de criopreservación se relaciona con una tenue tinción del cartílago afectando principalmente al anillo localizado en la parte inferior del segmento traqueal (hematoxilina-eosina, safranina-O y azul alciano). Sin embargo, independientemente de la solución de criopreservación utilizada, el mayor número de anillos traqueales que presentaron una tinción basófila normal sin alteraciones en la tinción del cartílago están localizados en el extremo superior del segmento traqueal (proximal al cartílago cricoides y ubicado en la parte superior del crivial mientras que el menor número de anillos traqueales con una tinción basófila normal sin alteraciones corresponde al anillo localizado en el extremo inferior del segmento traqueal (distal al cartílago cricoides y ubicado en la parte inferior del crivial).*

**c) Matrices pericelular, territorial e interterritorial del cartilago:** El uso de SBF como solución de criopreservación y el almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido provocan alteraciones importantes en la tinción de las matrices pericelular, territorial e interterritorial de las células del cartilago.

**d) Degeneración celular:**

El porcentaje de condrocitos nucleados en la región central del anillo de cartilago disminuyó significativamente por efecto de la congelación con lo cual se incrementa el porcentaje de degeneración celular.

### **6.2.2. Epitelio de la mucosa traqueal**

Los anillos traqueales de todos los grupos de estudio, control y con tratamiento de criopreservación presentaron zonas de la mucosa traqueal con epitelio traqueal conservado y sin alteraciones, acompañadas de zonas en las que se observó pérdida de la continuidad del epitelio a la largo de la mucosa caracterizadas por desprendimiento escaso, moderado y severo de las células epiteliales.

Independientemente del tratamiento de criopreservación (solución, tiempo y temperatura) establecido de acuerdo con el grupo de estudio y con respecto al grupo control, los anillos de los segmentos traqueales que fueron sometidos a congelación presentaron zonas considerables de extensión variable con desprendimiento severo del epitelio traqueal y pérdida total del mismo. En ninguno de los grupos de estudio se observaron alteraciones en la tinción del epitelio traqueal (Figura 32).

### **6.2.3. Glándulas traqueales**

En los anillos traqueales del grupo control, que no fueron sometidos a ningún tratamiento de criopreservación las glándulas se observaron conservadas, sin alteraciones en la tinción o en la integridad estructural.

En el resto de los grupos de estudio y sin importar el tratamiento de criopreservación (solución, tiempo y temperatura), las glándulas se observaron dilatadas, con pérdida de la integridad estructural, desprendimiento de células epiteliales y alteraciones en la tinción (Figura 33).

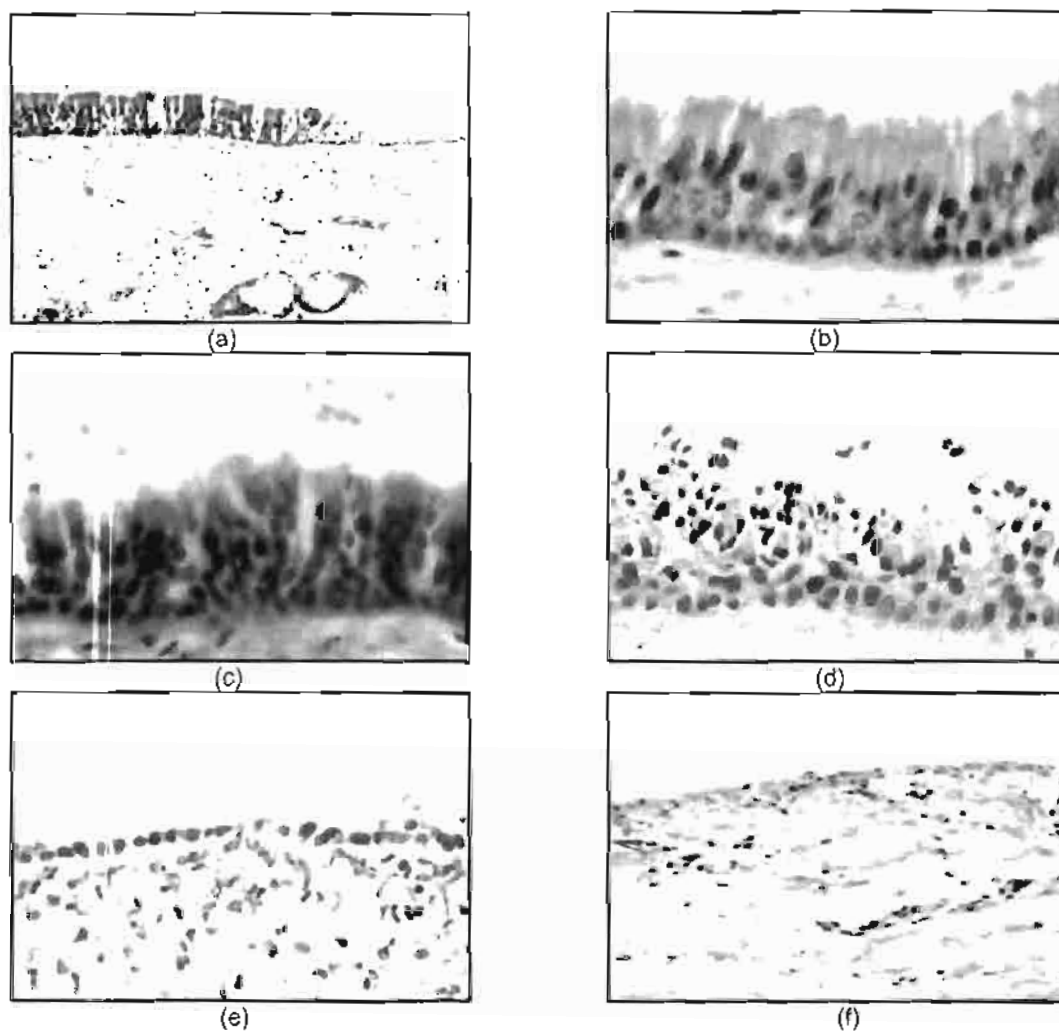


Figura 32.- Evaluación histológica del epitelio. En todos los grupos de estudio, control y con tratamiento de criopreservación presentaron desde epitelio de la mucosa traqueal conservado hasta pérdida total del mismo como se observa en la panorámica 10X (a). En el resto de las fotografías (40X) se observa; epitelio traqueal conservado sin alteraciones (b), epitelio traqueal conservado con escaso desprendimiento de células epiteliales (c), desprendimiento moderado de las células epiteliales (d), desprendimiento severo del epitelio traqueal (e) y pérdida total del epitelio (f).

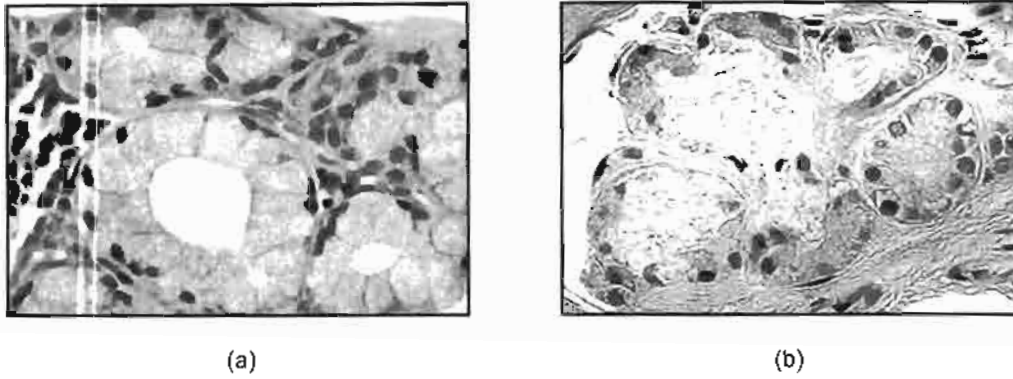


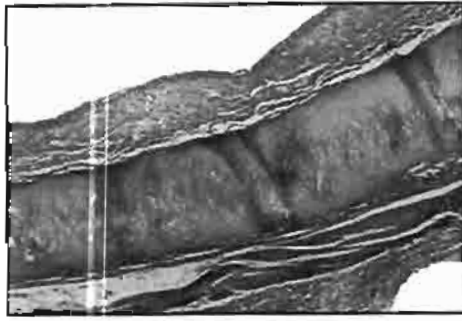
Figura 33: Evaluación histológica de las glándulas traqueales (H&E, 40X). Glándulas sin alteraciones en los segmentos traqueales del grupo control (a). Franca pérdida de la integridad estructural en las glándulas de los segmentos traqueales de los grupos de estudio 2 al 9 sin importar el tratamiento de criopreservación (b).

#### **6.2.4. Fibras de colágena y de músculo liso**

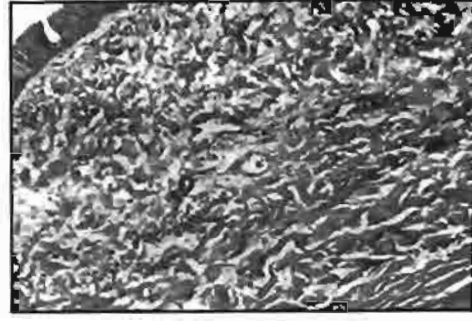
A la tinción tricrómica de Masson (Figura 34), en los anillos traqueales de todos los grupos de estudio, control y con tratamiento de criopreservación, las fibras de colágena ubicadas tanto en la submucosa traqueal como entre el pericondrio y la adventicia, al igual que las de músculo liso se observaron conservadas, ordenadas, alineadas y sin alteraciones en la tinción.

Los anillos traqueales de todos los grupos de estudio, incluyendo los del grupo control, presentaron desprendimiento evidente de las fibras de colágena y de músculo liso a lo largo del pericondrio y entre las mismas. En el caso de las fibras de colágena, esto ocurrió en ambos lados del cartílago.

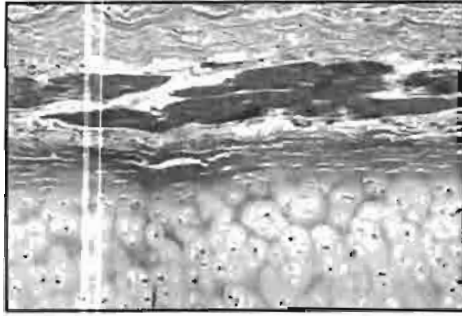




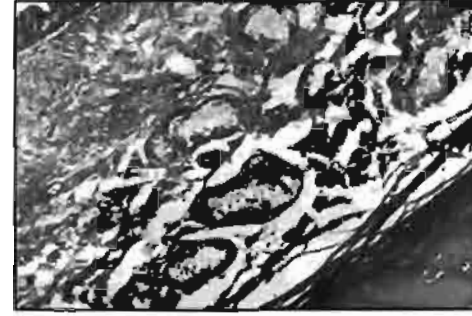
(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 34. Fibras de colágena y de músculo liso (a). Fibras de colágena en la submucosa traqueal (b). Fibras de colágena y de músculo liso proximales a la adventicia (c). Desprendimiento evidente de las fibras de colágena y de músculo liso a lo largo del pericondrio (d,e). Desprendimiento entre las fibras de colágena y de músculo liso (f).

**Resumen, Evaluación Microscópica del Epitelio, glándulas traqueales, fibras de colágena y músculo liso.** Independientemente del tratamiento de congelación establecido para cada uno de los tratamientos de acuerdo con el grupo de estudio: La criopreservación provoca exfoliación del epitelio de la submucosa traqueal y destrucción de las glándulas traqueales sin afectar las fibras de colágena y de músculo liso.

### **6.3. Expresión de Caspasa-3**

#### **6.3.1. Cartilago traqueal**

La densidad celular positiva para caspasa-3 en el cartilago [número de condrocitos que expresaron caspasa-3 (n) / área del cartilago (mm<sup>2</sup>)] para cada uno de los 18 anillos con base en la localización del anillo en el segmento traqueal [6 anillos del extremo superior, proximales al cartilago cricoides (A1), 6 anillos intermedios (A3) y 6 anillos del extremo inferior, distales al cartilago cricoides (A5)] de todos los grupos de estudio se muestra en el cuadro 13. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la densidad celular positiva para caspasa-3 en el cartilago de acuerdo con la localización del anillo en el segmento traqueal [Anillo del extremo superior (A1) vs Anillo medio (A3):  $p=0.994$ , Anillo del extremo superior (A1) vs Anillo del extremo inferior (A5):  $p=0.962$ , Anillo medio (A3) vs Anillo del extremo inferior (A5):  $p=0.926$ ].

La densidad celular positiva para caspasa-3 en el cartilago de los 18 anillos traqueales sin importar la localización en el segmento traqueal, correspondientes a cada uno de los grupos de estudio 1 al 9 consecutivamente fue: G1 ( $0.163\pm 0.097$ ), G2 ( $0.150\pm 0.074$ ), G3 ( $0.109\pm 0.061$ ), G4 ( $0.314\pm 0.101$ ), G5 ( $0.039\pm 0.029$ ), G6 ( $0.155\pm 0.062$ ), G7 ( $0.000\pm 0.000$ ), G8 ( $0.014\pm 0.014$ ) y G9 ( $0.010\pm 0.007$ ). Aunque en los grupos de estudio 2, 4, 6 y 8 en los que los segmentos traqueales fueron criopreservados utilizando medio F12K, la densidad celular positiva para caspasa-3 en el cartilago fue mayor que la encontrada en los grupos de estudio 1, 3, 5 y 7 en los que se utilizó SBF como solución de criopreservación, ésta no se modificó

significativamente con respecto a la encontrada en el grupo control [Grupo 1 vs: Grupo 2 ( $p=0.000$ ), Grupo 3 ( $p=0.999$ ), Grupo 4 ( $p=0.724$ ), Grupo 5 ( $p=0.899$ ), Grupo 6 ( $p=1.000$ ), Grupo 7 ( $p=0.632$ ), Grupo 8 ( $p=0.742$ ) y Grupo 9 ( $p=0.711$ )], no presentó diferencias importantes cuando se incrementó el tiempo de congelación de 48 horas a 15 días y disminuyó por efecto del almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido.

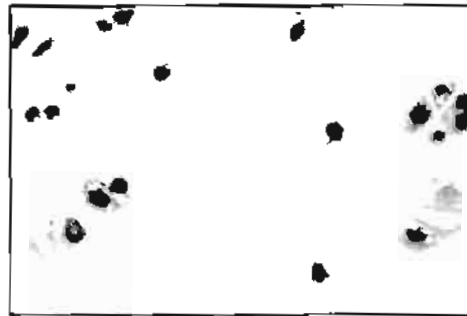
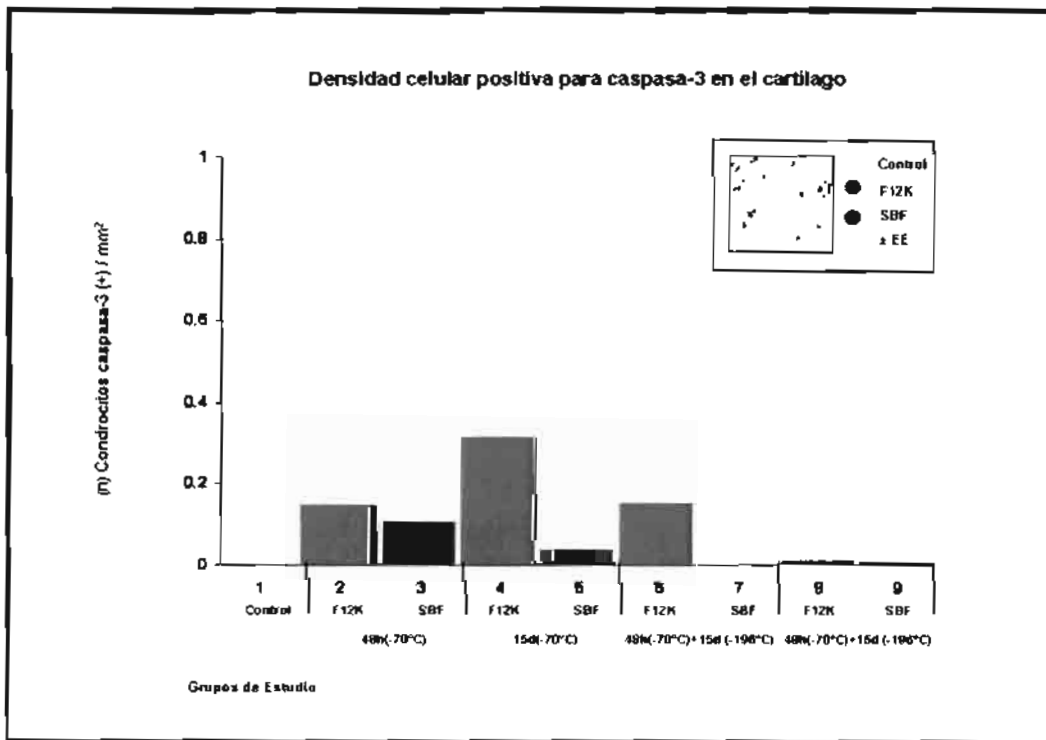


Figura 35: Expresión de caspasa-3 en el cartilago traqueal [(40X), Aminoetilcarbazol-Hematoxilina]. Condrocitos con expresión positiva de caspasa-3 (células color marrón).



Gráfica 8: Densidad positiva para caspasa 3 ( $n/mm^2$ ).

