

En un modelo ortotópico de trasplante de tráquea, la irrigación con Euro-Collins proporciona mayor sobrevida al injerto

Dres. M. Boglione, M. Cadario, M. Barrenechea, M. Siminovich, R. Rubio, D. Aguilar

Area Trasplante de Pulmón y Servicio de Anatomía Patológica. Hospital J. P. Garrahan. Buenos Aires.

Resumen

El objetivo de este estudio es investigar la influencia de la irrigación con solución de Euro-Collins en un modelo isogénico de trasplante ortotópico de tráquea con 24 horas de preservación sin omentopexia. Veinticuatro ratas Sprague-Dawley endocriadas, con un peso entre 300 y 340 gramos fueron utilizadas como donantes y receptores. Se analizaron dos grupos; A: tráqueas perfundidas con solución de Euro-Collins durante la ablación; y B: tráqueas ablacionadas sin irrigación con la solución preservante. Los injertos se implantaron ortotópicamente en la región cervical luego de 24 horas de preservación en heladera a 4° C. Se evaluó sobrevida (en días) y alteraciones macro y microscópicas del injerto. La media de sobrevida fue significativamente mayor ($p=0.01$) en los animales del grupo A: 52 ± 36 días, rango 6 - 90 días, comparado con los animales del grupo B: $2,8 \pm 2,4$ días, rango 1 - 7. Dos animales del grupo A fueron sacrificados a los 90 días, límite de sobrevida máxima establecido. Los scores del material obtenido en el momento del deceso o sacrificio fueron 1 para el grupo A y 2,3 para el grupo B, alcanzando una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$). En un modelo de trasplante ortotópico de tráquea cervical, la preservación con Euro Collins es superior a la preservación sin ella; la irrigación con Euro-Collins permite preservar tráqueas a 4° C hasta 24 horas. Los injertos tratados con solución de preservación presentan mayor sobrevida.

Palabras clave: *Trasplante de tráquea - Preservación de injertos - Rata.*

Summary

The aim of this study is to investigate the effectiveness of preserving an orthotopic transplant model of trachea for 24 hours without omentopexy while irrigating it with Euro-Collins solution. Twenty-four Sprague-Dawley rats with a weight between 300 and 340 grams were used as donors and recipients. Two groups were analyzed. Group A: tracheas preserved with Euro-Collins solution, and Group B: tracheas not preserved with Euro-Collins solution. The graft was implanted in orthotopic position within the cervical region after preserving them for 24 hours at 4° C. Survival in days and the macro- and microscopic alterations of the graft were evaluated. Mean survival was significantly higher ($p=0.01$) in Group A (52 ± 36 days, range 6-90 days) as compared with Group B animals (2.8 ± 2.4 days, range 1-7 days). Two animals were sacrificed at 90 days, the limit of maximal survival established. The scores of material obtained at the moment of death or sacrifice was one for Group A and 2.3 for Group B reaching a significant statistic difference ($p < 0.05$). Using a model of orthotopic tracheal transplantation, Euro-Collins solution is superior preserving tracheas at 4° C for 24 hours. Tracheal grafts preserved in Euro-Collins solution survive longer.

