

Influencia de la reacción inmunológica y la revascularización en la viabilidad del injerto traqueal

Dres. M. Boglione, M. Cadario, G. Falke, L. Korman, G. Williams, M. Asprea, M. Siminovich, D. Aguilar

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

Resumen

El objetivo del presente estudio es investigar en un modelo de trasplante de tráquea con marcada reacción inmunológica (trasplante alogénico), la influencia del rechazo y de la revascularización en la evolución del injerto. Treinta y tres perros mestizos, con un peso entre 8 y 30 kilogramos fueron utilizados en un modelo alogénico experimental de trasplante de cinco anillos de tráquea cervical, 11 fueron utilizados como donantes, y 22 como receptores. Todas las tráqueas fueron irrigadas con solución de Euro-Collins a 4° C durante la ablación y preservadas durante 24 horas en heladera a la misma temperatura antes de ser implantadas. Grupo I (trasplante heterotópico): Los animales fueron subdivididos en 3 grupos (n=3); grupo Ia: 24 horas en heladera, implante en epiplón; grupo Ib: 24 horas en heladera, congelación 60 días, implante en epiplón; grupo Ic: 24 horas en heladera, congelación 60 días, autoimplante en epiplón. Grupo II (trasplante ortotópico): grupo IIa (n=4): 24 horas en heladera, implante cervical sin omentopexia; grupo IIb (n=5): 24 horas en heladera, congelación 60 días, implante cervical sin omentopexia; grupo IIc (n=4): 24 horas en heladera, congelación 60 días, implante cervical con omentopexia. Dos muestras para estudio microscópico fueron tomadas de cada espécimen: inmediatamente antes del implante (al finalizar el período de preservación) y a los 60 días posimplante o a la muerte del animal. La media de sobrevida fue menor en los animales del grupo IIa (13,5 +/- 9,8 días, rango 1 - 25 días) comparado con los animales del grupo IIb (25,2 +/- 27,1 días, rango 5 - 72) y del grupo IIc (25,5 +/- 16,7 días, rango 12 - 49). Los escores del material obtenido en el momento del sacrificio fueron: grupo Ia: 3; grupo Ib: 3; grupo Ic: 1,3; grupo IIa: 2,75; grupo IIb: 2,2; grupo IIc: 2,5. (p<0.05 grupo Ic vs grupos IIb y IIc y p<0.01 grupo Ic vs grupos Ia, Ib y IIa. La respuesta inmune tiene mayor incidencia en la evolución del injerto que las dificultades eventuales de revascularización. La criopreservación sin crioprotectores retrasa pero no elimina la respuesta inmune.

Palabras clave: Trasplante tráquea – Criopreservación - Immunogenicidad

Summary

Aim of this study is to investigate in an allogenic tracheal transplantation model, the influence of rejection and revascularization on graft outcome. Thirty-three mongrel dogs weighing 8 to 30 kilograms were used in a 5-rings cervical trachea transplantation model; 11 were used as donors and 22 as recipients. All tracheas were irrigated with 4° C Euro-Collins solution during harvest and preserved for 24 hours at 4° C before implantation. Group I: (heterotopic transplant): Animals were assigned to 3 groups (n=3); group Ia: 24 hours at 4° C, implantation into the omentum; group Ib: 24 hours at 4° C, cryopreservation for 60 days, implantation into the omentum; group Ic: 24 hours at 4° C, cryopreservation for 60 days, autoimplantation into the omentum. Group II (orthotopic transplant): group IIa (n=4): 24 hours at 4° C, cervical implantation without omentopexy; group IIb (n=5): 24 hours at 4° C, cryopreservation for 60 days, cervical implantation without omentopexy; group IIc (n=4): 24 hours at 4° C, cryopreservation for 60 days, cervical implantation with omentopexy. Two samples for histological examination