Grupo de Estudio	Segmento Traqueal	Condrocitos Caspasa-3 (+) (n)	Area del Cartilago (mm <sup>2</sup> )	Densidad Celular (+) (n/mm <sup>2</sup> )	Condrocitos Caspasa-3 (+) (n)	Area del Cartilago (mm <sup>2</sup> )	Densidad Celular (+) (n/mm <sup>2</sup> )	Condrocitos Caspasa-3 (+) (n)	Area del Cartilago (mm <sup>2</sup> )	Densidad Celular (+) (n/mm <sup>2</sup> )
		A1	A1	A1	A3	A3	A3	A5	A5	A5
G1 Control Sin Cnopreservación	1	0.000	137.73	0.000	0.000	192.63	0.000	0.000	253.61	0.000
	2	246.000	606.67	0.405	661.000	389.54	1.697	0.000	417.65	0.000
	3	184.000	401.21	0.459	10.000	409.10	0.024	141.000	392.01	0.360
	4	0.000	106.18	0.000	0.000	156.80	0.000	0.000	116.53	0.000
	5	0.000	150.55	0.000	0.000	170.28	0.000	0.000	118.01	0.000
	6	0.000	599.11	0.000	0.000	544.21	0.000	0.000	661.07	0.000
G2 48h (-70°C) F12K	1	38.000	224.03	0.170	0.000	125.41	0.000	142.000	225.67	0.629
	2	236.000	211.70	1.115	0.000	210.55	0.000	157.000	235.04	0.668
	3	0.000	184.91	0.000	0.000	112.91	0.000	16.000	326.92	0.049
	4	0.000	281.39	0.000	0.000	252.46	0.000	0.000	380.34	0.000
	5	11.000	369.82	0.030	0.000	235.70	0.000	0.000	340.40	0.000
	6	0.000	429.15	0.000	14.000	301.61	0.046	0.000	499.83	0.000
G3 48h (-70°C) SBF	1	144.000	375.90	0.383	223.000	214.16	1.041	0.000	162.39	0.000
	2	0.000	261.17	0.000	0.000	211.20	0.000	0.000	243.91	0.000
	3	0.000	224.85	0.000	64.000	193.29	0.331	0.000	151.87	0.000
	4	20.000	219.09	0.091	0.000	127.05	0.000	0.000	310.15	0.000
	5	0.000	186.22	0.000	57.000	458.41	0.124	0.000	413.54	0.000
	6	0.000	217.62	0.000	0.000	371.30	0.000	0.000	105.35	0.000
G4 15d (-70°C) F12K	1	27.000	299.80	0.090	0.000	173.89	0.000	0.000	170.28	0.000
	2	80.000	276.79	0.289	0.000	260.68	0.000	28.000	298.15	0.094
	3	95.000	206.44	0.460	218.000	203.81	1.070	129.000	243.36	0.530
	4	0.000	291.42	0.000	0.000	152.69	0.000	0.000	225.18	0.000
	5	157.000	274.98	0.571	0.000	301.28	0.000	0.000	217.62	0.000
	6	136.000	116.80	1.164	21.000	125.08	0.168	180.000	145.95	1.233
G5 15d (-70°C) SBF	1	0.000	369.00	0.000	88.000	177.84	0.495	0.000	258.59	0.000
	2	0.000	226.66	0.000	0.000	204.96	0.000	0.000	175.87	0.000
	3	62.000	278.92	0.222	0.000	334.81	0.000	0.000	413.03	0.000
	4	0.000	398.09	0.000	0.000	217.45	0.000	0.000	419.29	0.000
	5	0.000	438.69	0.000	0.000	506.90	0.000	0.000	445.92	0.000
	6	0.000	211.46	0.000	0.000	228.79	0.000	0.000	596.31	0.000
G6 48h (-70°C) + 15d (196°) F12K	1	14.000	132.14	0.106	117.000	151.70	0.771	74.000	165.02	0.448
	2	0.000	121.63	0.000	0.000	225.34	0.000	133.000	179.48	0.741
	3	0.000	115.87	0.000	45.000	121.13	0.372	0.000	177.35	0.000
	4	0.000	127.54	0.000	0.000	145.95	0.000	0.000	202.99	0.000
	5	0.000	155.81	0.000	0.000	174.39	0.000	0.000	197.40	0.000
	6	138.000	385.27	0.358	0.000	251.31	0.000	0.000	287.31	0.000
G7 48h (-70°C) + 15d (196°) SBF	1	0.000	347.63	0.000	0.000	343.52	0.000	0.000	463.18	0.000
	2	0.000	341.05	0.000	0.000	651.87	0.000	0.000	385.43	0.000
	3	0.000	569.03	0.000	0.000	295.03	0.000	0.000	401.38	0.000
	4	0.000	659.72	0.000	0.000	616.86	0.000	0.000	707.59	0.000
	5	0.000	518.73	0.000	0.000	567.55	0.000	0.000	601.90	0.000
	6	0.000	255.58	0.000	0.000	245.93	0.000	0.000	433.43	0.000
G8 15d (-70°C) + 15d (196°) F12K	1	0.000	84.81	0.000	0.000	140.20	0.000	28.000	105.19	0.266
	2	0.000	125.90	0.000	0.000	118.01	0.000	0.000	201.34	0.000
	3	0.000	79.71	0.000	0.000	101.08	0.000	0.000	168.47	0.000
	4	0.000	295.85	0.000	0.000	370.47	0.000	0.000	347.30	0.000
	5	0.000	204.30	0.000	0.000	202.49	0.000	0.000	177.84	0.000
	6	0.000	260.02	0.000	0.000	248.02	0.000	0.000	275.80	0.000
G9 15d (-70°C) + 15d (196°) SBF	1	0.000	298.65	0.000	0.000	279.23	0.000	0.000	230.27	0.000
	2	1.000	467.94	0.002	41.000	300.62	0.136	18.000	364.72	0.049
	3	0.000	477.97	0.000	0.000	337.44	0.000	0.000	301.93	0.000
	4	0.000	305.88	0.000	0.000	237.34	0.000	0.000	327.44	0.000
	5	0.000	217.29	0.000	0.000	310.81	0.000	0.000	254.27	0.000
	6	0.000	362.09	0.000	0.000	302.59	0.000	0.000	290.43	0.000

Cuadro 13: Número de condrocitos con expresión de caspasa-3 en el cartilago (n), área del cartilago (mm<sup>2</sup>) y densidad celular positiva para caspasa-3 (n/mm<sup>2</sup>) correspondientes a los tres anillos de los seis segmentos traqueales de todos los grupos de estudio

Grupos de Estudio	Condiciones experimentales del tratamiento de criopreservación	(n)	Condrocitos caspasa 3 (+) (n/mm <sup>2</sup> )	± EE
1	Control	18	0.163	0.097
2	48h (-70°) F12K	18	0.150	0.074
3	48h (-70°) SBF	18	0.109	0.061
4	15d (-70°) F12K	18	0.314	0.101
5	15d (-70°) SBF	18	0.039	0.029
6	48h (-70°) + 15d (NL) F12K	18	0.155	0.062
7	48h (-70°) + 15d (NL) SBF	18	0.000	0.000
8	15d (-70°) + 15d (NL) F12K	18	0.014	0.014
9	15d (-70°) + 15d (NL) SBF	18	0.010	0.007

Cuadro 14: Densidad positiva para caspasa 3 (n/mm<sup>2</sup>).

### 6.3.2. Epitelio traqueal

En los 18 anillos (100%) correspondientes a los seis segmentos traqueales del grupo control sin criopreservación, se observaron sin importar la extensión, zonas del epitelio de la mucosa traqueal: a) sin expresión de caspasa-3, b) con expresión de caspasa-3 en células epiteliales escasas y alternas, c) con expresión de caspasa-3 en células basales continuas y d) con expresión de caspasa-3 en la mayoría de las células epiteliales (Figura 36).

Cuando se utilizó medio F12K como solución de criopreservación, el porcentaje de anillos que presentaron células epiteliales con expresión de caspasa-3 fue: (55.55%) en el grupo 2, (77.77%) en el grupo 4 y (11.11%) en el grupo 6 y (0%) en el grupo 8. Los anillos de los segmentos traqueales de los grupos de estudio 3, 5, 7 y 9 que fueron criopreservados utilizando suero bovino fetal como solución de criopreservación, no presentaron células con expresión de caspasa-3 en el epitelio de la mucosa traqueal (Gráfica 9, Figura 37).

La expresión de caspasa-3 en las células del epitelio de la mucosa traqueal disminuyó significativamente por efecto de la temperatura de congelación ( $p < 0.01$ ) y

de la solución de criopreservación ( $p < 0.01$ ) sin importar el tiempo de congelación ( $p = 0.08$ ).

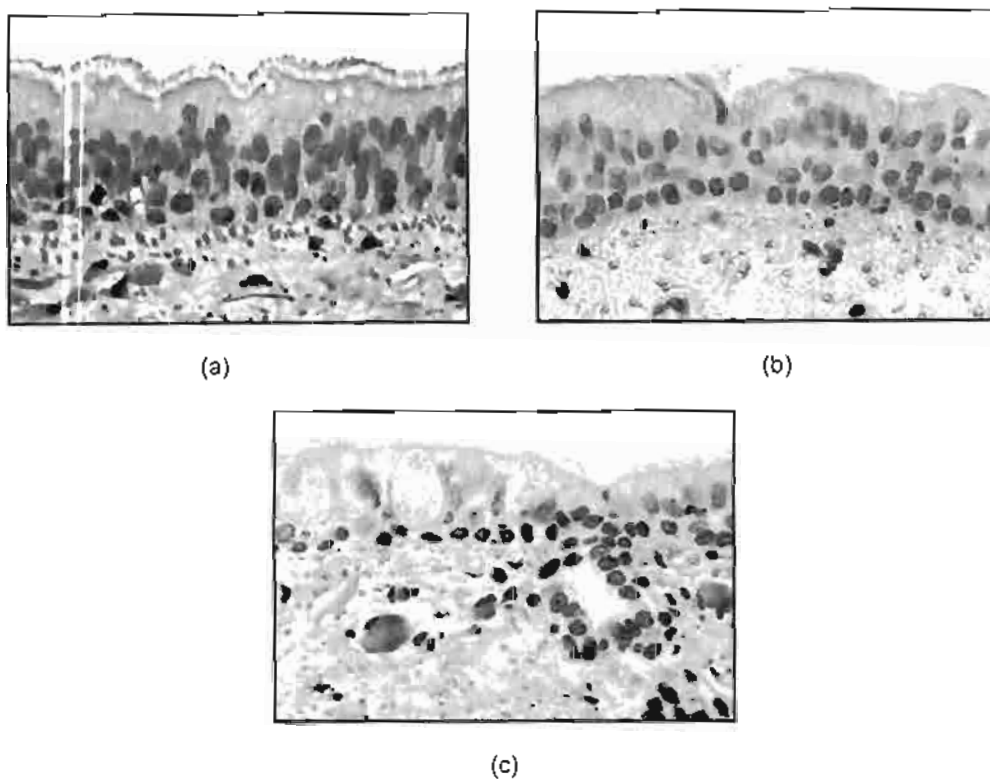


Figura 36: Expresión de caspasa-3 en las células epiteliales de la mucosa traqueal del grupo 1, control sin criopreservación: Expresión de caspasa-3 en: a) células epiteliales escasas y alternas, b) células epiteliales principalmente basales y c) en la mayoría de las células epiteliales. (40X, Aminoetilcarbazol-Hematoxilina).

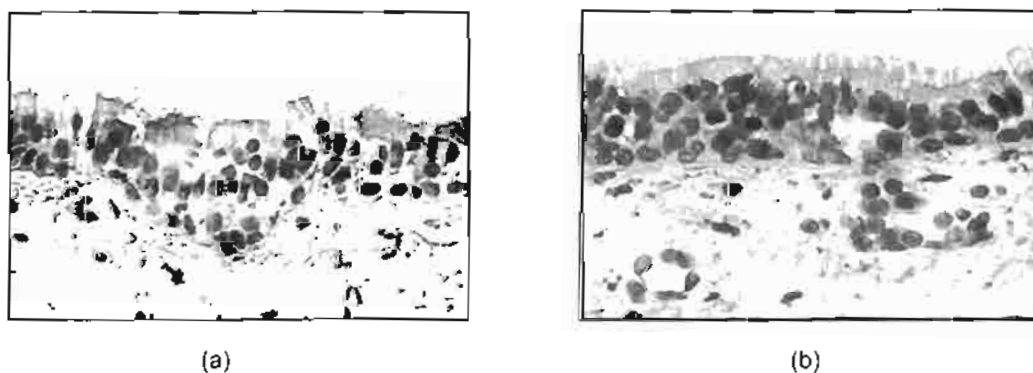
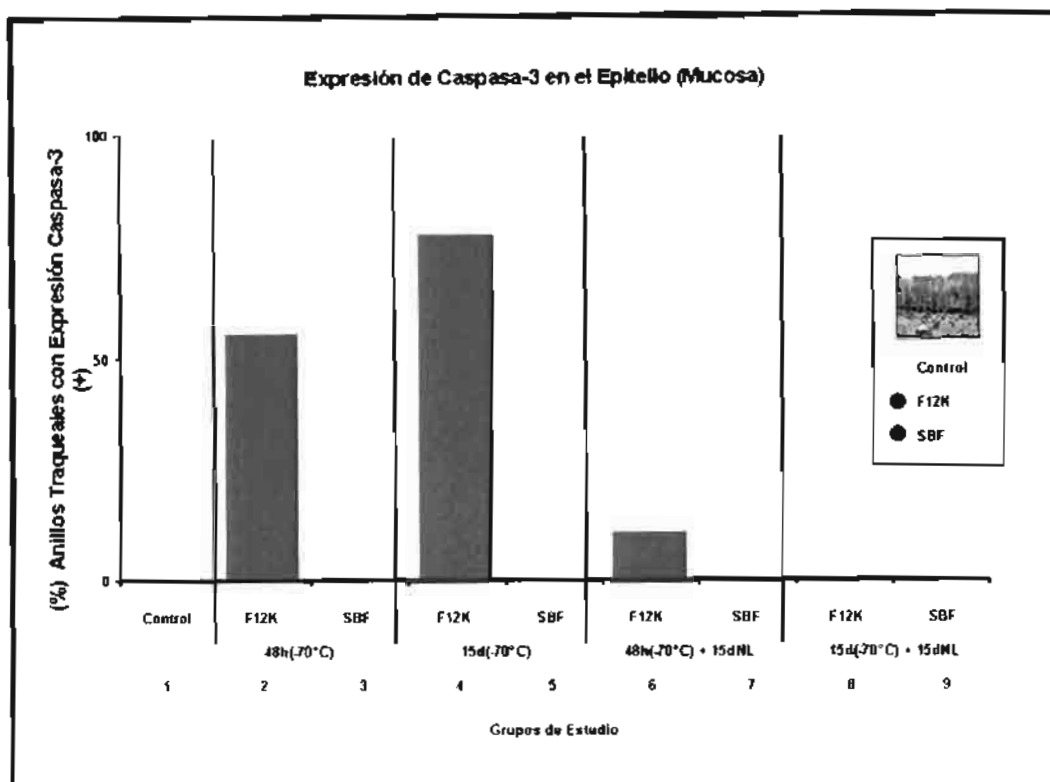


Figura 37: Expresión de caspasa-3 en el epitelio de la mucosa traqueal. Criopreservación con medio F12K (a). Criopreservación con SBF (b). (40X, Aminoetilcarbazol-Hematoxilina).



Gráfica 9: Expresión de caspasa-3 en el epitelio de la mucosa traqueal.

### 6.3.3. Glándulas Traqueales

La expresión de caspasa-3 en las glándulas traqueales de los 18 anillos (100%) correspondientes a los seis segmentos traqueales del grupo control sin criopreservación, incluyó cuatro patrones definidos que se clasificaron básicamente en: a) semilunas y células del epitelio sin expresión de caspasa-3, b) expresión de caspasa-3 en las semilunas de las glándulas, sin compromiso epitelial, c) caspasa-3 en las semilunas de las glándulas con compromiso epitelial moderado y d) caspasa-3 en las semilunas de las glándulas con compromiso epitelial severo (Figura 38).

Cuando se utilizó medio F12K como solución de criopreservación, el porcentaje de los anillos que presentaron expresión de caspasa-3 fue (83.33%) en el grupo 2, (72.22%) en el grupo 4, (22.22%) en el grupo 6 y (16.66%) en el grupo 8. En las glándulas de los anillos traqueales de los grupos de estudio 3, 5, 7 y 9 en los que se

utilizó suero bovino fetal como solución de criopreservación, no se observó la expresión de caspasa 3 (Gráfica 10, Figura 39). La expresión de caspasa-3 en las glándulas traqueales disminuyó significativamente por efecto de la temperatura de congelación ( $p < 0.01$ ) y de la solución de criopreservación ( $p < 0.01$ ) sin importar el tiempo de congelación ( $p = 0.08$ ).

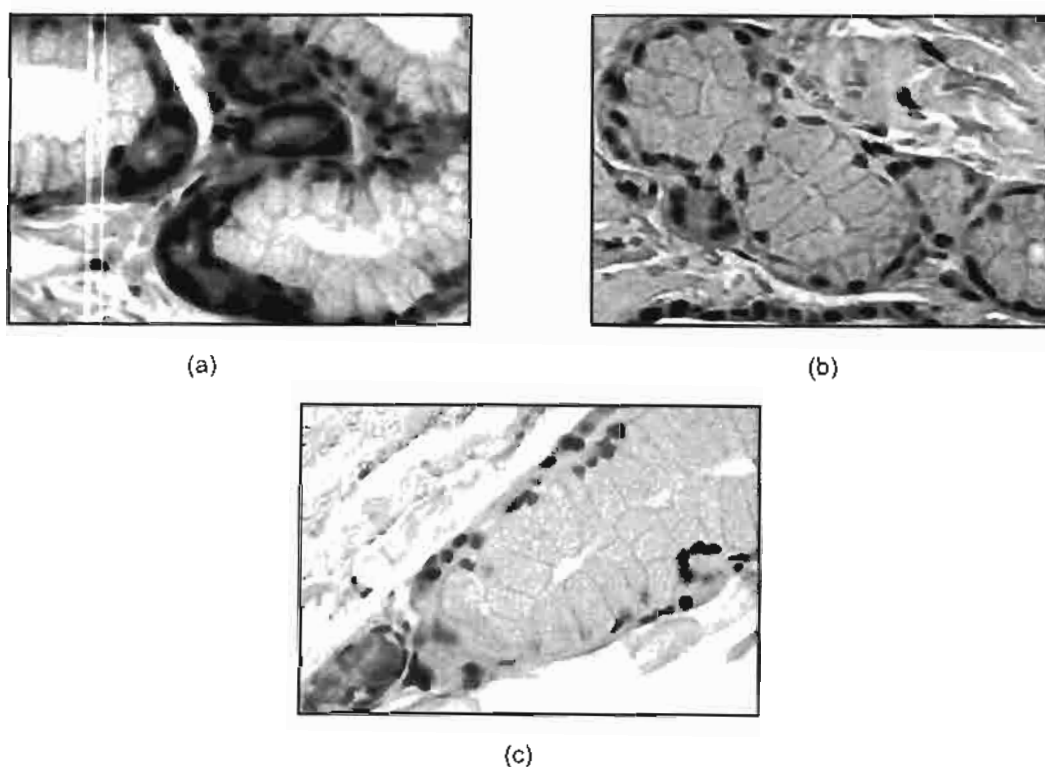


Figura 38: Expresión de caspasa-3 en las glándulas traqueales del grupo 1, control sin criopreservación. Expresión de caspasa-3 en los vértices semilunares sin compromiso epitelial (a), con compromiso epitelial moderado (b) y con compromiso epitelial severo (c). (Aminoetilcarbazol-Hematoxilina, 40X).