Index words: *Tracheal transplant - Graft preservation - Rats*

Resumo

O objetivo deste estudo é investigar a influência da irrigação com soluções de Euro-Collins no modelo isogénico de transplante ortotópico de traquéia com 24 horas de preservação sem omentopexia. Vinte e quatro ratas Sprague-Drawley endocriadas, com peso entre 300 e 340 gramas foram utilizadas como doadores e receptores. Análizaram-se dois grupos: A) traquéias perfundidas com solução de Euro-Collins durante a extirpação; B) Traquéias extirpadas sem irrigação com solução preservante. Os enxertos foram implantados ortotópicamente na região cervical após 24 horas de preservação na geladeira a 4°C. Avaliou-se a sobrevivência (em dias) e alterações macro e microscópicas do enxerto. A média foi significativamente maior ($p < 0.01$) nos animais do grupo A: 52 ± 36 dias, variando de 6 a 90 dias, comparado com os animais do grupo B: $2,8 \pm 2,4$ dias, variando de 1 a 7 dias. dois animais do grupo A foram sacrificados aos 90 dias, limite de sobrevivência máxima estabelecido. Os escores do material obtido no momento do o sacrificio foram 1 para o grupo A e 2,3 para o grupo B, alcançando uma diferença estatisticamente significativa ($< 0,05$). Num modelo de transplante ortotópico de traquéia cervical, a preservação com solução de Euro-Collins é superior á preservação sem ela; a irrigação com Euro-Collins permite preservar traquéias a 4°C até 24 horas. Os enxertos tratados com solução de preservação apresentam maior sobrevida.

Palavras chave: Transplante de traquéia - Preservação de enxertos - Rata.

Introducción

Más del 50% de la tráquea puede ser reseca y anastomosada¹, sin embargo, las complicaciones postoperatorias², muchas veces mortales y la morbilidad de la patología segmentaria de tráquea, observada en estenosis congénitas o post traqueostomía o en las secuelas de lesiones accidentales hacen necesaria la búsqueda de técnicas alternativas de reconstrucción traqueal.

Diversos autores³⁻⁹ han investigado como alternativa el trasplante ortotópico⁴ o heterotópico^{1, 10} de la tráquea, sea mediante anastomosis del pedículo vascular traqueal^{5, 11} o envolviendo el injerto con epiplón^{7, 12, 13}.

Previamente demostramos que el trasplante inmediato ortotópico de tráquea cervical sin omentopexia es posible aún sin irrigación con soluciones de preservación¹⁴, sin embargo, en un modelo con implante heterotópico de tráquea, observamos que la perfusión con Euro-Collins mejora la evolución del injerto, tanto en los implantados inmediatamente o luego de 24 horas de preservación¹⁵. Decidimos entonces investigar la in-

fluencia de la irrigación con solución de Euro-Collins en un modelo isogénico de trasplante ortotópico de tráquea con 24 horas de preservación, sin omentopexia.

Material y método

Veinticuatro ratas Sprague-Dawley endocriadas, con un peso entre 300 y 340 gramos fueron utilizadas como donantes y receptores en un modelo isogénico de trasplante ortotópico de tráquea cervical sin omentopexia. Todos los animales recibieron trato humanizado acorde con los "Principios de Cuidados de Animales de Laboratorio" formulados por la National Society for Medical Research y la "Guía para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio" preparada por la National Academy of Sciences y publicada por el National Institute of Health (NIH publicación 85-23, revisada 1985).

Grupos: Se estudiaron dos grupos (n=6); A: tráqueas perfundidas con solución de Euro-Collins durante la ablación; y B: tráqueas sin irrigación con la solución preservadora. Todas los injertos fueron implantados luego de 24 horas de conservación en heladera a 4°C.

Donante: Doce ratas fueron anestesiadas con la administración intraperitoneal de 20 mg/kg de pentobarbital sódico luego de una inducción con isofluorano al 5 %. Seguidamente, las ratas fueron colocadas en posición supina y sujetadas a la mesa. Recibieron una infusión endovenosa de 1000 UI/kg de heparina por la vena dorsal del pene y se efectuó esternotomía mediana bajo ventilación espontánea; la tráquea fue disecada y ablacionada. En los donantes que recibieron Euro Collins, la aorta ascendente fue canulada, la aorta torácica descendente clampeada a nivel del diafragma y las venas cavas superior e inferior seccionadas. Luego se infundió por la aorta ascendente 20 ml de solución de Euro-Collins fría (4°C) a 20 cm H₂O de presión.