were taken from each specimen: immediately before implantation (when preservation period finished) and at 60 days postimplantation or at animal death. Mean survival time was shorter in group IIa dogs (13.5 +/- 9.8 days, range 1 - 25 days) compared with IIb (25.2 +/- 27.1 days, range 5 - 72) and group IIc (25.5 +/- 16.7 days, range 12 - 49) dogs. Histological score of the specimen obtained at sacrifice or death were: group Ia: 3; group Ib: 3; group Ic: 1.3; group IIa: 2.75; group IIb: 2.2; group IIc: 2.5. ($p < 0.05$ group Ic vs groups IIb and IIc; and $p < 0.01$ group Ic vs group Ia, Ib and IIa). Immune response plays a more important role in graft outcome than that played by the eventual difficulties in revascularization. Cryopreservation without cryoprotectants does retard, but not eliminate the immune response.

Index words: Tracheal transplant - Cryopreservation - Immunogenicity

Resumo

O objetivo do presente estudo é investigar em um modelo de transplante de traquéia com acentuada reação imunológica (transplante alogênico), a influência da rejeição e da revascularização na evolução do enxerto. Trinta e três cães mestiços, com peso entre 8 e 30 Kg foram utilizados em um modelo alogênico experimental de transplante de cinco anéis de traquéia cervical, 11 foram utilizados como doadores, e 22 como receptores. Todas as traquéias foram irrigadas com solução de Euro-Collins a 4°C durante a retirada e preservadas 24 horas em geladeira a mesma temperatura antes de serem implantados. Grupo I (transplante heterotópico): os animais foram subdivididos em 3 grupos (n=3); grupo Ia: 24 horas em geladeira, implante em epíplon; grupo Ib: 24 horas em geladeira, congelação 60 dias, implante em epíplon; grupo Ic: 24 horas em geladeira, congelação 60 dias, autoimplante em epíplon. Grupo II (Transplante ortotópico): grupo IIa (n=4): 24 horas em geladeira, implante cervical sem omentopexia; grupo IIb (n=5): 24 horas em geladeira, congelação em 60 dias, implante cervical sem omentopexia; grupo IIc (n=4): 24 horas em geladeira, congelação 60 dias, implante cervical com omentopexia. Duas amostras para estudo microscópico foram retiradas de cada espécime: imediatamente antes do implante (ao finalizar o período de preservação) e aos 60 dias pós-implante ou à morte do animal. A média de sobrevivência foi menor nos animais do grupo IIa (13.5 +/- 9.8 dias, média 1-25 dias/comparado com os animais do grupo IIb 25.2 +/- 27.1 dias, média 5-72) e do grupo IIc (25.5 +/- 16.7 dias, média 12-49). Os resultados do material obtido no momento do sacrifício foram: grupo Ia: 3; grupo Ib: 3; grupo Ic: 1.3; grupo IIa: 2.75; grupo IIb: 2.2; grupo IIc: 2.5 ($p < 0.05$ grupo Ic vs grupo IIb e IIc e $p < 0.01$ grupo Ic vs grupos Ia, Ib e IIa). A resposta imune tem maior incidência na evolução do enxerto que as dificuldades eventuais da revascularização. A criopreservação sem crioprotetores atrasa, porém não elimina a resposta imune.

Palavras chaves: Transplante traqueal. Criopreservação, Imunogenicidade

Introducción

La reconstrucción traqueal es necesaria en casos de estenosis extensa secundaria a enfermedades congénitas, intubación prolongada, traqueostomía, traumatismos o neoplasias. Varios autores¹⁻⁵ han investigado como una alternativa a la cirugía convencional el empleo de trasplante utilizando diferentes estrategias: trasplante ortotópico¹, heterotópico^{2, 6}, omentopexia^{5, 7}, anastomosis del pedículo vascular traqueal^{3, 4, 8}, irrigación del injerto⁹ y criopreservación^{10, 11}.

Muchos autores consideran la revascularización^{1, 12, 13} y la reacción inmunológica del huésped^{5, 14-17} como los obstáculos principales para la aplicación clínica del mismo.