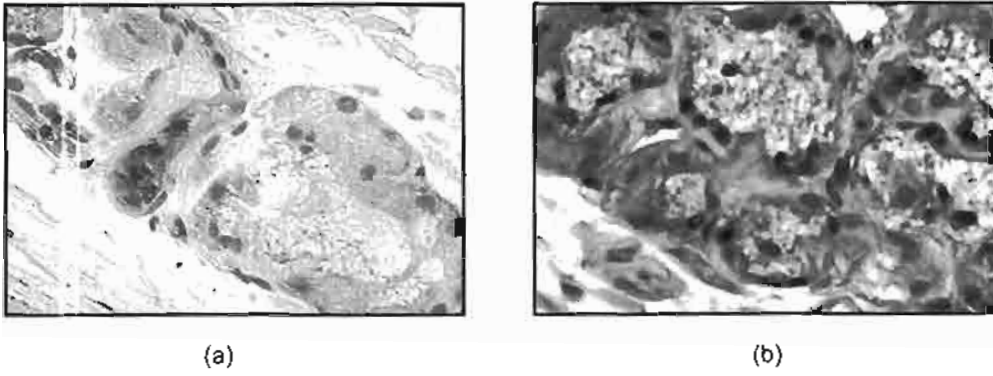
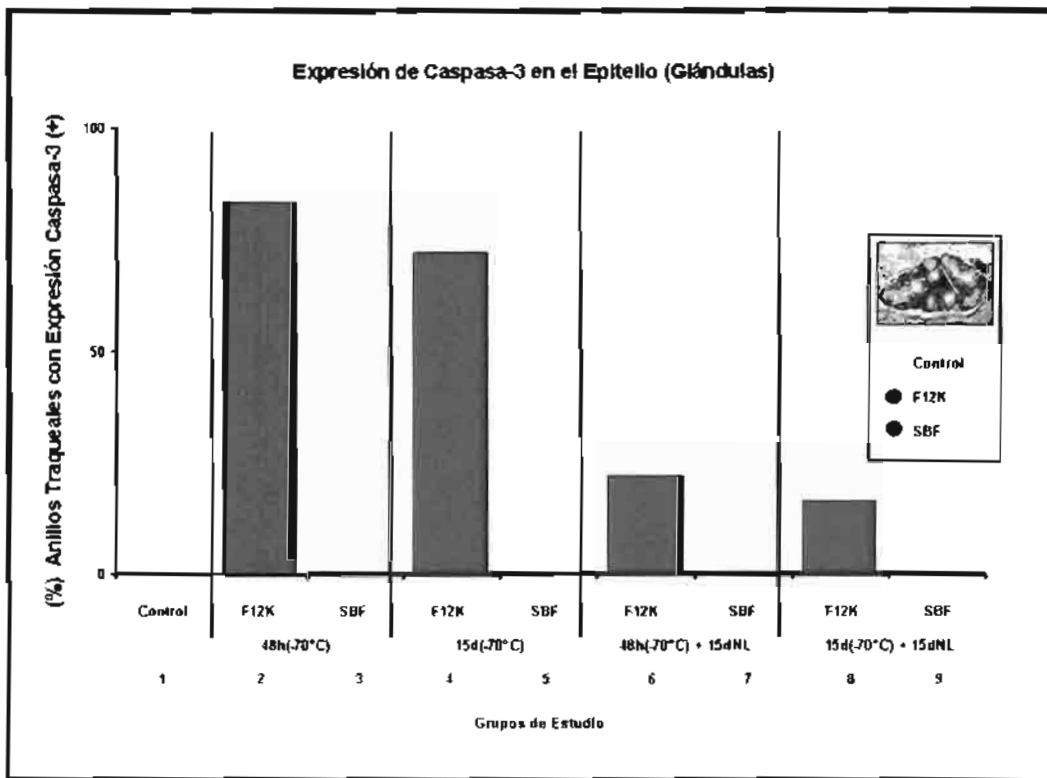


Figura 38: Expresión de caspasa-3 en las glándulas traqueales. Criopreservación con medio F12K (a). Criopreservación con SBF (b). (Aminoetilcarbazol-Hematoxilina, 40X).



Gráfica 10: Expresión de caspasa-3 en las glándulas traqueales.

### **Resumen, Evaluación de la Expresión de Caspasa-3**

**a) Cartilago:** Aunque con respecto al grupo control, la expresión de caspasa-3 en el cartilago no se modifica significativamente por efecto de la criopreservación ni por la localización del anillo en el segmento traqueal, ésta disminuye de manera importante por el uso de SBF como solución de criopreservación y por el almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido.

**b) Epitelio y Glándulas Traqueales:** Independientemente del tratamiento de congelación establecido para cada uno de los tratamientos de acuerdo con el grupo de estudio: La expresión de caspasa-3 en el epitelio de la submucosa y en las glándulas traqueales disminuye por efecto de la criopreservación con medio F12K y se inhibe completamente por el uso de SBF como solución de criopreservación y por el almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido.

## **7.- DISCUSION**

El objetivo de este trabajo radicó en investigar el efecto que ejerce la congelación sobre la integridad estructural del tejido traqueal tratado bajo cuatro esquemas de criopreservación diferenciados por el tipo de solución, por la temperatura de congelación y por el tiempo de preservación, proponiendo como hipótesis que las alteraciones macroscópicas, microscópicas y en la expresión de caspasa-3 que ocurren en el tejido traqueal por efecto de la criopreservación derivan principalmente de las variables tiempo y temperatura más que de la solución de criopreservación utilizada.

### **a) Hallazgos en el Cartilago:**

Contrariamente a la hipótesis propuesta, los resultados indican que las alteraciones microscópicas en el cartilago traqueal, dependen, principalmente de la solución y de la temperatura de criopreservación más que del tiempo y de la temperatura de congelación.

Bajo las condiciones experimentales establecidas en este proyecto, la criopreservación provocó: 1) alteraciones en la tinción gruesa del cartilago que parecen estar relacionadas con la solución utilizada y con la localización del anillo en el segmento traqueal. En las tinciones del tejido traqueal con hematoxilina-Eosina, Safranina-O y Azul Alciano, el cartilago muestra una intensa afinidad por los colorantes cuando se utiliza medio F12K como solución de criopreservación, mientras que el cartilago traqueal criopreservado con SBF se caracteriza por una tinción tenue. Independientemente de la solución utilizada para criopreservar los segmentos traqueales, el mayor número de anillos traqueales sin alteraciones en la tinción basófila del cartilago corresponde al anillo localizado en el extremo superior del segmento traqueal (proximal al cartilago cricoides y ubicado en la parte superior del crivial) y de manera inversa, el menor número de anillos traqueales con una tinción basófila normal sin alteraciones corresponde al anillo localizado en el extremo inferior del segmento traqueal (distal al cartilago cricoides y ubicado en la parte inferior del crivial), 2) alteraciones más evidentes en la tinción de las matrices pericelular, territorial e interterritorial del cartilago parecen estar ocasionadas por el uso de suero bovino fetal como solución de criopreservación aunado al almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido y 3) una disminución significativa en el número de condrocitos nucleados en la región central del anillo de cartilago y 4) una disminución significativa en la expresión de caspasa-3 por efecto del suero bovino fetal y del almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido.

De acuerdo con la literatura y sin importar las condiciones de congelación para segmentos traqueales referidas por los diferentes autores, después de la criopreservación, el tejido cartilaginoso se mantiene viable y con la matriz cartilaginosa intacta (2). Sin embargo, los diseños experimentales de criopreservación para segmentos traqueales reportados hasta la fecha refieren, que una vez transcurrido el tiempo de congelación y en forma previa a la reconstrucción y con ayuda de bisturí, se separa uno de los anillos del segmento traqueal

criopreservado y es sometido a una evaluación histológica que tradicionalmente se basa únicamente en la presencia de condrocitos nucleados (2,9,11,21,24). Las alteraciones observadas en la tinción del cartílago criopreservado parecen indicar una exposición aumentada (hipertinción) o disminuída (tinción tenue) 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.

Independientemente del tratamiento de criopreservación, el mayor porcentaje de condrocitos nucleados en el cartílago traqueal se ubica en los extremos y disminuye significativamente en la región central del anillo, esta región está visiblemente caracterizada por una degeneración celular, lo que sugiere 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. Está reportado (76,77) 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 (76) 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 (77).

Aunque la criopreservación modifica la viabilidad y la proliferación celular, el uso de dimetil sulfóxido al 10% favorece la viabilidad en el cartílago (78-80) y la toxicidad celular ocasionada por el uso de dimetilsulfóxido como agente crioprotector parece

estar relacionada con el tiempo y de la temperatura de criopreservación (81). En este protocolo, las dos soluciones de criopreservación utilizadas se suplementaron con dimetilsulfóxido al 10%. La concentración de suero bovino fetal en las soluciones de preservación parece jugar un papel importante en la preservación del cartilago. Concentraciones de suero bovino fetal entre 1 y 30% estimulan el crecimiento de condrocitos articulares en medio F12K con desarrollo óptimo cuando el medio está suplementado con 10% de suero bovino fetal (82). Injertos osteocondrales preservados durante 28 días a 4°C en medios nutrientes suplementados con 10% de suero bovino fetal, mantienen la síntesis de proteoglicanos y mayor viabilidad que los preservados sin la adición de suero bovino fetal (83). Al parecer, el suero bovino fetal es una fuente potencial de factores inmunogénicos (83-84) que puede generar respuestas no fisiológicas en los cultivos de condrocitos (85). Condrocitos articulares cultivados en soluciones adicionadas con suero bovino fetal, presentan una disminución significativa en la viabilidad, en la proliferación y en la diferenciación celular (84-86); pérdida de la información génica del cartilago (84), alteraciones en los marcadores condrogénicos y en la expresión de metaloproteinasas, sin reestablecimiento de la matriz cartilaginosa en comparación con condrocitos cultivados en soluciones adicionadas con suero autólogo ó libres de suero bovino fetal (85-87). En este trabajo, la expresión de caspasa-3 en el cartilago fue menor cuando los segmentos traqueales se almacenaron en nitrógeno líquido y se utilizó suero bovino fetal al 90% como solución de criopreservación, lo que puede explicarse por el efecto deletéreo que ejerce el suero bovino fetal sobre la viabilidad celular remanente el tejido cartilaginoso después de los procesos de procuración, criopreservación y descongelación.

#### ***b) Hallazgos en el Epitelio y Glándulas Traqueales:***

Independientemente del tratamiento de congelación, la criopreservación provocó: a) exfoliación del epitelio de la submucosa traqueal, b) destrucción de las glándulas traqueales y c) contrariamente a la hipótesis planteada, una disminución en la expresión de caspasa-3 por efecto de la solución de criopreservación y del

almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido. Al parecer, la criopreservación ejerce un efecto inmunomodulatorio sobre la antigenicidad del segmento traqueal utilizado en la reconstrucción atribuible al desprendimiento de las células epiteliales como consecuencia de los procesos de congelación y descongelación (2). 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 (2,17). En este trabajo, sin importar el esquema de congelación, la criopreservación ocasionó pérdida de la estructura glandular, desprendimiento del epitelio de la mucosa traqueal y una disminución en la expresión de caspasa-3, hallazgos que pueden atribuirse a una disminución en la viabilidad celular como consecuencia los procesos de congelación y descongelación inherentes al proceso de criopreservación.

## **8.- CONCLUSIONES**

Con base en que: 1) Con ninguno de los tratamientos de criopreservación para segmentos traqueales establecidos en este proyecto se modifica la integridad estructural aparente de los segmentos traqueales, de la estructura característica del anillo de cartílago traqueal "en forma de herradura, de las fibras de colágena y del músculo liso,

2) Independientemente del tiempo y de la temperatura de congelación, la criopreservación de segmentos traqueales provoca: a) alteraciones en la tinción gruesa del cartílago que parecen estar relacionadas con la solución de criopreservación utilizada y con la localización del anillo en el segmento traqueal, b) una disminución en el porcentaje de condrocitos nucleados ubicados en la región central del anillo de cartílago, c) exfoliación del epitelio de la submucosa traqueal y d) destrucción de las glándulas traqueales y

3) El uso de SBF como solución de criopreservación y aunado al almacenamiento de

los segmentos traqueales en nitrógeno líquido genera: a) alteraciones importantes en la tinción de las matrices pericelular, territorial e interterritorial de las células del cartilago y b) una disminución en la expresión de caspasa-3 en el cartilago, en el epitelio de la submucosa y en las glándulas traqueales, se concluye que:

1) Las alteraciones en la tinción del cartilago criopreservado sugieren la ocurrencia de eventos bioquímicos, degenerativos en los componentes de la matriz del cartilago capaces de remodelar la consistencia del mismo,

2) Los anillos localizados en el extremo inferior del segmento traqueal criopreservado y los condrocitos ubicados en la región central del anillo de cartilago son más susceptibles al daño ocasionado por la criopreservación,

3) El uso de suero bovino fetal como solución de criopreservación aunado al almacenamiento de los segmentos traqueales en nitrógeno líquido ocasiona cambios severos en la integridad de las matrices pericelular, territorial e interterritorial del cartilago, estas mismas condiciones de criopreservación parecen estar relacionadas con una disminución en la expresión caspasa-3 en el tejido traqueal, hallazgos que sugieren que la expresión de caspasa-3 en el cartilago no refleja el daño ocasionado en el cartilago por efecto de la criopreservación,

4) Contrariamente a la hipótesis propuesta, las alteraciones microscópicas y en la expresión de caspasa-3 que ocurren en el tejido traqueal por efecto de la criopreservación son ocasionadas por efecto de la solución y de la temperatura de congelación.

## 9.- REFERENCIAS

- 1.- Jaime Villalba Caloca. Respuesta Tisular del Aoinjerto Traqueal Liofilizado y Criopreservado Combinado con Terapia de Inmunosupresión y Aplicación Tópica del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular. Tesis Doctoral. Escuela Superior de Medicina. Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. 2007.
- 2.- Sotres-Vega A, Villalba-Caloca J, Jasso-Victoria R, Olmos-Zúñiga JR, Gaxiola-Gaxiola M, Baltazares-Lipp M, Santibañez-Salgado A, Santillán-Doherty P. Cryopreserved Tracheal Grafts: A Review of the Literature. *J Invest Surg* 2006;19(2):129-135.
- 3.- Murakawa T, Nakajima J, Motomura N, Murakami A, Takamoto S. Successful Allograft Transplantation of Cryopreserved Tracheal Grafts with Preservation of the Pars Membranacea in Nonhuman Primates. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 2002;123:153-160.
- 4.- Tanaka H, Maeda K, Okita Y. Transplantation of the Cryopreserved Allograft in Growing Rabbits. *J Pediatric Surg* 2003;38:1707-11.
- 5.- Lenot B, Macchiarini P, Dulmet E, Weiss M, Dartevielle P. Tracheal Allograft Replacement. An Unsuccessful Method. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993;7:648-652.
- 6.- Zhao H, Hua TC, Zhou YZ, Wang QF, Yang Y, Bao LL. Cryopreservation and Transplantation of Dog Trachea. *Ann NY Acad Sci* 1998;118:270-275.
- 7.- Messineo A, Filler RM, Bahoric A, Smith CR. Repair of Long Tracheal Defects with Cryopreserved Cartilaginous Allografts. *J Pediatric Surg* 1992;27:1131-4;discussion 1134-5.
- 8.- Moriyama H, Sasajima T, Hirata S, Yamazaki K, Yatsuyanagi E, Kubo Y. Revascularization of Canine Cryopreserved Tracheal Allografts. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1701-6.
- 9.- Tojo T, Niwaya K, Sawabata N, Nezu K, Kawachi K, Kitamura S. Tracheal Allogeneic Immunoresponse is Reduced by Cryopreservation: Canine Experiment. *Transplantation Proc* 1996 ;28(3):1814-1815.
- 10.- Deschamps C, Trastek VF, Ferguson JL, Martin WJ, Colby TV, Pairolero PC, Payne WS. Cryopreservation of Canine Trachea: Functional and Histological Changes. *Ann Thorac Surg* 1989;47:208-12
- 11.- Ueda M, Yokomise H, Wada H, Hitomi S. Experimental Tracheal Transplantation for Possible Clinical Application. *Transplant Proc* 1997;29:871-73.



- 12.- Mukaida T, Shimizu N, Aoe M, Andou A, Date H, Okabe K, Yamashita M, Ichiba S. Experimental Study of Tracheal Allografts with Cryopreserved Grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116:262-6.
- 13.- Tojo T, Niwaya K, Sawabata N, Kushibe K, Nezu K, Taniguchi S, Kitamura S. Tracheal Replacement with Cryopreserved Tracheal Allograft: Experiment in Dogs. *Ann Thorac Surg* 1998;66:209-13.
- 14.- Nakanishi R, Umesue M, Hashimoto M, Muranaka H, Hachida M, Yasumoto K. Limit of Warm Ischemia Time Before Cryopreservation in Rat Tracheal Allograft. *Ann Thorac Surg* 2000;70:1800-5.
- 15.- Hashimoto M, Nakanishi R, Umesue M, Muranaka H, Hachida M, Yasumoto K. Feasibility of Cryopreserved Tracheal Xenotransplants with the Use of Short-course Immunosuppression. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;121:241-8.
- 16.- Kushibe K, Nezu K, Nishizaki K, Takahama M, Taniguchi S. Tracheal Allografts Maintaining Cartilage Viability with Long-term Cryopreserved Allografts. *Ann Thorac Surg* 2001;71:1666-9.
- 17.- 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;116:624-7.
- 18.- Kushibe K, Tojo T, Sakaguchi H, Takahama M, Nezu K, Taniguchi S, Yoshikawa T, Ichijima K. Assessment of Cartilage Viability in the Cryopreserved Tracheal Allograft by Measurement of  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  Incorporation. *Transplantation Proc* 2000 ;32:1655-1656.
- 19.- Inutsuka K, Kawahara K, Takachi T, Okabayashi K, Shiraishi T, Shirakusa T. Reconstruction of Trachea and Carina with Immediate or Cryopreserved Allografts in Dogs. *Ann Thorac Surg* 1996;62:1480-1484.
- 20.- Kumon BC, Shiraishi T, Makihata S, Kawahara K, Shirakusa T. Cartilaginous Injury Limits Cryopreservation of Tracheal Isograft. *Respirology* 2000;5:105-110.
- 21.- Yokomise H, Inui K, Wada H, Ueda M, Hitomi S. Reliable Long-Term Cryopreservation of Trachea for Tissue Banks. *Transplant Proc* 1996;28(2):1119-1120.
- 22.- Nakanishi R, Hashimoto M, Muranaka H, Umesue M, Kohno H, Yasumoto K. Maximal Period of Cryopreservation with the Bicell Biofreezing Vessel for Rat Tracheal Isografts. *Journal Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117:1071-1076.
- 23.- Nakanishi R, Onitsuka T, Shigematsu Y, Hashimoto M, Muranaka H, Yasumoto K. The Immunomodulatory Effect of Cryopreservation in Rat Tracheal Allografts. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:890-898.