Receptor y procedimiento quirúrgico: Los animales fueron anestesiados con isofluorano al 5 % e inyección subcutánea de ketamina (25 mg / kg), luego intubados con catéter 14 gauge y ventilados con un volumen tidal de 10 ml / kg; frecuencia respiratoria 60 por minuto; presión positiva al final de espiración (PEEP) 1 cm H₂O; fracción inspiratoria de oxígeno (FIO₂) de 100% (Harvard Rodent Ventilator modelo 683). Se efectuó cervicotomía mediana, divulsión de los músculos pretraqueales y disección de la tráquea; un segmento de 5 anillos fue seccionado y fue introducido otro catéter 14 gauge para ventilación en la tráquea distal; el segmento resecoado fue reemplazado por un injerto de tráquea donante de igual longitud mediante anastomosis con sutura continua de poligalactina 910 (Vicryl®) 6/0. Los músculos pretraqueales fueron cuidadosamente unidos con el mismo material; cerrándose la cervicotomía con nylon (Prolene®) 4/0.

Estudio morfológico: Fueron tomadas tres muestras de cada espécimen para estudio microscópico: inmediatamente después de la ablación, antes del implante (al finalizar el período de preservación) y en el momento de la muerte o sacrificio del animal.

Los especímenes fueron fijados en formalina y coloreados con hematoxilina-eosina. Se utilizó un escore de injuria histológica para evaluar la condición de la pared traqueal trasplantada: 0: pared normal; 1: lesiones aisladas del epitelio; 2: necrosis isquémica con o sin hemorragia de la lámina propia; 3: necrosis isquémica de la submucosa; y 4: necrosis isquémica del cartilago¹⁰.

El estudio estadístico se realizó empleando la Prueba T asumiendo varianzas desiguales. Un valor de P menor a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

La media de sobrevida fue significativamente * mayor (p=0.01) en los animales del grupo A (52 +/- 36 días, rango 6 - 90 días) comparado con los animales del grupo B (2,8 +/- 2,4 días, rango 1 - 7). Dos animales del grupo A fueron sacrificados a los 90 días, límite establecido de sobrevida máxima (Tabla 1).

Macroscopia: En el grupo A, a pesar de la presencia de secreción purulenta intraluminal en dos animales, todos los injertos mantenían el tamaño, consistencia, forma y color conservados; por el contrario, los segmentos implantados en las ratas del grupo B se encontraban de color pálido-grisáceo, consistencia disminuida; sin vascularización, con leve disminución de la luz.

Microscopia: Los especímenes obtenidos inmediatamente después de la ablación mostraron una estructura histológica conservada en ambos grupos.

Las muestras procesadas inmediatamente antes del implante presentaban epitelio íntegro y estructura cartilaginosa sin alteraciones en los animales perfundidos con Euro-Collins, mientras que los no perfundidos mostraban áreas de infiltración inflamatoria que ocupaban todo el espesor de la pared (escores de 0,2 y 0,8 respectivamente; p=0,21 NS).

Los escores del material obtenido en el momento del deceso o sacrificio fueron 1 para el grupo A y 2,3

Rata	Grupo A	Grupo B
I	13	5
II	90*	7
III	49	1
IV	6	1
V	90*	2
VI	63	1
Media	52	2,8
Rango	6-90	1-7
Desvío Estándar	+/- 36,4	+/- 2,4

Tabla 1: Sobrevida en días. *Sacrificados. p=0.01 grupo A vs. grupo B.

Grupo	Posablación	Preimplante*	Sacrificio#
A	0	0,2	1
B	0	0,8	2,3

Tabla 2: Score de injuria histológica. * $p=0.21$ (NS). # p menor 0.05 grupo A vs. grupo B.

para el grupo B, alcanzando una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) (Tabla 2). En los especímenes de aquellos animales irrigados con Euro-Collins se observó mucosa conservada sin alteraciones, con cartilago de características normales; dos animales presentaban infiltrado inflamatorio en la submucosa y en la luz vascular. Los injertos que no recibieron Euro-Collins mostraban abundante infiltrado inflamatorio en partes blandas peritraqueales y áreas aisladas de la pared con signos de necrosis.