- 24.- Mukaida T, Shimizu N, Aoe M, Andou A, Date H. Tracheal Allotransplantation After Varying Terms of Cryopreservation. *Transplant Proc* 1998;30:3397-400.
- 25.- Jung Kwon O, Young Suh G, Pyo Chung M, Kim J, Han J, Kim H. Tracheal Stenosis Depends on The Extent of Cartilaginous Injury in Experimental Canine Model. *Exp Lung Res* 2003;29(6):329-38.
- 26.- Okamoto T, Yamamoto Y, Gotoh M, Huang CL, Nakamura T, Shimizu Y, Tabata Y, Yokomise H. Slow Release of Bone Morphogenetic Protein 2 from a Gelatine Sponge to Promote Regeneration of Tracheal Cartilage in a Canine Model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127(2):329-334.
- 27.-Plopper CG., Mariassy AT., and Lollini LO. Structure as Revealed by Airway Dissection: A Comparison of Mammalian Lungs. *Am Rev Respir Dis.* 1993;28:S4.
- 28.- Salassa JR, Pearson BW, Payne WS. Gross and Microscopical Blood Supply of Trachea. *Ann Thorac Surg* 1997;24(2):100-107.
- 29.- Arthur C. Guyton., John E. Hall. *Tratado de Fisiología Médica.* México. McGrawHill-Interamericana. Décima Edición. 2005;534-536.
- 30.-Junqueira LC., Carneiro J. *Histología Básica Texto y Atlas.* Barcelona, España. Masson. Quinta Reimpresión. 2001;83-111,119-126,331-348.
- 31.- Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. Structure and Function of Aggrecan. *Cell Res* 2002;12(1):19-32.
- 32.- Périn JP, Bonnet F, Thurieau C, Jollès P. Link Protein Interactions with Hyaluronate and Proteoglycans. *J Biol Chem* 1987;262(27):13269-13272.
- 33.-Vicent C. Hascall and Dick Heinegård. Aggregation of Cartilage Proteoglycans. II. Oligosaccharide Competitors of the Proteoglycan-Hyaluronic Acid Interaction. *J Biol Chem* 1974;249(13):4242-4249.
- 34.-Schwartz S. *Principios de Cirugía.* México. Mc Graw-Hill.Interamericana. Séptima Edición.1999. 824-829.
- 35.-Frost E. Tracing the tracheostomy. *Ann Otol* 1976;85:618-24.
- 36.-Jackson TL., Lefkin P., Tuttle W. An Experimental Study in Bronchial Anastomosis. *J Thorac Surg* 1949;19:630-42.
- 37.-Grillo HC. The Development of Tracheal Surgery: An Historical Review. *Techniques of Tracheal Surgery.* *Ann Thorac Surg* 2003;75:610-9.
- 38.-Mulliken JB., Grillo HC. The Limits of Tracheal Resection with Primary Anastomosis: Further Anatomical Studies in Man. *J Thorac Cardioasc Surg* 1968;55:418-21.

- 39.-Pacheco CR., Rivero O., Porter JK. Experimental Reconstructive Surgery of Trachea. J Thorac Surg 1954;27:554-64.
- 40.- Fush J., Nasser B., and Vacanti J. Tissue Engineering: A 21st century Solution to Surgical Reconstruction. Ann Thorac Surg 2001;72:577-91.
- 41- Sakata J, Vacanti CA, Schloo B, Healy GB, Langer R, Vacanti JP. Tracheal Composites Tissue Engineered from Chondrocytes, Tracheal Epithelial Cells, and Synthetic Degradable Scaffolding. Transplantation Proc 1994 ;26:3309-3310.
- 42.- Kunachak S, Kulapaditharom B, Vajaradul Y, Rochanawutanon M. Cryopreserved, Irradiated Tracheal Homograft Transplantation for Laryngotracheal Reconstruction in Human Beings. Otolaryngol Head Neck Surg 2000;122:911-6.
- 43.- Stephens KE Jr, Wood DE. Bronchoscopic Management of Central Airway Obstruction. J Thorac Cardiovasc Surg 2000;119:289-96.
- 44.- Cooper JD, Pearson FG, Patterson GA, Todd TR, Ginsberg RJ, Goldberg M, Waters P. Use of Silicone Stents in the Management of Airway Problems. Ann Thorac Surg 1989;47:371-8.
- 45.- Wallace MJ, Charnsangavej C, Ogawa K, Carrasco CH, Wright KC, McKenna R, McMurtrey M, Gianturco C. Tracheobronchial Tree : Expandable Metallic Stents Used in Experimental and Clinical Applications. Radiology 1986;158:309-12.
- 46.-Daniel RA Jr. The Regeneration of Defects of the Trachea and Bronchi. An Experimental Study. J Thorac Surg 1948;17:335-49.
- 47.-Taffel M. The Repair of Tracheal and Bronchial Defects with Free Fascia Grafts. Surgery 1940;8:56-71.
- 48.-Daniel RA Jr. Taliaferro RM, Schaffarzick WR. Experimental Studies on the Repair of Wounds and Defects of the Trachea and Bronchi. Dis Chest 1950;17:426-41.
- 49.-Neville WE., Bolanowski PJP., Soltanzadeh H. Homograft Replacement of the Trachea Using Immunosuppression. J Thorac Cardiovasc Surg 1976;72:596-601.
- 50.- Messineo A, Filler RM, Bahoric B, Smith C, Bahoric A. Successful Tracheal Autotransplantation with a Vascularized Omental Flap. J. Pediatr Surg 1991;26:1296-300.
- 51.- Mabrut JY, Adham M, Bourgeot JP, Eljaafari A, DelaRoche E, Ducerf C, Baulieux J, Rigal D. Mechanical and Histological Characteristics of Human Trachea Before and After Cryopreservation: An Opportunity for Tracheal Tissue Banking. Transplantation Proc 2001 ;33:609-611.
- 52.-Nakanishi R., Shirakusa T., Hanagiri T. Early Histopathologic Features of Tracheal Allotransplant Rejection: A Study in Nonimmunosuppressed Dogs. Transplantation Proc 1994; 26:3715-3718.

- 53.- Yokomise H, Inui K, Wada H, Ueda M, Hitomi S. Tracheal Transplantation in Dogs for Future Clinical Application. *Transplantation Proc* 1996;28:1763-1764.
- 54.- Baumgartner I. Intramuscular Vascular Endothelial Growth Factor Gene Therapy: Fact or Fiction. *The American Journal of Medicine* 2003;114:156-157.
- 55.- Grillo HC. Tracheal Replacement: A Critical Review. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1995-2004.
- 56.- Ortega-Camarillo C, Díaz-Flores M, Avalos-Rodríguez A, Vergara-Onofre M, Rosales-Torres AM. La Apoptosis y su Importancia Biomédica. *Gac Med Mex* 2001;137(6):563-577.
- 57.- Lourdes María Barrera Rodríguez, Fabiola Gómez Arroyo, Lilia Vázquez Castañeda, María del Carmen Navarro, Felipe Mendoza Pérez. La Apoptosis como un Mecanismo de Inmunoregulación en Condiciones Fisiológicas y Patológicas Asociadas a Pulmón. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2003;16(3):173-180.
- 58.- Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4):495-516.
- 59.- Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell Death. *N Engl J Med* 2009;361:1570-83.
- 60.- Gerald M. Cohen. Caspases: The Executioners of Apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.
- 61.- Kumar S. The Apoptotic Cysteine Protease CPP32. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29(3):393-6.
- 62.- M. Sulpizi, U. Rothlisberger, and P. Carioni. Molecular Dynamics Studies of Caspase 3. *Biophysical Journal* 2003;84(4):2207-2215.
- 63.- Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sinica* 2005;37(11):719-727.
- 64.- Faubel S., Edelstein CL. Caspases as Drug Targets in Ischemic Organ Injury. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2005; 5(3):269-87.
- 65.- Hunaid A. Vohra and Manuel Galifiales. Effect of the Degree of Ischaemic Injury and Reoxygenation Time on The Myocardial Cell Death in Man: Role of Caspases. *BMC Physiology* 2005;5(14):1-12.
- 66.- Shen XD, Ke B, Zhai Y, Tsuchihashi SI, Gao F, Duarte S, Coito A, Busutil RW, Allison AC, Kupiec-Weglinski JW. Diannexin a Novel Annexin V Homodimer, Protects Rat Liver Transplants Against Cold Ischemia-Reperfusion Injury et al.. *Am J Transplant.* 2007;7(11):2463-71.

- 67.- Zhang XF., Foda HD. Pulmonary Apoptosis and Necrosis in Hyperoxia-Induced Acute Mouse Lung Injury. Abstract Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi. 2004; 27(7):465-8. Abstract en Inglés (medline).
- 68.- Bland RD, Ertsey R, Mokres LM, Xu L, Jacobson BE, Jiang S, Alvira CM, Rabinovitch M, Shinwell ES, Dixit A. Mechanical Ventilation Uncouples Synthesis and Assembly of Elastin and Increases Apoptosis in Lungs of Newborn Mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;
- 69.- Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. 2005 May;25(5):508-12. Effect of Different Tidal Volume Ventilation on Rat Bronchial and Alveolar Epithelial Cell Apoptosis. 2005; 25:508-12. Abstract en Inglés (medline).
- 70.- Yagi T, Hardin JA, Valenzuela YM, Miyoshi H, Gores GJ, Nyberg SL. Caspase Inhibition Reduces Apoptotic Death of Cryopreserved Porcine Hepatocytes. *Hepatology* 2001;33(6):1432-40
- 71.-Crewe J.M., Armitage W.J. Integrity of Epithelium and Endothelium in Organ-Cultured Human Corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(8):1757-61.
- 72.- Stroh C, Cassens U, Samraj AK, Sibrowski W, Schulze-Osthoff K, Los M. The Role of Caspases in Cryoinjury: Caspase Inhibition Strongly Improves the Recovery of Cryopreserved Hematopoietic and Other Cells. *FASEB J* 2002;16(12):1651-53.
- 73.- Vanhulle VP, Neyrinck AM, Pycke JM, Horsmans Y, Delzenne NM. Role of Apoptotic Signaling in Metabolic Disturbances Occurring in Liver Tissue After Cryopreservation: Study on Rat Precision-Cut Liver Slices. *Life Sci* 2006;28(78):1570-7.
- 74.-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 1999:Diciembre 6. Estados Unidos Mexicanos.
- 75.-Guide for Care and Use of Laboratory Animals. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. 1985.
- 76.- Muldrew K, Novak K, Yang H, Zernicke R, Schachar NS, McGann LE. Cryobiology of Articular Cartilage: Ice Morphology and Recovery of Chondrocytes. *Cryobiology* 2000;40(2):102-9.
- 77.-Ohlendorf C., Tomford WW., Mankin HJ. Chondrocyte Survival in Cryopreserved Osteochondral Articular Cartilage. *J Orthop Res* 1996;14(3):413-6.
- 78.- Vishwakarma GK, Raj GA, Lamba MS, Bhatia CK, Bhatia A. Isolation and Cryopreservation of Human Foetal Articular Chondrocytes. *Indian J Med Res* 1993;98:309-13.
- 79.- Kawabe N., Yoshinao M. Cryopreservation of Cartilage. *Int Orthop*1990;14(3):231-5.

- 80.- Rendal-Vázquez ME, Maneiro-Pampín E, Rodríguez-Cabarcos M, Fernández-Mallo O, López de Ullibarri I, Andión-Núñez C, Blanco FJ. Effect of Cryopreservation on Human Articular Chondrocyte Viability, Proliferation, and Collagen Expression. *Cryobiology* 2001;42(1):2-10.
- 81.- Tomford WW, Fredericks GR, Mankin HJ. Studies on Cryopreservation of Articular Cartilage Chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am* 1984;66(2):253-9.
- 82.- Hu DN, Yang PY, Ku MC, Chu CH, Lim AY, Hwang MH. Isolation and Cultivation of Human Articular Chondrocytes. *J Med Sci* 2002;18(3):113-20.
- 83.- Pennock AT, Wagner F, Robertson CM, Harwood FL, Bugbee WD, Amiel D. Prolonged Storage of Osteochondral Allografts: Does the Addition of Fetal Bovine Serum Improve Chondrocyte Viability? *J Knee Surg*. 2006;19(4):265-72.
- 84.- Tallheden T, van der Lee J, Brantsing C, Månsson JE, Sjögren-Jansson E, Lindahl A. Human Serum for Culture of Articular Chondrocytes. *Cell Transplant* 2005;14(7):469-79.
- 85.- Giannoni P, Pagano A, Maggi E, Arbicò R, Randazzo N, Grandizio M, Cancedda R, Dozin B. Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) for Aged Patients: Development of the Proper Cell Expansion Conditions for Possible Therapeutic Applications. *Osteoarthritis. Cartilage* 2005;13(7):589-600.
- 86.- Takahashi T, Yamamoto H, Ogawa Y, Yoshida S, Kataoka S, Majumdar M, Morris E, Tripple SB. Role of Apoptosis Inhibition in Various Chondrocyte Culture Systems. *Int J Mol Med* 2003;11(3):299-303.
- 87.- Takahashi T, Nieda T, Miyazaki E, Enzan H. Novel Technique for Suspension Culture of Autologous Chondrocytes Improves Cell Proliferation and Tissue Architecture. *Cell Transplant* 2003;12(6):667-76.

Braz J Med Biol Res, December 2009, Volume 42(12) 1156-1162

## Tracheal cryopreservation: caspase-3 immunoreactivity in tracheal epithelium and in mixed glands

A. Sotres-Vega, M. Baltazares-Lipp, J. Villalba-Caloca, M.O. Gaxiola-Gaxiola, J.A. Santibañez-Salgado, J.R. Oimos-Zúñiga and R. Jasso-Victoria

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research is partially financed by



Ministério  
da Ciência e Tecnologia



Ministério  
da Educação



### *Institutional Sponsors*



# Tracheal cryopreservation: caspase-3 immunoreactivity in tracheal epithelium and in mixed glands

A. Sotres-Vega<sup>1,2</sup>, M. Baltazares-Lipp<sup>1</sup>, J. Villalba-Caloca<sup>1</sup>, M.O. Gaxiola-Gaxiola<sup>1</sup>, J.A. Santibañez-Salgado<sup>1</sup>, J.R. Olmos-Zúñiga<sup>1</sup> and R. Jasso-Victoria<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental Surgery Research, National Institute of Respiratory Diseases "Ismael Cosío Villegas", Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>Doctoral Program in Biological Sciences, Autonomous Metropolitan University-Xochimilco, Mexico City, Mexico

## Abstract

Cryopreservation has an immunomodulating effect on tracheal tissue as a result of class II antigen depletion due to epithelium exfoliation. However, not all epithelium is detached. We evaluated the role of apoptosis in the remaining epithelium of 30 cryopreserved tracheal grafts. Caspase-3 immunoreactivity of tracheal epithelium was studied in canine tracheal segments cryopreserved with F12K medium, with or without subsequent storage in liquid nitrogen at  $-196^{\circ}\text{C}$  for 15 days. Loss of structural integrity of tracheal mixed glands was observed in all cryopreserved tracheal segments. Caspase-3 immunoreactivity in tracheal mucosa and in mixed glands was significantly decreased, in contrast to the control group and to cryopreserved tracheal segments in which it remained high, due to the effect of storage in liquid nitrogen ( $P < 0.05$ , ANOVA and Tukey test). We conclude that apoptosis can be triggered in epithelial cells during tracheal graft harvesting even prior to cryopreservation, and although the epithelial caspase-3 immunoreactivity is reduced in tracheal cryopreservation, this could be explained by increased cell death. Apoptosis cannot be stopped during tracheal cryopreservation.

**Key words:** Tracheal cryopreservation, Epithelium; Caspase-3

## Introduction

To date, there are no definitive clinical surgical strategies to repair tracheal defects longer than 7 cm, despite the fact that experimental tracheal transplants and synthetic or biological prostheses have been used to repair lesions (1-5).

Different experimental reconstruction models have been prepared with cryopreserved tracheal grafts frozen in cellular culture media (6). Based on freezing temperature and liquid nitrogen storage, cryopreserved tracheal graft protocols can be divided into two types: a) tracheal grafts frozen at  $-60^{\circ}$  to  $-140^{\circ}\text{C}$  and stored in liquid nitrogen until their use in surgical repair (7-20), and b) tracheal grafts cryopreserved within a more homogeneous range of temperature ( $-80^{\circ}$  to  $-85^{\circ}\text{C}$ ), without liquid nitrogen storage (3,21-24).

The results obtained for experimental tracheal reconstruction with cryopreserved grafts are contradictory,

and therefore this material has not been considered for clinical application. Most investigators agree that cryopreservation has an immunomodulating effect on tracheal allografts since it decreases antigenicity (5-7, 12-14, 25-28). This is attributed to the depletion of class II leukocyte antigen expression due to the exfoliation of tracheal epithelium produced during the freezing and defrosting process (3,5,6,11,28,29).

The freezing and thawing process results in decreased cell viability, although remaining intact and viable tracheal epithelial cells can be found even after cryopreservation. These living cells can induce an immunological reaction in the host. Since caspase-3 is the common denominator in both apoptotic starting pathways (30), we decided to study caspase-3 immunoreactivity in the remaining viable epithelial cells of cryopreserved tracheal segments.

**Correspondence:** A. Sotres-Vega, Departamento de Cirugía Experimental, Unidad de Investigación, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Calzada de Tlalpan 4502, Col. Sección XVI, Tlalpan 14080, México, DF, Mexico.  
Fax: +52-55-5487-1706. E-mail: [avesotve@yahoo.com](mailto:avesotve@yahoo.com)

Received May 15, 2009. Accepted October 23, 2009. Available online November 9, 2009. Published December 4, 2009



## Material and Methods

The protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee of the National Institute of Respiratory Diseases Ismael Cosío Villegas (NIRD), and carried out according to the technical specifications for the Care and Use of Laboratory Animals of the Official Mexican Norm (31) and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals prepared by the National Institutes of Health, USA (32).

### Surgical technique

Four tracheas were harvested from 4 unrelated mongrel dogs weighing 15 to 30 kg. The dogs were prepared before surgery with a 24-h fast for solid food and a 12-h fast for liquids. Initial anesthesia was induced with 0.1 mg/kg *iv* hydrochloric xylazine (Rompum, Bayer, Germany) and propofol 6 mg/kg (Diprivan, Astra Zeneca, Mexico), followed by immediate intubation with an endotracheal tube (Rush, Malaysia) connected to a volume ventilator (Harvard Apparatus, USA) with a vaporizer (isotec 3 Ohmeda) at a respiratory rate of 20 breaths/min, volume of 15 mL/kg and 100% FiO<sub>2</sub>. Anesthesia was maintained with 2% isoflurane. The anesthetized dog was placed in the supine position. The neck of each animal was shaved and prepared with povidone-iodine solution. The entire trachea was exposed after separating the strap muscles. After harvesting the trachea, fine dissection was done on a Mayo tray placed over an ice chest.

### Tracheal segment preparation

The cricoid cartilage was removed. The trachea was cut into five ring segments, washed for 3 min in cold glucose solution, and kept under ice with changes of the solution every minute. The glucose solution was prepared with 50% glucose (DX-50 solution, PISA, Mexico), 20 mL 20% mannitol (PISA), and 5000 U heparin (Inhepar, PISA), and 0.1 mL antibiotic-antimycotic solution (A5955, Sigma, USA) was added per liter of solution.

### Cryopreservation solution

The solution used for cryopreservation of the tracheal segments was F12K (21700-026, Gibco, USA) to which 10% dimethylsulfoxide (D2650, Sigma), 20% fetal bovine serum (16000-044, Gibco), 20% hyaluronic acid solution at 0.1% (53730, Fluka, Germany), and 0.1 mL antibiotic-antimycotic solution (A5955, Sigma) were added per liter of solution.

### Treatments of the tracheal segments

Cryopreservation of the tracheal segments included two different treatment schemes regarding storage in liquid nitrogen. In both schemes, immediately after washing with the glucose solution, each tracheal segment was placed in a cryogenic vial containing F12K medium. The vials were then placed inside a polystyrene foam box and frozen at -70°C.

### Study groups

Immediately after washing in glucose solution, the tracheal segments were randomly divided into a control group without cryopreservation and four groups with cryopreservation.

*Group 1 (N = 6, control group, without cryopreservation).* The tracheal segments were not exposed to any type of cryopreservation. They were only rinsed in glucose solution.

*Group 2 (N = 6).* The tracheal segments were cryopreserved in F12K medium at -70°C for 2 days.

*Group 3 (N = 6).* The tracheal segments were cryopreserved in F12K medium at -70°C for 2 days, followed by storage in liquid nitrogen at -196°C for 15 days.

*Group 4 (N = 6)* The tracheal segments were cryopreserved in F12K medium at -70°C for 15 days.

*Group 5 (N = 6).* The tracheal segments were cryopreserved in F12K medium at -70°C for 15 days, followed by storage in liquid nitrogen at -196°C for 15 days.

### Thawing the cryopreserved tracheal segments

At the end of the cryopreservation time, the cryogenic vials were placed in a double boiler at 37°C for 30 min and immediately rinsed for 3 min in F12K medium maintained at 37°C, with three changes of the solution.

### Microscopic evaluation

The tissue samples collected from the central and external portion of the tracheal ring were embedded in paraffin blocks and fixed in 10% buffered formalin for 24 h. They were dehydrated in increasing ethanol concentrations, cleared in xylol, embedded and blocked in paraffin wax, and then cut into 4- $\mu$ m thick sections with a rotatory microtome. The sections were mounted on glass slides and stained with hematoxylin and eosin and safranin O.

Immunoreactive caspase-3 in the tracheal epithelium (mucosa and glands) was determined with a polyclonal antibody (caspase 3 (CPP32) Ab-4, Rabbit Polyclonal Antibody, Neo Markers, Lab Vision, RB-1197-P, USA) and the biotin-avidin-peroxidase system, after staining with aminoethylcarbazole and double staining with hematoxylin. A negative control for caspase-3 was included in all tests.

## Results

Thirty 5-ring long tracheal segments were obtained from the tracheas of 4 unrelated mongrel dogs, for a total of 90 tracheal rings. The proximal, central, and distal rings (3 rings per tracheal segment) were studied and processed for histological evaluation and for the determination of caspase-3 immunoreactivity.

### Microscopic evaluation

Histologically, the cross-section of the tracheal wall in both the control and cryopreserved segments displayed

scattered denuded epithelium, with normal structural integrity. The smooth muscle in the membranous portion of the trachea was grossly and histologically viable. The tracheal hyaline cartilage in all segments maintained their horse-shoe shape, and there was no disruption of the cartilaginous architecture (Figure 1). The cartilage showed viable chondrocyte nuclei in the lacunae (Figure 2).

**Tracheal mucosa epithelium.** All groups showed areas of unaltered tracheal epithelium, and different degrees of detachment ranging from mild to total tracheal epithelial cell detachment.

**Tracheal mixed glands.** The tracheal mixed glands of the control group showed normal structural integrity, with uncongested tracheal lumen and epithelial cells.

All the cryopreserved groups showed dilated mixed glands and depletion of structural integrity, with congested lumen and depletion of epithelial cells

### Immunoreactive caspase-3

**Epithelium from tracheal mucosa.** The number and percentage of tracheal rings positive for caspase-3 immunoreactivity in the epithelium from the tracheal mucosa is shown in Table 1 and is illustrated in Figure 3.

The epithelium of the tracheal mucosa contained caspase-3 in all 18 rings (100%) from the control group. Inside every ring, there were areas with different caspase-3 immunoreactivity, which were classified as follows: 1) no caspase-3 immunoreactivity in the epithelial cells, 2) immunoreactivity in a few epithelial cells, 3) immunoreactivity found mainly in the basal epithelial cells, and 4) immunoreactivity localized in most of the epithelial cells (Figure 4). The percentage of tracheal rings with caspase-3 immunoreactivity in the epithelium of cryopreserved tracheal segments was 55.6% for group 2, 11.1% for group 3, 77.8% for group 4, and 0% for group 5.

The number of rings with caspase-3 immunoreactivity in the epithelium from the tracheal mucosa was decreased in all the cryopreservation groups (Figure 5). This finding was statistically significant in the groups stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  and in liquid nitrogen (control vs  $-70^{\circ}\text{C}$ , control vs  $-196^{\circ}\text{C}$ , and  $-70^{\circ}\text{C}$  vs  $-196^{\circ}\text{C}$ ;  $P < 0.03$ , ANOVA and Tukey test)

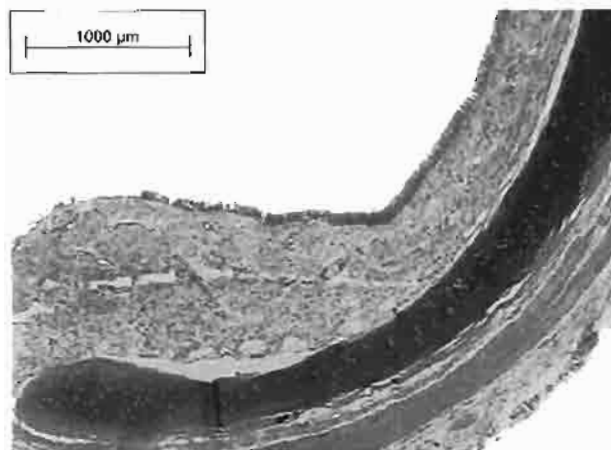


Figure 1. Cryopreserved tracheal cartilage frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$ , in F12K medium for 15 days, followed by liquid nitrogen storage at  $-196^{\circ}\text{C}$  for 15 days (group 5; Safranin O, 2.5X). Smooth muscle was histologically viable and the cartilage maintained its horse-shoe shape without disruption of cartilaginous architecture.

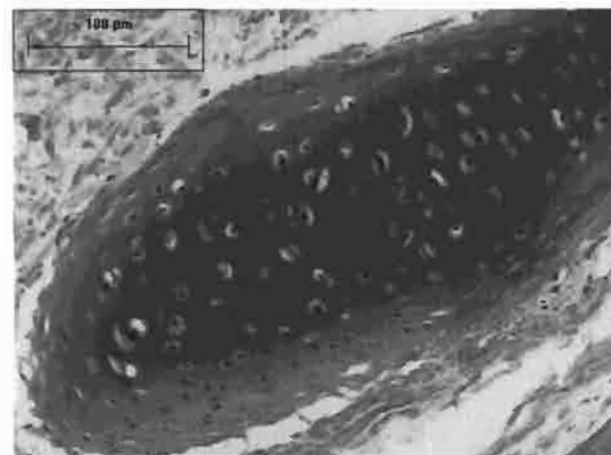


Figure 2. Cryopreserved tracheal cartilage frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$ , in F12K medium for 15 days, followed by liquid nitrogen storage at  $-196^{\circ}\text{C}$  for 15 days (group 5; Figure 1, 10X). The cartilage showed viable chondrocyte nuclei in the lacunae.

Table 1. Study groups, cryopreservation conditions, and number and percentage of tracheal rings with caspase-3 immunoreactivity in tracheal mucosa epithelium.

Groups	Cryopreservation time ( $-70^{\circ}\text{C}$ )	Storage in liquid nitrogen (15 days)	Rings with epithelium caspase-3 immunoreactivity	Rings without epithelium caspase-3 immunoreactivity
1	-	-	18 (100%)	0 (0%)
2	2 days	No	10 (55.6%)	8 (44.4%)
3	2 days	Yes	2 (11.1%)	16 (88.9%)
4	15 days	No	14 (77.8%)	4 (22.2%)
5	15 days	Yes	0 (0%)	18 (100%)

Data are reported as number with percent in parentheses for 18 rings.

regardless of time of storage at  $-70^{\circ}\text{C}$  (control, 2 days at  $-70^{\circ}\text{C}$ , and 15 days at  $-70^{\circ}\text{C}$  vs 2 days + 15 days in liquid nitrogen and vs 15 days + 15 days in liquid nitrogen;  $P = 0.00$ , ANOVA and Tukey test). No significant difference was found between the number of rings with caspase-3 immunoreactivity in the epithelium from the groups with the tracheal mucosa cryopreserved at  $-70^{\circ}\text{C}$  (control without cryopreservation vs 2 days and vs 15 days,  $P = 0.20$ ; 2 days vs 15 days,  $P = 1.0$ ; 2 days vs 15 days (after liquid nitrogen storage),  $P = 0.81$ , ANOVA and Tukey test).

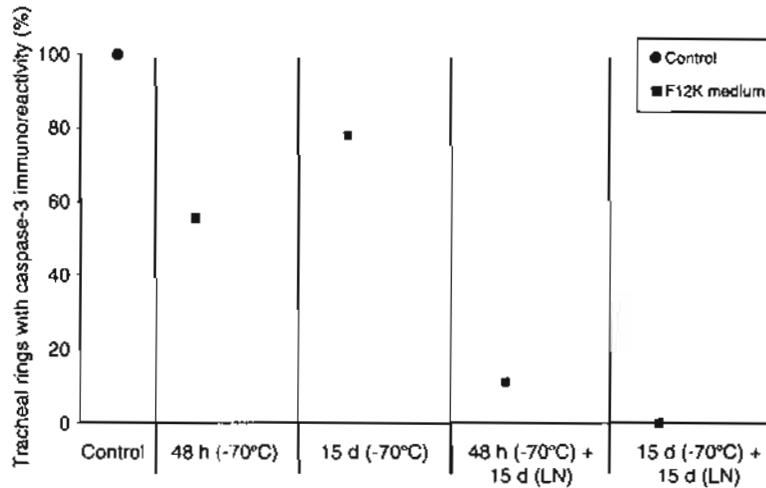


Figure 3. Percentage of the tracheal rings, which presented caspase-3 immunoreactivity in tracheal mucosa epithelium. d = days, LN = liquid nitrogen. Caspase-3 immunoreactivity decrease in the tracheal epithelium was statistically significant due to cryopreservation (control vs  $-70^{\circ}\text{C}$ , control vs  $-196^{\circ}\text{C}$ , and  $-70^{\circ}\text{C}$  vs  $-196^{\circ}\text{C}$ ;  $P < 0.03$ , ANOVA and Tukey test) regardless of storage time at  $-70^{\circ}\text{C}$ : (control, 2 days and 15 days at  $-70^{\circ}\text{C}$  vs 2 days and 15 days in LN;  $P = 0.00$ , ANOVA and Tukey test).

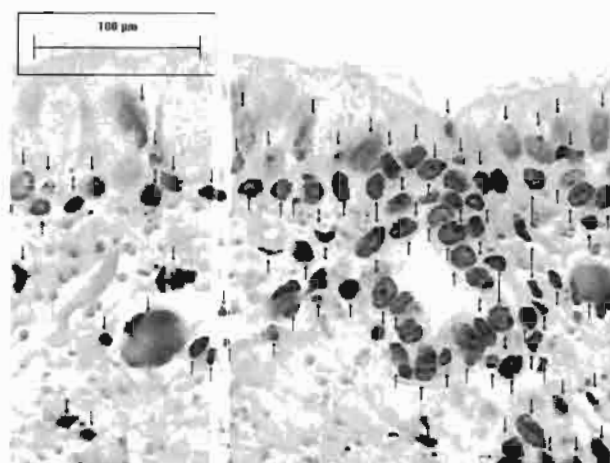


Figure 4. Tracheal mucosa from the control group without cryopreservation, with caspase-3 immunoreactivity present in most of the epithelial cells (AEC-hematoxylin, 40X). Arrows point out cells with caspase-3 immunoreactivity.

*Tracheal mixed glands.* The number and percentage of tracheal rings with caspase-3 immunoreactivity in mixed glands are shown in Table 2 and are illustrated in Figure 6.

All 18 rings (100%) of the tracheal mixed glands from the control group presented caspase-3 immunoreactivity. Inside every ring there were areas with different caspase-3 immunoreactivity, which were classified as follows: 1) mixed glands without caspase-3 immunoreactivity, 2) caspase-3 in the demilunes of the mixed glands without involved epithelium, 3) caspase-3 in the demilunes of the mixed glands with moderately involved epithelium, and 4) caspase-3 in the demilunes of the mixed glands with seriously involved epithelium (Figure 7).

The mixed glands in the cryopreserved groups presented decreased caspase-3 immunoreactivity (Figure 8). The percentage of tracheal rings with caspase-3 immunoreactivity in the mixed glands of cryopreserved groups was 83.3% for group 2, 22.2% for group 3, 72.2% for group 4, and 16.7% for group 5.

All cryopreserved groups showed a decreased number of rings with caspase-3 immunoreactivity in the tracheal mixed glands compared to control. This decrease was statistically significant in the groups cryopreserved at a lower temperature ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) (control and  $-70^{\circ}\text{C}$  vs  $-70^{\circ}\text{C}$  + liquid nitrogen;  $P = 0.00$ , ANOVA and Tukey test), with no significant difference between the number of rings with caspase-3 immunoreactivity in the tracheal mixed glands due to the freezing effect at  $-70^{\circ}\text{C}$  (control vs

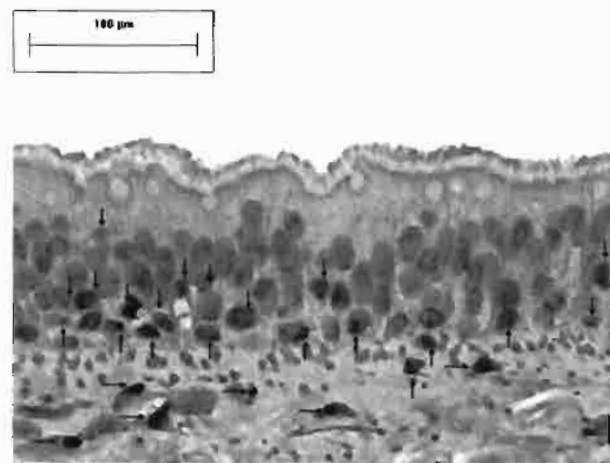
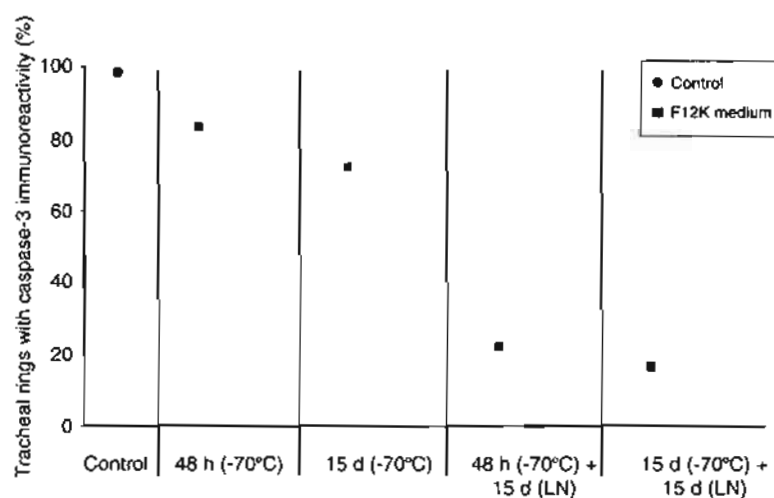


Figure 5. Caspase-3 immunoreactivity in the epithelium from cryopreserved tracheal grafts (AEC-hematoxylin, 40X). Arrows point out cells with caspase-3 immunoreactivity.

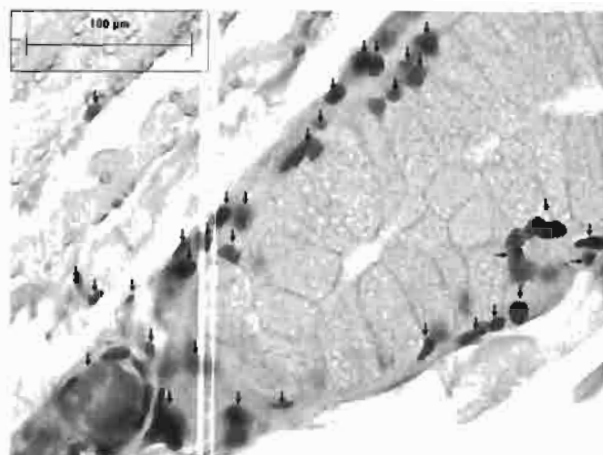
**Table 2.** Study groups, cryopreservation conditions, and number and percentage of tracheal rings with caspase-3 immunoreactivity in the glands.

Groups	Cryopreservation time (-70°C)	Storage in liquid nitrogen (15 days)	Rings with mixed gland caspase-3 immunoreactivity	Rings without mixed gland caspase-3 immunoreactivity
1	-	-	18 (100%)	0 (0%)
2	2 days	No	15 (83.3%)	3 (16.7%)
3	2 days	Yes	4 (22.2%)	14 (77.8%)
4	15 days	No	13 (72.2%)	5 (27.8%)
5	15 days	Yes	3 (16.7%)	15 (83.3%)

Data are reported as number with percent in parentheses for 18 rings.