Discusión

El enfriamiento rápido del órgano para alcanzar una inhibición metabólica reversible, forma la base de la preservación de órganos sólidos previo al trasplante¹⁶, así el pulmón tolera períodos de isquemia de 6 horas¹⁷, el corazón 4, el hígado 20 y el riñón hasta 30 horas¹⁸. Date¹⁹ reportó buenos resultados con el uso de solución de Euro Collins para preservación de autoinjertos traqueales. Por su parte, Macchiarini²⁰ demostró que la irrigación con Euro-Collins de injertos implantados heterotópicamente con anastomosis de su propio pedículo vascular permite preservar el injerto a 4° C hasta 15 horas.

En nuestro estudio todas las muestras obtenidas luego de la ablación, tratadas o no con Euro-Collins, se encontraban normales y las obtenidas luego de 24 horas de isquemia fría mostraban sólo alteraciones leves sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. Contrariamente, los especímenes implantados no tratados con Euro-Collins presentaron daños histológicos significativamente más severos que los tratados con Euro-Collins. Este hecho demuestra que a pesar de no ser revascularizada en forma directa, la tráquea al igual que otros órganos, es sensible también a una injuria de reperfusión y que la irrigación con solución de preservación fría atenúa la respuesta al implante.

Los resultados obtenidos sugieren que los requerimientos metabólicos de la tráquea durante el período de isquemia fría son menores a los del pulmón y similares a otros órganos intraabdominales^{18, 21}.

El hecho que dos animales del grupo A fueran sacrificados a los 90 días, influyó para que la diferencia entre la media de sobrevida de ambos grupos no fuese mayor. Además la presencia en la muestra del grupo A de un desvío estándar amplio, actuó en el mismo sentido.

Cabe destacar que el tiempo de sobrevida más corto de los animales tratados con Euro-Collins (grupo A) fue similar al tiempo de sobrevida más prolongado de aquellos no tratados (grupo B).

Sobin²² y Blanding²³ reportaron que los pedículos vasculares y la distribución arterial en el conejo, perro y la rata es similar al hombre; por ello decidimos canular la aorta y clampearla a nivel del diafragma, para favorecer la irrigación traqueal a través de sus ramas esofágicas, bronquiales, subclavias y tiroideas²⁴.

Utilizamos un modelo isogénico de trasplante para evitar la interferencia del rechazo en la viabilidad del injerto^{12, 25-27}. Por otra parte no efectuamos ningún tipo de anastomosis vascular²⁰ ni de revascularización con omento^{6, 7, 11, 12, 28} en la búsqueda de una técnica quirúrgica simple que supere los eventuales riesgos de intervenciones más complejas. Creemos que los músculos que se apoyan sobre la tráquea permiten un eficaz mecanismo de imbibición.

En un modelo de trasplante ortotópico de tráquea cervical es superior la preservación con Euro Collins a la preservación sin dicha solución.

La irrigación con Euro-Collins a 4° C permite preservar la tráquea hasta 24 horas.

Los injertos tratados con solución de preservación presentan mayor sobrevida.

Bibliografía

1. Delaere P, Ziyang Liu, Hermans R et al: Experimental tracheal allograft revascularization and transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110 (3): 729-737, 1995.
2. Sanguinetti F.: Resecciones, anastomosis e injertos traqueales. Trabajo experimental con diversas técnicas comparadas. *Rev Argen Cirug* 2 (6): 261-267, 1961.
3. Moriyama S, Shimizu N, Teramoto S. Experimental tracheal allotransplantation using omentopexy. *Transplant Proc* 21:

- 2596-2600, 1986.
4. Nakanishi R, Shirakusa T, Takachi T.: Omentopexy for tracheal autografts. *Ann Thorac Surg* 57: 841-845, 1994.
 5. Macchiarini P, Machmanian G, Montpréville V, Dulmet E et al: Experimental tracheal and tracheoesophageal allotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110 (4): 1037-1046, 1995.
 6. Mukaida T, Shimizu N, Aoe M et al. Experimental study for tracheal allotransplantation with cryopreserved grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 116: 262-266, 1998.
 7. Delaere P, Ziyang Liu, Pauwels P et al: Experimental revascularization of airway segments. *Laryngoscope* 104: 736-740, 1994.
 8. Davreux Ch, Chu B, Waddell T, et al: Improved tracheal allograft viability in immunosuppressed rats. *Ann Thorac Surg* 55: 131-134, 1993.
 9. Rose K, Sesterhenn K, Wustrow F.: Tracheal allotransplantation in man. *The Lancet*. 1: 433-436, 1979.
 10. Macchiarini P, Lenot B, Montpreville V et al: Heterotopic pig model for direct revascularization and venous drainage of tracheal allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108 (6): 1066-1075, 1994.
 11. Lenot B, Macchiarini P, Darteville P: Tracheal Transplantation: an experimental technique with revascularization and venous drainage. *Transplantation Proceedings*. 27 (2): 1684-1685, 1995.
 12. Takachi T, Shirakusa T, Shiraishi T, et al: Experimental carinal autotransplantation and allotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110 (3): 762-767, 1995.
 13. Messineo A, Filler R, Bahoric B et al. Successful tracheal autotransplantation with a vascularized omental flap. *J Pediatr Surg* 26 (11): 1296-1300, 1991.
 14. Boglione M, Asprea M, Rubio R et al. Presentación de un modelo experimental de trasplante de tráquea. *Rev Cir Infantil* 7 (1): 7-12, 1997
 15. Boglione M, Morandini M, Siminovich M et al. Comparación de distintos métodos de preservación traqueal. *Rev de Cir Infantil* 10 (1):11-16, 2000.
 16. Van Raemdock D, Jannis N, Rega F, De Leyn P, Flameng W, Lerut T. External cooling of warm ischemic rabbits lungs after death. *Ann Thorac Surg* 1996; 62: 331-7.
 17. Trulock E. State of the Art. Lung Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 789-818, 1997.
 18. D'Alessandro A, Southard J, Love R et al. Organ preservation. En: Kahan BD, ed. *New horizons in organ transplantation*. *Surg Clin North Am* 74: 1083-1095, 1994.
 19. Date M. Experimental studies on canine tracheal preservation. *J Jpn Surg Soc* 91: 1740-1748, 1990.
 20. Macchiarini P, Mazmanian G, de Montpréville VT et al. Maximal preservation time of tracheal allografts. *Ann Thorac Surg* 60: 1597-1604, 1995.
 21. Novick R, Menkis A, McKenzie F et al. New trends in lung preservation: a collective review. *J Heart Lung Transplant* 11: 377-392, 1992.
 22. Sobin S. The microcirculation of the tracheal mucosa. *Anngiology* 14: 165-168, 1963.
 23. Blanding J. The gross morphology of the arterial supply to the trachea of the rabbit. *The Anatomical Record* 148: 611-615, 1964.
 24. Ferreira L. Irrigación de la tráquea. *Rev Argent Cirug* 19: 472-474, 1970.
 25. Yokomise H, Inui K, Wada H, et al: High-dose irradiation prevents rejection of canine tracheal allografts. *J Thorac. Cardio. Surg.* 107 (6): 1391-1397, 1994.
 26. Nakanishi R, Yasumoto K, Shirakusa T: Short-course immunosuppression after tracheal allotransplantation in dogs. *J Thorac. Cardio. Surg.* 109 (5): 910-917, 1995.
 27. Nakanishi R, Yasumoto Kosei.: Minimal dose of cyclosporin A for tracheal allografts. *Ann. Thorac. Surg.* 60: 635-639, 1995.
 28. Delaere P, Liu Z, Feenstra L. Tracheal autograft revascularization and transplantation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 103: 215-221, 1994.
- Trabajo presentado en el 33º Congreso Argentino de Cirugía Pediátrica, noviembre de 1999. Buenos Aires, Argentina.
- Dr. M. Boglione
Pichincha 1850
(1245) Capital
Argentina