**Figure 6.** Study groups, cryopreservation conditions and percentage of tracheal rings, which presented caspase-3 immunoreactivity in the glands. d = days, LN = liquid nitrogen. Caspase-3 immunoreactivity decrease in the tracheal mixed glands was statistically significant due to storage of tracheal segments in LN (control and -70°C vs -70°C + LN;  $P = 0.00$ , ANOVA and Tukey test).



**Figure 7.** Caspase-3 immunoreactivity in tracheal mixed glands with severe epithelial involvement (AEC-hematoxylin, 40X). Arrows point out cells with caspase-3 immunoreactivity.



**Figure 8.** Tracheal glands with depletion of structural integrity and caspase-3 immunoreactivity from cryopreservation groups (AEC-hematoxylin, 40X). Arrows point out cells with caspase-3 immunoreactivity.

-70°C;  $P = 0.10$ , ANOVA and Tukey test), and in the groups stored in liquid nitrogen for 15 days, regardless of prior freezing time at -70°C (control, 2 days at -70°C and 15 days at -70°C vs 2 days + 15 days in liquid nitrogen and vs 15 days + 15 days in liquid nitrogen;  $P < 0.01$ , ANOVA and Tukey test). No significant difference was found between the number of rings with caspase-3 immunoreactivity in the tracheal mixed glands of the groups cryopreserved at -70°C (control without cryopreservation vs 2 days,  $P = 0.66$ ; control vs 15 days,  $P = 0.17$ ; 2 days vs 15 days,  $P = 0.89$ ; 2 days vs 15 days (after liquid nitrogen storage),  $P = 0.99$ , ANOVA and Tukey test).

## Discussion

We evaluated caspase-3 immunoreactivity in the remaining epithelium of tracheal grafts cryopreserved with F12K medium at -70°C, with or without subsequent storage in liquid nitrogen. Cryopreservation involves the benefit of hypothermia, which prevents ischemic injury and reduces cell metabolism, although the process itself is not innocuous. Different methods and protocols are used to cryopreserve cells or tissues with different cryopreservation solutions. The main goal of cryopreservation solution is to nourish cells at physiological and low temperatures to keep cell viability. They also contain concentrations of electrolytes similar to normal intracellular levels, in order to restrict the ischemic imbalances as a result of reduced temperature and the switching off of ionic pumps. They also have an impermeant anion to reduce cellular swelling during low temperature storage. The F12K nutrient medium has been used successfully in tissue engineering and in articular chondrocyte and tracheal cryopreservation. Thus, we thought that it could be very useful for the present investigation since our goal was to study the effects of cryopreservation and apoptosis on the tracheal epithelial cells, limiting damage to the tracheal cartilage. We added 20% SBF and 10% DMSO cryoprotective agents to the F12K nutrient solution in order to limit cryoinjury.

There are many reports about tracheal cryopreservation time (1 to 730 days). However, better cell viability has been reported after shorter periods of cryopreservation, since tracheal cartilage is prone to severe damage with a long cryopreservation time. Our aim in the present investigation was to study the viability of tracheal epithelial cells remaining after cryopreservation and its apoptotic process, since these are the most powerful antigenic fac-

tors (3,6,11,29); however, tracheal cartilage viability and structure must be kept as viable as possible, since they provide the framework for tracheal transplantation. Thus, we also wanted to obtain the best viability of tracheal cartilage (knowing that we would get some degree of epithelial cell viability). The best cryopreservation times are between 2 and 15 days and traditionally thawing time is short (1-3 min) at 37-40°C for cells cryopreserved in 1-2 mL vials. In the present study, we decided to increase thawing time to 30 min at 37°C since a 5-ring segment needs 25 mL of cryopreservation solution. In our experience working with trachea cryopreservation, we have observed that a short thawing time results in non-homogeneous defrosting, since cryopreservation solution defrosting begins from the outside, with the intraluminal tracheal cryopreservation solution being the last to defrost.

The apoptotic process of different cellular groups begins with harvesting and continues during cryopreservation and cell thawing, triggering caspase-3 (33-35). We found a greater quantity of tracheal epithelial and mixed glands and higher caspase-3 immunoreactivity in the control group (without cryopreservation) than in the cryopreserved groups, which showed fewer numbers of tracheal epithelial cells and mixed glands, with a consequent reduction of caspase-3 immunoreactivity ( $P < 0.03$ , ANOVA and Tukey test) mainly in the liquid nitrogen groups. Histologically, there is an important loss of cell viability. Thus, the decrease in caspase-3 immunoreactivity can be explained by increased cell death rather than by biochemical changes within the cell. Increased caspase-3 immunoreactivity in the epithelium and tracheal glands after harvesting of the control group could be explained by two different etiologies, i.e., ischemia from surgical dissection and tissue damage due to mechanical ventilation that increases caspase-3 immunoreactivity (36).

We have shown that apoptosis can be triggered in epithelial cells during tracheal graft harvesting even prior to cryopreservation, and although epithelial caspase-3 immunoreactivity is reduced, in tracheal cryopreservation this could be explained by increased cell death. We can hypothesize that epithelial apoptosis can be present during tracheal graft harvesting, even before cryopreservation. Thus, antiapoptotic agents would decrease cellular death due to apoptosis during graft harvesting, with a subsequent higher caspase-3 immunoreactivity in the remaining epithelium due to the cryopreservation effect.

## References

1. Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti JP. Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann Thorac Surg* 2001; 72: 577-591.
2. Sakata J, Vacanti CA, Schloo B, Healy GB, Langer R, Vacanti JP. Tracheal composites tissue engineered from chondrocytes, tracheal epithelial cells, and synthetic degradable scaffolding. *Transplant Proc* 1994; 26: 3309-3310.
3. Mabrut JY, Adham M, Bourgeot JP, Eljaafari A, DelaRoche E, Ducerf C, et al. Mechanical and histological characteristics of human trachea before and after cryopreservation: an op-

- portunity for tracheal tissue banking *Transplant Proc* 2001; 33: 609-611.
4. Zhao H, Hua TC, Zhou YZ, Wang QF, Yang Y, Bao LL. Cryopreservation and transplantation of dog trachea. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 858: 270-275.
  5. Murakawa T, Nakajima J, Motomura N, Murakami A, Takamoto S. Successful allotransplantation of cryopreserved tracheal grafts with preservation of the pars membranacea in nonhuman primates. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123: 153-160.
  6. Sotres-Vega A, Villalba-Caloca J, Jasso-Victoria R, Olmos-Zuniga JR, Gaxiola-Gaxiola M, Baltazares-Lipp M, et al. Cryopreserved tracheal grafts. a review of the literature. *J Invest Surg* 2006; 19: 125-135
  7. Tojo T, Niwaya K, Sawabata N, Kushibe K, Nezu K, Taniguchi S, et al. Tracheal replacement with cryopreserved tracheal allograft: experiment in dogs. *Ann Thorac Surg* 1998; 66: 209-213
  8. Lenot B, Macchiarini P, Dulmet E, Weiss M, Dartevielle P. Tracheal allograft replacement. An unsuccessful method. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993; 7: 648-652.
  9. Tojo T, Niwaya K, Sawabata N, Nezu K, Kawachi K, Kitamura S. Tracheal allogenic immunoresponse is reduced by cryopreservation: canine experiment. *Transplant Proc* 1996; 28: 1814-1815.
  10. Moriyama H, Sasajima T, Hirata S, Yamazaki K, Yatsuyanagi E, Kubo Y. Revascularization of canine cryopreserved tracheal allografts. *Ann Thorac Surg* 2000; 69: 1701-1706.
  11. Kushibe K, Nezu K, Nishizaki K, Takahama M, Taniguchi S. Tracheal allotransplantation maintaining cartilage viability with long-term cryopreserved allografts. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: 1666-1669
  12. Nakanishi R, Onitsuka T, Shigematsu Y, Hashimoto M, Muranaka H, Yasumoto K. The immunomodulatory effect of cryopreservation in rat tracheal allotransplantation. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21: 890-898
  13. Nakanishi R, Umesue M, Hashimoto M, Muranaka H, Hachida M, Yasumoto K. Limit of warm ischemia time before cryopreservation in rat tracheal isografts. *Ann Thorac Surg* 2000; 70: 1880-1884.
  14. Nakanishi R, Hashimoto M, Muranaka H, Yasumoto K. Effect of cryopreservation period on rat tracheal allografts. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20: 1010-1015.
  15. Kushibe K, Tojo T, Sakaguchi H, Takahama M, Nezu K, Taniguchi S, et al. Assessment of cartilage viability in the cryopreserved tracheal allograft by measurement of  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  incorporation. *Transplant Proc* 2000; 32: 1655-1656.
  16. Hashimoto M, Nakanishi R, Umesue M, Muranaka H, Hachida M, Yasumoto K. Feasibility of cryopreserved tracheal xenotransplants with the use of short-course immunosuppression. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 121: 241-248
  17. Kushibe K, Takahama M, Nezu K, Taniguchi S. Assessment of cartilage viability in long-term cryopreserved tracheal allografts. *Transplant Proc* 2001; 33: 625-626.
  18. Kushibe K, Tojo T, Sakaguchi H, Takahama M, Nishizaki K, Nezu K, et al. Effects of warm ischemia and cryopreservation on cartilage viability of tracheal allografts. *Ann Thorac Surg* 2000; 70: 1876-1879.
  19. Deschamps C, Trastek VF, Ferguson JL, Martin WJ, Colby TV, Poirer PC, et al. Cryopreservation of canine trachea: functional and histological changes. *Ann Thorac Surg* 1989; 47: 208-212.
  20. Messineo A, Filler RM, Bahoric A, Smith CR. Repair of long tracheal defects with cryopreserved cartilaginous allografts. *J Pediatr Surg* 1992; 27: 1131-1134.
  21. Inutsuka K, Kawahara K, Takachi T, Okabayashi K, Shiraishi T, Shirakusa T. Reconstruction of trachea and carina with immediate or cryopreserved allografts in dogs. *Ann Thorac Surg* 1996; 62: 1480-1484.
  22. Yokomise H, Inui K, Wada H, Ueda M, Hitomi S. Tracheal transplantation in dogs for future clinical application. *Transplant Proc* 1996; 28: 1763-1764.
  23. Nakanishi R, Hashimoto M, Muranaka H, Umesue M, Kohno H, Yasumoto K. Maximal period of cryopreservation with the Bicell biofreezing vessel for rat tracheal isografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117: 1070-1076.
  24. Mukaida T, Shimizu N, Aoe M, Andou A, Date H. Tracheal allotransplantation after varying terms of cryopreservation. *Transplant Proc* 1998; 30: 3397-3400.
  25. Kunachak S, Kulapaditharom B, Vajjaradul Y, Rochanawutanon M. Cryopreserved, irradiated tracheal homograft transplantation for laryngotracheal reconstruction in human beings. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 122: 911-916.
  26. Yokomise H, Inui K, Wada H, Ueda M, Hitomi S. Long-term cryopreservation can prevent rejection of canine tracheal allografts with preservation of graft viability. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 111: 930-934.
  27. Mukaida T, Shimizu N, Aoe M, Andou A, Date H, Okabe K, et al. Experimental study of tracheal allotransplantation with cryopreserved grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 116: 262-266.
  28. Liu Y, Zheng R, Ding J, Qiao Y, Wang Q. Histological examination of cryopreserved rat tracheal grafts. *ASAIO J* 2007; 53: 492-496
  29. Aoki T, Yamato Y, Tsuchida M, Souma T, Yoshiya K, Watanabe T, et al. Successful tracheal transplantation using cryopreserved allografts in a rat model. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999; 16: 169-173.
  30. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516.
  31. Diario Oficial de la Federación. *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999*. Mexico: Estados Unidos Mexicanos (diciembre 6); 1999.
  32. U.S. Department of Health and Human Services. *Guide for care and use of laboratory animals*. Public Health Service, National Institutes of Health; 1985.
  33. Stroh C, Cassens U, Samraj AK, Sibrowski W, Schulze-Osthoff K, Los M. The role of caspases in cryoinjury: caspase inhibition strongly improves the recovery of cryopreserved hematopoietic and other cells. *FASEB J* 2002; 16: 1651-1653.
  34. Yagi T, Hardin JA, Valenzuela YM, Miyoshi H, Gores GJ, Nyberg SL. Caspase inhibition reduces apoptotic death of cryopreserved porcine hepatocytes. *Hepatology* 2001; 33: 1432-1440
  35. Xiao J, Zou P, Huang SA, Hu ZB, Liu LB, You Y. [Role of apoptosis in cryoinjury of cord blood hematopoietic stem/progenitor cells and its mechanism]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2004; 12: 90-94
  36. Hu GD, Cai SX, Chen YH, Gao F. [Effect of different tidal volume ventilation on rat bronchial and alveolar epithelial cell apoptosis]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2005; 25: 508-512



# Cryopreserved Tracheal Grafts: A Review of the Literature

**Avelina Sotres-Vega, MSc**  
Department of Experimental Surgery  
Research, National Institute of  
Respiratory Diseases,  
Doctoral Program in Biological  
Sciences, Autonomous Metropolitan  
University-Xochimilco, Mexico

**Jaime Villalba-Caloca, MD**  
Department of Experimental Surgery  
Research, National Institute of  
Respiratory Diseases, Doctoral  
Program in Biomedical Science  
Research, National Polytechnic  
Institute, Mexico

**Rogelio Jasso-Victoria, MD,  
J. Raúl Olmos-Zúñiga, MSc,  
Miguel Gaxiola-Gaxiola, MD,  
Matilde Baltazares-Lipp, MD, and  
Alfredo Santibañez-Salgado, MD**  
Department of Experimental Surgery  
Research, National Institute of  
Respiratory Diseases, Mexico

**Patricio Santillán-Doherty, MD**  
Department of Experimental Surgery  
Research, National Institute of  
Medical Science and Nutrition  
"Salvador Zubiran," Mexico

Received 8 February 2005;  
accepted 3 November 2005.

Address correspondence to Dr. Jaime  
Villalba-Caloca, Instituto Nacional de  
Enfermedades Respiratorias,  
Departamento de Investigación en  
Cirugía Experimental y Unidad de  
Trasplante Experimental, Calzada de  
Tlalpan 4502, Sección XVI, Tlalpan  
14080, Mexico.  
E-mail: jaimevc@iner.gob.mx

**ABSTRACT** Cryopreserved tracheal grafts have been used in several experimental models of long segment replacement. The clinical application of the procedure has been limited due to the fact that contradictory results have been reported. The purpose of this article is to present a review of the literature on tracheal cryopreservation. Despite the fact that most authors indicate that cryopreserved tracheal allografts retain viability and have a low immunological response, though they continue to function after transplantation with good epithelialization and patency, cryopreservation leads to significant damage to cartilage, the degree of which is based on the freezing-storage methods that affect the function and durability of a graft. The long-term storage of cartilage must therefore be investigated in more detail in basic research models of cartilage viability: the evaluation of chondrocyte apoptosis, and the use of different solutions for tracheal cryopreservation other than RPMI-1640, Dulbecco's modified Eagle's, Eurocollins, and TC-199. Furthermore, problems that involve improving the blood supply to the graft after extensive resection and immunosuppression must be resolved before tracheal cryopreservation can become a clinically established method for tracheal grafts.

**KEYWORDS** cartilage, cryopreservation, epithelium, tracheal grafts, tracheal reconstruction

The management of tracheal pathology such as stenosis, neoplasm, trauma, postintubation injuries, and congenital diseases may often require tracheal reconstruction, which can be hindered by the lack of sufficient tissue for use in surgical reconstruction. End-to-end anastomosis after resection is the method of choice and can usually be successfully performed in defects affecting up to 50% of the trachea in adults [1-3] and one-third in infants [2-5]. More extensive lesions are

not amenable to conventional surgical intervention [2, 5-10]. The problems involved in tracheal reconstruction after extensive resection are still unresolved and remain one of the most important challenges in tracheal surgery. In the search for alternative ways of replacing long segments of the trachea, segmental tracheal substitution has been attempted, both clinically and experimentally, using prosthetics (Dacron, polyurethane mesh, polytetrafluoroethylene, polypropylene mesh, silicone rubber, and even glass tubes) and tissues such as trachea, fascia, skin, bone, periosteum, cartilage, perichondrium, muscle, esophagus, pericardium, dura mater, and the small bowel. Nevertheless, none of them replace the native trachea adequately. The use of prosthetics has often been fraught with complications such as chronic infections, immunological reactions, stenosis, or surgical difficulties. There are also similar complications involved when autologous tissue is used as a bioprosthesis to repair the damage, as well as the risk of regressive growth of granulation tissue, which can provoke either airway stenosis or ulcerosis due to poor revascularization [1, 4, 9-11]. Due to the excellent results given with other types of cryopreserved grafts, the application of this technique to tracheal replacement has been attempted as a solution to this problem. Cryopreserved tracheal grafts have been successfully used in several experimental models of tracheal reconstruction, though contradictory results have nevertheless been reported. The purpose of this article is to present a review of the literature on tracheal cryopreservation. This systematic review of the literature was based on a listing of bibliographic references, obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI), the U.S. National Library of Medicine, and the National Institutes of Health ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) using the specific keywords "tracheal cryopreservation" to identify pertinent articles. The search was limited specifically to literature in English related to "tracheal cryopreservation" with a Medline entry date of from January 1989 to December 2004. Based on the bibliographic references obtained from the NCBI, we believe that our article is the first review of the literature reported on tracheal cryopreservation.

## TRACHEAL CRYOPRESERVATION: TEMPERATURE FREEZING RATE, CRYOPROTECTIVE AGENTS, AND DURATION OF CRYOPRESERVATION

Cryopreservation is a technique in which a biomaterial is frozen by using a thermally controlled procedure and a cryoprotective agent at an adequate concentration before the biomaterial is preserved in liquid nitrogen for an indefinite duration. It is subsequently thawed under controlled warming conditions prior to its use. In as much as chemical and physical changes are almost completely inhibited at below  $-100^{\circ}\text{C}$ , liquid nitrogen has been used for preservation. However, cell damage due to dehydration and the formation of intracellular ice crystals can occur in cryopreserved specimens as an effect of freezing and thawing.

Freezing injury is normally classified as being caused by a direct effect (depending on the rate of cooling), or an indirect effect (that occurs after a long period at the reduced temperature) [12]. Tracheal cryopreservation is generally initiated through a slow-freezing system: a computer controlled unit that freezes at a rate of  $1^{\circ}\text{C}$  to  $5^{\circ}\text{C}$  per minute until a temperature of  $-80^{\circ}\text{C}$  to  $-100^{\circ}\text{C}$  is reached [13]. Lange and Hopkins suggest that  $-1^{\circ}\text{C}$  per minute is the best freezing rate [12] since the latent heat of crystallization that occurs during the freezing process is avoided at this rate [9]. Most problems appearing during cryopreservation occur in the temperature range of between  $0^{\circ}\text{C}$  and  $-60^{\circ}\text{C}$ , which is called as "the risky temperature range" [10]: The cellular membrane is apparently subject to impairment during long-term cryopreservation at less than  $-130^{\circ}\text{C}$ ; there is also an added tendency to generate intracellular ice recrystallization [12, 13].

Tissue injury caused by freezing may produce problems in the process of tissue recovery after cryopreservation [14]; almost no cell survival can be expected unless a suitable cryoprotective agent is used prior to cooling. Dimethyl sulfoxide (DMSO) or glycerol has been conventionally used as a tracheal cryoprotective agent in order to protect cells against freezing injury due to intracellular dehydration. For



the purpose of selecting an appropriate cryoprotective agent, dog tracheas were immersed in DMSO or glycerol solutions. Intact cilia shapes were observed under a light microscope in DMSO, but the ciliate shapes were challenged and the amount of mucus fell when glycerol was used [10]. The combined use of different types of cryoprotectants has been reported to exhibit a synergist effect in cryopreservation [15]. Mabrut et al. [9] suggest that the histological and mechanical characteristics of human trachea are maintained after cryopreservation with the use of glycerol plus hydroxyl ethyl starch, or DMSO plus albumin, as cryoprotectants. Other authors report that trehalose is a nonreducing disaccharide that cannot penetrate the cell membrane and protects the cellular membrane during cryopreservation by replacing water molecules that are bound to membrane phospholipids [12, 14–18].

The histological morphology of tracheal grafts suggests that a prolonged period of cryopreservation increases the degree of degeneration in both epithelium and cartilage, which gradually worsens due to cellular damage [6, 13, 19–23]. The epithelium of cryopreserved allografts can nevertheless be temporarily recovered after implantation [13, 14, 21, 24]. Bronchial cartilage may be severely damaged by freezing and cartilage viability affects the function and durability of a graft [9, 12, 22, 23, 25, 26]. Although gross appearance and histological examination show almost intact tracheal cartilage before and after cryopreservation, an assessment of cartilage viability indicates that viability before is significantly higher than after cryopreservation. It also demonstrates that there are no significant differences in cartilage viability among the tracheas after different durations of cryopreservation [12, 22, 25] though a loss of viable chondrocyte nuclei in the lacunae [8, 12–14, 27, 28]; ischemic changes [5, 28], and irreversible damage are present [20]. This is probably due to the fact that the cryoprotectant does not penetrate deeply into the cartilage [13, 19, 21]. Moreover, warm ischemic time is a determinant of the survival of cryopreserved cartilage after transplantation, with notable fibrous changes, as warm ischemic time to preservation is increased [12, 19, 20, 22, 26]. Kitamura et al. [29] conclude that 6 hours is the maximum permissible warm ischemic

time for cryopreserved tracheal transplantation, and that necrosis of the tracheal cartilage due to warm ischemia reduces the viability of the grafts.

The maximum period of tracheal cryopreservation is still controversial: In most experimental studies, tracheal transplantation has been performed after about 1 month of cryopreservation without an effect on the morphology of either the epithelium or the cartilage [9, 12, 15, 17, 18]. Nakanishi et al. report that an admissible period of cryopreservation is 3 months [12, 25]. The epithelium and cartilage in isografts undergoing a cryopreservation period of less than 3 months is improved or maintained, while a cryopreservation period of more than 6 months is definitely deleterious to graft morphology [13]. Table I shows the type of cryopreserved tracheal graft, the length of the graft, the duration of preservation, and the technical procedures that have been reported while differentiating by the type of tracheal cryopreservation.

## CRYOPRESERVATION AND TRACHEAL ALLOGENICITY

The effect of cryopreservation on immunomodulation is not completely understood. Bujia et al. [2, 7, 9, 11, 12, 17, 19–22, 30] found human leukocyte antigen class II subregion gene products on human tracheal epithelium and on mixed glandular tissue. Cryopreservation prevents enhanced allograft rejection: It has an immunomodulatory effect on the tracheal allograft for a long period that may delay the immunization of tracheal allografts in the recipient, and may decrease the antigenicity of the allograft itself [19], partly because of the exfoliation of airway epithelium. Exfoliation can act as alloantigen-presenting cells [11, 31], which may be explained as a result of a depletion of the epithelium and a loss of class II antigen expression during freezing and thawing [9, 12, 31]. Murakawa et al. [11] reported that cryopreserved tracheal allograft tissues were negative for CD3, MHC class II antigen, and S100 protein. Despite the fact that a small degree of mononuclear cell infiltration was observed in the subepithelial layer, these infiltrating cells were negative for CD3, MHC class II antigen, and S100 protein.

**TABLE 1** Type and length of the tracheal graft, duration of cryopreservation, and the technical procedures as reported by the authors

Type of trachea, length graft (reference)	Cryopreservation medium and cryoprotectant agent	Freezing from C to °C (temperature rate/time)	Storage temperature and preservation time	Thawing procedure rinsing solution, and/or temperature
Human [7]	Without medium	-57°C (20 min) → -70°C (48 to 72h) X-irradiated (5h) 25 kGy	-70°C	Saline solution
Human, 4 rings [9]	4 proteccols were done: 1) Glycerol + HES 2) DMSO + HES 3) DMSO + Albumin 4) HES	10°C → -20°C (-10°C/min) -20°C → -40°C (-2°C/min) -40°C → -60°C (-1°C/min) -60°C → -140°C (-5°C/min)	(-140°C) 1 m	Saline solution (37°C)
Nonhuman primates, 5 rings [11]	RPMI-1640 + FBS + DMSO	Room 1: → -4°C (3°C/min); 5 min 4°C → -50°C (1°C/min) -50°C → -80°C (5°C/min) → -80°C (3 h)	(-180°C) 9-12 m	RPMI-1640 + FBS (37°C)
Pig, 2.6 ± 0.2 cm [33]	RPMI-1640 + FBS + DMSO	→ -40°C (2°C/min) -40°C → -140°C (5°C/min)	(-196°C) 1 m	Saline solution + RPMI-1640
Pig, 10-50 mm [3]	TC + DMSO + albumin	→ -40°C (2°C/min) -40°C → -140°C (5°C/min)	(-180°C) 2 w	DMSO solution (40°C)
Dog, 5 rings [8]	RPMI-1640 + FBS + DMSO + HEPES	→ -100°C	(-196°C) 80 d	DMSO solution (37°C)
Dog, 5 rings [5]	TC-199 + DMSO + HEPES	→ -80°C	(-196°C) 1 w-1 m	(40°C)
Dog, 5 rings [15, 17, 18, 35]	DMEM + FBS + DMSO + trehalose	→ -85°C	285 ± 8 d [13, 17, 19] 1 m [34]	Saline solution (37°C)
Dog, 2.5-5 cm [28, 36]	DMEM + FBS + DMSO	→ -90°C (-1°C/min)	(-196°C) 1 w	Ethanol bath, DMEM (37°C)
Dog, 7 rings [16, 24, 30]	DMEM + FBS + DMSO + sucrose	→ -80°C (24 h)	(-196°C) 14-20 d [25, 31] 7d-6 m [18]	(37°C)
Dog, 7 rings [2]	TC-199 + DMSO + HEPES	→ -80°C (-1°C/min)	(-196°C) 1 m	(40°C)
Dog, 5-6 rings [10]	EC solution	→ -60°C (0.01-20 K/min) 15 min	(-196°C) 3-8 w	Warm water + DMSO + EC solution (42°C)
Dog, 7 rings [6]	No preservative solution	—	(-80°C) 1-3 w	(35°C)
Rat, 5 rings [19, 20, 23]	RPMI-1640 with L-glutamine + FBS + DMSO	4°C (60 min)	(-196°C)	(37°C)
Rat, 3 rings [21]	—	4°C → -80°C (-1°C/min)	0 w-12 m [22] 1-3 m [20, 21, 24]	—
Rat, 3 rings [12, 22, 25, 26, 32]	TC-199 + DMSO + HEPES	→ -80°C (-1°C/min)	(-196°C) 1-24 m	(40°C)
Rat, 3 rings [13]	RPMI-1640 with L-glutamine + FBS + DMSO	→ -80°C (-1°C/min)	(1 w-12 m)	(37°C)
Rat 6 rings [14]	RPMI-1640 + FBS + DMSO	-12°C (60 min)	-85°C	ice-cold water

Note: Before cryopreservation, the tracheal treatments used Ringer lactate solution and antibiotics [9], RPMI-1640 with FBS, and antibiotics added [11], DMEM with DMSO, FBS, and sucrose [16], physiologic saline solution [19], and freezing solution [36]. Tissue culture (TC), dimethyl sulfoxide (DMSO), fetal bovine serum (FBS), hydroxyethyl starch (HES), hydroxy-ethyl-piperazine-ethane-sulfonic acid (HEPES), Eurocollins solution (EC), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), d = days, w = weeks, m = months

The epithelial lining of the luminal surface was also negative for MHC class II antigen. The grafts that had lost allogenicity were possibly incorporated into the recipient's trachea. The epithelium of the transplanted cryopreserved tracheal segment leads to the growth of the recipient's epithelium over the donor trachea, thereby reducing the antigenicity of the transplant [12, 32]. The donor epithelia in a tracheal graft is no longer present within about 20 days after transplantation; the recipient's epithelium migrates gradually from the anastomosis site, and the regenerated epithelia from recipient origin covers the allograft within about 50 to 60 days after transplantation [24, 30]. On the other hand, factors other than a reduction of epithelium in cryopreserved tracheal allografts may be associated with a decrease in antigenicity since the epithelium does not always disappear immediately after cryopreservation; even the remaining epithelium that undergoes degeneration after cryopreservation possesses antigenicity, while the remaining epithelium is rejected after allotransplantation. The loss of epithelium in cryopreserved allografts does not therefore necessarily indicate reduced antigenicity. This suggests that cryopreservation has less of an effect on the rejection response than the appropriate immunosuppressant does [19, 21].

Cartilage appears to exert a mild antigenicity attributable to antigenic sites located in the collagen matrix and in the protein core of proteoglycan molecules; this is more obvious if perichondrium is included [7]. Although reduced allogenicity of tracheal allografts by cryopreservation [9, 11, 14, 15, 17, 18, 21] is associated with a decreased viability of chondrocytes and with a tissue-specific antigen on their surface surrounded by a weak antigenic matrix [19, 21, 33], the cartilage retains the structure of the donor trachea [3, 12, 23]. Tojo et al. [32] reported that the MHC class I antigen of the donor rats was expressed in the cartilage of the receptor rats.

## TRACHEAL BLOOD SUPPLY

In general, it is widely accepted that the degree of healing of a graft is related to the blood supply to the organ. Most authors concluded that the ischemic nature of the trachea is the most important

matter of concern in tracheal allotransplantation: It leads to inevitable necrosis and stenosis of the transplanted segment that remains totally ischemic until neovascularization occurs; this is due to the fact that the tracheal vessels are too fine to be reconstructed at the time of transplantation [34]. The results obtained may have been affected by interspecies differences in the blood supply to the trachea: Microcirculation in the tracheal mucosa of rabbits, dogs, rats, and guinea pigs described marked interspecies differences in the vascular bed [11]. Among other methods, vascular pedicles, mainly muscle or omentum flaps, have been used for improving the blood supply to the tracheal transplanted segment. Even so, it seems that omentopexy is not enough to maintain the viability of the graft for a 10-ring tracheal transplantation due to the fact that the blood supply to tracheal grafts is reestablished around the suture line. Ischemic changes are pronounced mainly at the midportion of the graft; there is no ischemic change at the anastomosis site [18]. In animals treated with FK506 and omentopexy, the tracheal mucosa blood flow (TMBF) was measured at the carinal region, the proximal site, and the midportion of the cryopreserved grafts; results showed that TMBF in the cryopreserved grafts returned to normal by 4 weeks after the operation, and this interval was required to accomplish histological healing. TMBF was lower in the midportion of the graft than in either the proximal sites of the trachea, or in the distal sites of the main bronchus; these findings indicate that blood was directly supplied from the omentum via the anastomosis. In order to evaluate the restoration of blood flow in cryopreserved grafts, microangiography was performed: Submucosal revascularization of the cryopreserved grafts from the omentum occurred on postoperative day 5 [6]. Microangiography clearly showed transverse intercartilaginous arteries of the graft, as well as in the recipient trachea, which confirmed that the revascularization between the graft and the recipient bronchial arteries was established 7 days after transplantation. Nevertheless, these arteries had completely disappeared in the 12-week grafts, while numerous newly developed microvasculatures surrounding the graft were visualized [8]. Surgical techniques such as the resection of the recipient trachea where the membranous portion of the

**TABLE 2** Semiquantitative rating scale for assessing the histopathology of tracheal transplants

Histological findings	Score			
	0	1	2	3
Damage to epithelium	Absent	Metaplastic epithelium, partial regeneration (>50%)	Partial excoriation (>50%) Local regeneration (<50%)	Total excoriation
Damage to tracheal glands	Absent	Atrophy, partial regeneration (>50%)	Partial disappearance (>50%) Local regeneration (<50%)	Total disappearance
Damage to cartilaginous rings	Absent	Atrophy of chondrocytes	Destruction of perichondrium	Destruction, disappearance
Damage to interstitium:				
Hemorrhage	Absent	Limited hemorrhage (<30%)	Local hemorrhage (30% to 70%)	Diffuse hemorrhage (>70%)
Edema	Absent	Limited edema (<30%)	Local edema (30% to 70%)	Diffuse edema (>70%)
Infiltration by inflammatory cells	Absent	Limited infiltration (<30%)	Local infiltration (30% to 70%)	Diffuse infiltration (>70%)
Granulation tissue-like reaction with:				
Fibrosis	Absent	Limited distribution (<30%)	Local distribution (30% to 70%)	Diffuse distribution (>70%)
Necrosis	Absent	Limited necrosis (<30%)	Local necrosis (30% to 70%)	Diffuse necrosis (>70%)
Infiltration by mononuclear cells	Absent	Limited infiltration (<30%)	Local infiltration (30% to 70%)	Diffuse infiltration (>70%)

Note. The same six criteria shown in damage to interstitium were used to assess the submucosa, the lamina propria, and the adventitia. The severity of the histological injury was graded semiquantitatively from 0 to 3, with 0 indicating an absence of any abnormality, 1 mild, 2 moderate, and 3 severe changes [6, 34].

graft is left intact with transplantation of a cryopreserved tracheal allograft after the resection of the membranous part [11], and split tracheal transplantation, where grafts are divided at the midportion with omentopexy and revascularization is facilitated from the three anastomosis sites (two original and one center anastomosis) [18] have been proposed in order to improve the blood flow to the tracheal segment.

and epithelia [3, 14], the subepithelial thickness from the epithelium to the cartilage [21], mononuclear cell infiltration [19, 21], and the percentage of graft patency after surgery versus the same graft before surgery [19] have been evaluated. Table 2 shows a histopathological semiquantitative assessment reported by Nakanishi et al. that is valuable for the evaluation of the histological characteristics of the epithelium and of the degeneration of the cartilaginous ring [6, 34].

## CRYOPRESERVED TRACHEAL VIABILITY

In order to evaluate the effect of cryopreservation on tracheal structure and posttransplantation findings, cryopreserved tracheal viability has been assessed through macroscopical findings of gross appearance, through the use of fiber-optic bronchoscopes to observe changes within the trachea, and through histological evaluation. Histologically speaking, epithelial viability [8, 13, 19-23, 26], the score of the number of viable chondrocyte nucleus [8, 9, 13, 19-22, 25], and the regeneration of cartilage

## THE EXPERIMENTAL MODEL AND POST-CRYOPRESERVED TRACHEAL TRANSPLANTATION FINDINGS

In this section, we summarize the findings reported after cryopreserved tracheal grafts were transplanted. The results obtained may be affected by the animal model, the cryopreservation mode and the cryopreservation time, the use of specific cryoprotective agents, the resection length used, and the post-transplantation evaluation time.

## Nonhuman Primate Model

An evaluation of cryopreserved tracheal grafts in nonhuman primates was found in only one study. Tracheal grafts were preserved from 9 to 12 months and results were obtained with a small number of animals ( $n = 3$ ). Cryopreserved tracheal allotransplantation was well incorporated without stenosis, with in all recipient monkeys that were sacrificed on the 35th, 144th, and 387th postoperative day. Although bronchoscopic and macroscopic findings during the early postoperative period revealed mucosa sloughing and slight sputum retention, recovery was uneventful with complete airway patency and good epithelial lining on the luminal surface, which was negative for MCH class II antigens. Macroscopic and histological examination showed no stenosis, with there being a dense epithelial lining and well-maintained cartilaginous viability; a small degree of intercartilaginous tissue shrinkage and of mononuclear cell infiltration in the submucosa layer was also observed. Nevertheless, these infiltrating cells were negative for CD3, MHC class II antigen, and S100 protein. Severe fibrosis and destruction of cartilaginous rings was observed in one animal that received the simple frozen allograft [11].

## Canine Model

Most cryopreserved tracheal allotransplantation experiments have been performed on canine models, mainly with omentum flaps and without immunosuppressive agents, as shown in Table 3. However, contradictory results have been reported. Several authors reported that cryopreserved tracheal allografts after transplantation displayed normal structural integrity, with epithelium covering the graft surfaces and viability of tracheal cartilage. No stenosis or tracheomalacia was observed in dogs that were alive after 2 months [15, 17, 18], 6 months [5, 16, 33, 35, 36], and between 30 and 1062 days [2] posttransplantation. Grafts were edematous 1 week after the operation, though the edema had vanished completely by 1 month after the operation [16]. An epithelial layer without cilia was present next to an epithelial defect, and neither mononuclear cell infiltration nor reabsorption of tracheal cartilage was observed [35]; these results were obtained after tracheal grafts that were preserved 1 week [5, 28], 1 to 3 months [2, 5, 33, 35], and more than 5 to 6 months [15, 17, 18, 35, 36]. Inutsuka et al. [6], Heng et al. [10], and Mukaida et al. [36] reported that all the animals survived from 7 to 57 days [6], from 7 to 198 days [10], and from 7 to 53 days [31] postoperatively, respectively, after

**TABLE 3** Cryopreserved tracheal transplantation design: Experimental model, tracheal transplant, use of muscle or omentum flap, immunosuppressive agents and tracheal stent

<i>Animal model and reference</i>	<i>Cryopreserved tracheal graft</i>	<i>Tracheal transplantation</i>	<i>Flap</i>	<i>Immunosuppression</i>	<i>Stent</i>
Non human primate [11]	Allograft	Orthotopic	-	-	-
Pig [3, 31]	Allograft	Orthotopic	-	-	-
Mongrel dog [6]	Allograft	Orthotopic	+	(FK506)	-
Mongrel dog [2, 5, 10, 15-18, 24, 25, 30, 35, 36]	Allograft	Orthotopic	+	-	-
Mongrel dog [8]	Allograft	Orthotopic	-	-	-
Mongrel dog [28]	Allograft	Heterotopic	+	-	-
Rats: Donor (ACI) recipient (PVG) [31]	Allograft	Orthotopic	-	-	-
Rats: Donor (Lewis) recipient (Brown Norway) [12, 28]	Allograft	Orthotopic	-	-	-
Rats: Donor (Lewis) recipient (Brown Norway) [21]	Allograft	Heterotopic	+	-	+
Rats: Donor (Lewis) recipient (Lewis or Wistar Furth) [19]	Isograft and Allograft	Heterotopic	+	-	+
Brown Norway rats [22]	Isograft	Heterotopic	+	-	-
Lewis rats [13]	Isograft	Heterotopic	+	-	-
F344 rats [14]	Isograft	Heterotopic	+	-	-
Guinea pigs and Brown Norway rats [23]	Xenograft	Heterotopic	+	(FK506)	+

Note: +, With flap, immunosuppression, or stent. -, Without flap, immunosuppressant, or stent.

trachea reconstruction with allografts that were cryopreserved 7 days [35], 3 weeks [6], and from 3 to 8 weeks [10]; three out of five dogs [35], three out of eight dogs [6], and three out of 20 dogs, respectively [10], died of respiratory failure involving stenosis, edema, or malacia within 3 weeks of the operation. Histological observation showed that the grafts from these dogs showed: ischemic changes, including a disappearance of the epithelium and tracheal glands; extensive hemorrhage; granulation with fibrosis; and the destruction of the cartilaginous rings [6, 10]; epithelial defects; and necrotic tracheal cartilage in the scar tissue [35]. On the other hand, dogs treated with FK506 ( $n = 8$ ) survived from 25 to 350 days without anastomotic complications, despite immunosuppressive therapy having been terminated; two of these dogs died of respiratory failure on days 43 and 71, respectively, and one dog died from wasting on day 54 after transplantation. In all the animals (without immunosuppression and with FK506 therapy), the epithelium in the cryopreserved allografts remained intact for 25 days after implantation, and epithelialization of the anastomosis was accomplished within approximately 3 weeks after transplantation [6]. Moriyama et al. [8] reported that some findings suggested slow, ongoing atrophic changes. Examination with a bronchoscope demonstrated no ischemic changes; neither stenosis nor shrinkage was macroscopically perceived at 1 and 12 weeks postoperation in 8/8 animals when transplantation was made with 2-months-cryopreserved tracheal grafts. After 7 days, when a histological study was undertaken, extensive epithelial denudation and subepithelial glands filled with mucus were observed, while neither cartilage cell degradation nor shrinkage was. However, at 12 weeks, although no stenosis was viewed with a bronchoscope, marked longitudinal sections clearly demonstrated overlapping cartilage collocation as a result of shrinkage; these cartilage cells had significantly decreased in number. No cilia were discerned in either type of epithelium, and the tracheal subepithelial glands had disappeared. After a heterotopic tracheal transplant was made, the implanted specimens exhibited a central mucus plug; the epithelium demonstrated well-identified ciliated, mucous and basal cells; and the smooth muscle was viable. The tracheal hyaline cartilages maintained

their horseshoe shape, without disruption of cartilaginous architecture, and there were chondrocyte nuclei in the lacunae [28].

### **Piglet Model**

Two reports of tracheal replacement using cryopreserved grafts in piglets were found. Messineo et al. [33] created a tracheal defect covered by 21-day cryopreserved trachea ( $n = 6$ ), or with a shaped cryopreserved cartilage allograft harvested from the donor's scapula ( $n = 6$ ) in pigs between 4 and 5 weeks of age. In both groups, all the animals survived 2 months postoperatively; the lumen remained open; and no animals suffered from respiratory distress. The coronal size was slightly reduced, though the sagittal lumen was not modified, while the tracheal circumference was reduced. All airways were lined with regenerating epithelium and the cartilage was partially reabsorbed and substituted by fibrous tissue. In Group 1, there were no viable chondrocytes within the matrix, only empty lacunae. In Group 2, the wall was rigid and histologically scattered islands of cartilage were observed. However, Lenot et al. [3] reported that after tracheal transplantation using 2-week-cryopreservation grafts, the mean survival time was 6 days ( $n = 5$ ); all the animals died of complete obstruction of their airway. Grafts were grossly well preserved without anastomotic disruption, and the mechanical properties of the grafts were preserved during the first 5 days. Nevertheless, the common histologic finding was extensive necrosis of the epithelium, submucosa, and cartilage of the grafts with areas of infection. The mucosa and submucosa had disappeared and the cartilage showed vacuoles and dead chondrocytes without nuclei; these lesions induced tracheomalacia. A series of events including bacterial invasion and therefore infection, the development of granulation, and a loss of the elastic properties and inspiratory strength of the cartilaginous wall were also observed.

### **Rabbit Model**

Tanaka et al. [37] evaluated the morphological changes of 7-days-cryopreserved tracheal allografts after transplantation of an orthotopic tracheal



transplantation of seven tracheal rings in a growing rabbit model without immunosuppression. The grafts were at 1 week, 1 month, and 3 months after transplantation. Two out of the seven rabbits died of pneumonia. All the grafts were patent at 3 months, though no allografts showed normal growth in length or diameter. Microscopic findings of the allograft showed calcification of the tracheal cartilage without an infiltration of inflammatory cells or marked lymphocyte proliferation in the subepithelium.

### Rat Model

In most reports, results were obtained after cryopreserved tracheal grafts were transplanted mainly heterotopically. After tracheal grafts were orthotopically transplanted and cryopreserved from 1 week to 24 months [12], from 1 to 3 months [32], and 2 months [26], most animals survived more than from 2 to 3 months. Two out of the 12 rats died within 1 week after the operation [32]. No stenosis or tracheomalacia was observed [12]. Tracheal stenosis was observed in from four to eight rats when the tracheal graft was harvested with more than 12 h of warm ischemia time [26]; the transplanted grafts exhibited normal epithelium [12, 26, 32]. Three days after transplantation, the epithelium had disappeared, and in a week had grown sparsely. Two months after the operation, the epithelium and tracheal cartilage displayed normal histologic structural integrity [32]. The cartilaginous architecture was not disrupted, though it decreased only in the number of nucleated cells in the cartilage [12, 25]. No lymphocytic infiltration was detected in or under the epithelial layer in these segments [32].

After 7 days [14], 3 months [20], and from 0 to 9 months [13, 21] of graft cryopreservation, a heterotopic tracheal transplant model was used. All free tracheal grafts appeared normal and also preserved their lumen rigidity [13, 20, 21]; the epithelium was denuded and had disappeared, irrespective of the length of cryopreservation [13, 22]; and the incidence of normal mucociliary epithelium seemed to decrease according to increasingly warmed ischemia [20]. Although the tracheas showed normal horseshoe shapes with fully viable chondrocytes and intact cartilage matrix, on day 28 a wide range of cellular

defects was observed in the cartilage matrix, which deteriorated over time; the horseshoe shape was ultimately destroyed with a wide absorption of chondrocytes until after 2 months posttransplantation [14]. The viability of the cartilage of the allografts showed an exacerbating trend as the length of cryopreservation increased. Tracheal allograft chondrocytes undergoing cryopreservation had some viable cartilage islands, and also showed new chondrocytes. On the other hand, cryopreserved tracheal allografts of over 6 months had no viable chondrocytes in the nuclei [13, 19–22]. Cryopreserved tracheal xenotransplants with the use of immunosuppression was reported by Hashimoto et al. [23], who evaluated the synergistic effect of cryopreservation and the use of immunosuppression. Experiments were performed with heterotopic transplantation models in guinea pigs and rats; results indicated that the rejection of guinea pigs xenografts in rats is sensitive to FK506, suggesting an important role of T cells in the rejection process.

### DISCUSSION

The management of tracheal pathology may often require tracheal reconstruction, which can be hindered by the lack of sufficient tissue for surgical reconstruction. Although end-to-end anastomosis after resection is the method of choice, its applicability is usually limited, due to the fact that segment defects of 7 cm probably represent the maximum length possible. The problem of tracheal reconstruction after extensive resection is still unresolved and remains one of the most important challenges in tracheal surgery. Many efforts have been made to replace the trachea using prosthetic materials and autologous tissues in both experimental and clinical settings. Up to now, many cells and tissues, such as blood cells, spermatozoa, embryos, pancreatic islet, blood vessels, skin, cornea, and others, have been cryopreserved. Cryopreserved tracheal grafts have been investigated by many authors in order to discover an alternative method for replacing tracheal long segments in several experimental models of transplantation. These methods have been mainly undertaken without immunosuppression. Nevertheless, contradictory results have been reported. We think that

the results might have been affected by the anatomical tracheal size of the animal model, the length of the tracheal cryopreserved graft, the cryopreservation mode, the duration of the cryopreservation, and the type of cryoprotective agents.

Experimental models of tracheal cryopreservation have been made using tracheas obtained from non-human primates, dogs, pigs, rabbits, and rats, with variations in (a) cryopreserved tracheal graft size, (b) the mode of cryopreservation, (c) the application of vascular pedicles in order to improve the blood supply to the transplanted tracheal segment, and (d) the use of immunosuppression after tracheal reconstruction. Some authors reported tracheal treatment before cryopreservation using Ringer lactate solution with antibiotics [9], RPMI-1640 with fetal bovine serum (FBS) [11], Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) plus dimethyl sulfoxide (DMSO), FBS, and sucrose [16], or physiologic saline solution [19]. Although in most studies tracheal segments were frozen and thawed under thermally controlled conditions, the application of different freezing solution, such as hydroxyethylpiperazine-ethanesulfonic acid (HEPES), Eurocollins solution (EC), or Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) has been used as tracheal cryopreservation to keep the osmotic pressure balance and to prevent shock from the cold. DMSO, trehalose, and glycerol have also been used as cryoprotective agents. Damage to tracheal cartilage has nonetheless been reported. The viability of cartilage can be affected by the indefinite duration of its preservation in liquid nitrogen. Nakanishi et al. reported that a permissible period of cryopreservation time is 3 months [12, 25]. Freezing-storage methods affect the function and durability of a graft. Therefore, long-term storage of cartilage must be investigated in more detail in basic research models of cartilage viability, the evaluation of chondrocyte apoptosis, and the application of different freezing solutions other than RPMI-1640, Dulbecco's modified Eagle's, Eurocollins, and TC-199, while taking into consideration that the usefulness of tracheal reconstruction with cryopreserved grafts after extensive resection can be influenced by tracheal intubation damage, warm ischemic time, and the tracheal blood supply to the tracheal transplanted segment.

## CONCLUSIONS

Some reports indicated both a depletion of epithelium and a deterioration of cartilage as an effect of cryopreservation on tracheal grafts. However, after transplantation, the donor epithelia is replaced by the recipient epithelium. Most authors agreed that cryopreservation reduces tracheal allogenicity and maintains the integrity of the smooth muscle, the subepithelial tissue, and the epithelium, along with mucus production and ciliary function. Moreover, a number of experimental reports describing tracheal transplantation after cryopreservation by means of omentopexy without an immunosuppressant suggest that cryopreserved tracheal reconstruction could achieve clinically satisfactory results. Although Kunashak et al. [7] reported the use of cryopreserved irradiated tracheal homografts for laryngeal reconstruction in humans, the mechanism of revascularization is not known, and the method of preservation has not been well established. Some limitations of the procedure must therefore be investigated in more detail in basic research models. Problems associated with methods of tracheal transplantation, the extent of graft resection, the immunosuppressant regimen, the maintenance of the blood supply to the transplanted tissue, and the viability of the cartilage must also be resolved before tracheal cryopreservation can become a clinically established procedure.

## REFERENCES

1. Fuchs J, Nasser B, Vacanti J. Tissue engineering: A 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann Thorac Surg*. 2001;72:577-591.
2. Tojo T, Niwaya K, Sawabata N, et al. Tracheal replacement with cryopreserved tracheal allograft. An experiment in dogs. *Ann Thorac Surg*. 1998;66:209-213.
3. Lenzi B, Macchiarini P, Dulmet E, et al. Tracheal allograft replacement. An unsuccessful method. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1993;7:648-652.
4. Sakata J, Vacanti C, Schloo B, et al. Tracheal composites tissue engineered from chondrocytes, tracheal epithelial cells, and synthetic degradable scaffolding. *Transplantation Proc*. 1994;26:3309-3310.
5. Tojo T, Niwaya K, Sawabata N, et al. Tracheal allogenic immunoresponse is reduced by cryopreservation. Canine experiment. *Transplantation Proc*. 1996;28:1814-1815.



6. Inutsuka K, Kawahara K, Takachi T, et al. Reconstruction of trachea and carina with immediate or cryopreserved allografts in dogs. *Ann Thorac Surg.* 1996;62:1480-1484.
7. Kunachak S, Kulapaditharom B, Vajaradul Y, et al. Cryopreserved, irradiated tracheal homograft transplantation for laryngotracheal reconstruction in human beings. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;122:911-916.
8. Moriyama H, Sasajima T, Hirata S, et al. Revascularization of canine cryopreserved tracheal allografts. *Ann Thorac Surg.* 2000;69:1701-1706.
9. Mabrut J, Adham M, Bourgeot J, et al. Mechanical and histological characteristics of human trachea before and after cryopreservation: An opportunity for tracheal tissue banking. *Transplantation Proc.* 2001;33:609-611.
10. Heng Z, Tse-Chao H, Yun-Zhong Z, et al. Cryopreservation and transplantation of dog trachea. *Ann NY Acad Sci.* 1998;118:270-275.
11. Murakawa T, Nakajima J, Motomura M, et al. Successful allotransplantation of cryopreserved tracheal grafts with preservation of the pars membranacea in nonhuman primates. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;123:153-160.
12. Kushibe K, Nezu K, Nishizaki K, et al. Tracheal allotransplantation maintaining cartilage viability with long-term cryopreserved allografts. *Ann Thorac Surg.* 2001;71:1666-1669.
13. Nakanishi R, Hashimoto M, Muranaka H, et al. Maximal period of cryopreservation with the bicell biofreezing vessel for rat tracheal isografts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;117:1071-1076.
14. Kumon BC, Shiraishi T, Makihata S, et al. Cartilaginous injury limits cryopreservation of tracheal isograft. *Respirol-ogy.* 2000;5:105-110.
15. Yokomise H, Inui K, Wada H, et al. Reliable long-term cryopreservation of trachea for tissue banks. *Transplantation Proc.* 1996;28:1119-1120.
16. Yokomise H, Inui K, Wada H, et al. Reliable cryopreservation of trachea for one month in a new trehalose solution. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;110:382-385.
17. Yokomise H, Inui K, Wada H, et al. Long-term cryopreservation can prevent rejection of canine tracheal allografts with preservation of graft viability. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996;111:930-934.
18. Yokomise H, Inui K, Wada M, et al. Tracheal transplantation in dogs for future clinical application. *Transplantation Proc.* 1996;28:1763-1764.
19. Nakanishi R, Onitsuka T, Shigematsu Y, et al. The immunomodulatory effect of cryopreservation in rat tracheal allotransplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2002;21:890-898.
20. Nakanishi R, Umesue M, Hashimoto M, et al. Limit of warm ischemia time before cryopreservation in rat tracheal allograft. *Ann Thorac Surg.* 2000;70:1800-1805.
21. Nakanishi R, Hashimoto M, Muranaka H, et al. Effect of cryopreservation period on rat tracheal allografts. *J Heart Lung Transplant.* 2001;20:1010-1015.
22. Kushibe K, Tojo T, Sakaguchi H, et al. Assessment of cartilage viability in the cryopreserved tracheal allograft by measurement of  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  incorporation. *Transplantation Proc.* 2000;3:1655-1656.
23. Hashimoto M, Nakanishi R, Umesue M, et al. Feasibility of cryopreserved tracheal xenotransplants with the use of short-course immunosuppression. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;121:241-248.
24. Mukaida T, Shimizu N, Aoe M, et al. Origin of regenerated epithelium in cryopreserved tracheal allotransplantation. *Ann Thorac Surg.* 1998;66:205-208.
25. Kushibe K, Takahama M, Nezu K, et al. Assessment of cartilage viability in long-term cryopreserved tracheal allografts. *Transplantation Proc.* 2001;33:625-626.
26. Kushibe K, Tojo T, Sakaguchi H, et al. Effects of warm ischemia and cryopreservation on cartilage viability of tracheal allografts. *Ann Thorac Surg.* 2000;70:1876-1879.
27. Stöelben E, Harpering H, Haberstroh J, et al. Heterotopic transplantation of cryopreserved tracheae in a rat model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2003;23:15-20.
28. Deschamps C, Trastek VF, Ferguson J, et al. Cryopreservation of canine trachea: Functional and histological changes. *Ann Thorac Surg.* 1989;47:208-212.
29. Kitamura Y, Shimizu N, Aoe M, et al. Allowable warm ischemic time to tracheal extraction for allotransplantation of cryopreserved trachea. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;52:169-174.
30. Mukaida T, Shimizu N, Aoe M, et al. Experimental study of tracheal allotransplantation with cryopreserved grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998;116:262-266.
31. Aoki T, Yamato Y, Tsuchida M, et al. Successful tracheal transplantation using cryopreserved allografts in a rat model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1999;16:169-173.
32. Tojo T, Kitamura S, Gojo S, et al. Epithelial regeneration and preservation of tracheal cartilage after tracheal replacement with cryopreserved allograft in the rat. *J Cardiovasc Surg.* 1998;116:624-627.
33. Messineo A, Filler RM, Bahoric A, et al. Repair of long tracheal defects with cryopreserved cartilaginous allografts. *J Pediatric Surg.* 1992;27:1131-1134; discussion 1134-1135.
34. Nakanishi R, Shirakusa T, Hanayiri T. Early histopathologic features of tracheal allotransplant rejection: A study in nonimmunosuppressed dogs. *Transplantation Proc.* 1994;26:3715-3718.
35. Mukaida T, Shimizu N, Aoe M, et al. Tracheal allotransplantation after varying terms of cryopreservation. *Transplant Proc.* 1998;30:3397-3400.
36. Ueda M, Yokomise H, Wada H, et al. Experimental tracheal transplantation for possible clinical application. *Transplant Proc.* 1997;29:871-873.
37. Tanaka H, Maeda K, Okita Y. Transplantation of the cryopreserved allograft in growing rabbits. *J Pediatric Surg.* 2003;38:1707-1711.