En estudios previos demostramos que el trasplante inmediato ortotópico de tráquea cervical sin omentopexia es posible aún sin irrigación con soluciones de preservación¹⁸, sin embargo, en un modelo isogénico heterotópico de trasplante de tráquea observamos que la perfusión con Euro-Collins mejora la evolución del injerto tanto en aquellos implantados inmediata-

mente como con 24 horas de preservación¹⁹. Luego observamos que la irrigación con solución de Euro-Collins también es beneficiosa en el trasplante isogénico ortotópico de tráquea con 24 horas de preservación sin omentopexia²⁰.

El objetivo del presente estudio es investigar en un modelo de trasplante con marcada reacción inmunológica (trasplante alogénico), la influencia del rechazo y de la revascularización en la evolución del injerto.

Material y método

Animal: Treinta y tres perros mestizos, con un peso entre 8 y 30 kilogramos fueron utilizados en un modelo alogénico experimental de trasplante de tráquea, 11 fueron utilizados como donantes, y 22 como receptores. 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: Todas las tráqueas fueron irrigadas con solución de Euro-Collins a 4° C durante la ablación y preservadas durante 24 horas en heladera a la misma temperatura antes de ser implantadas (grupos Ia y Ib) o congeladas a -70° C durante 60 días para posteriormente ser implantadas (grupos Ib, Ic, IIb y IIc).

Grupo I (trasplante heterotópico): Los animales fueron subdivididos en 3 grupos (n=3); grupo Ia: 24 horas en heladera, implante en epiplón; grupo Ib: 24 horas en heladera, congelación 60 días, implante en epiplón; grupo Ic: 24 horas en heladera, congelación 60 días, autoimplante en epiplón.

Grupo II (trasplante ortotópico): grupo IIa (n=4): 24 horas en heladera, implante cervical sin omentopexia; grupo IIb (n=5): 24 horas en heladera, congelación 60 días, implante cervical sin omentopexia; grupo IIc (n=4): 24 horas en heladera, congelación 60 días, implante cervical con omentopexia.

Donante: Once caninos fueron anestesiados con la administración intramuscular de 20 mg/kg de ketamina seguido de una inducción con isofluorano 3 %. Como mantenimiento anestésico se utilizó isofluorano al 1-2 %, fentanilo 2 gamas/kg y bromuro de pan-

cunonio 0,01 mg/kg. Bajo intubación endotraqueal, fueron colocados en posición supina y sujetos a la mesa. Recibieron una infusión endovenosa de 300 UI/Kg de heparina aplicada en una vena periférica y se llevó a cabo una esternotomía mediana. En los donantes que recibieron Euro Collins la aorta ascendente fue canulada, la aorta torácica descendente clampedada a nivel del diafragma y las venas cavas superior e inferior seccionadas. Luego se infundió por la aorta ascendente solución de Euro-Collins fría (4°C) hasta observar la salida de la misma sin restos de sangre por vena cava. Luego la tráquea fue disecada y ablacionada. En el grupo de autotrasplante, se seccionó un segmento de 5 anillos de la tráquea cervical, éste se irrigó "ex vivo" con Euro-Collins a 4° C y se efectuó una anastomosis término-terminal de los cabos traqueales con material reabsorbible empleando sutura continua en la porción membranosa y puntos separados en equis en la porción cartilaginosa.

Receptor y procedimiento quirúrgico: Los animales fueron anestesiados de igual manera que los donantes. En los animales del grupo I, una laparotomía mediana supraumbilical permitió extraer el epiplón y envolver en él un segmento traqueal de cinco anillos; luego de fijar la envoltura con puntos separados de nylon (Prolene®) 4/0 fue reintroducido en la cavidad. El cierre del abdomen se llevó a cabo con sutura continua de poligalactina 910 (Vicryl®) 2/0 y nylon (Prolene®) 3/0.

En los animales del grupo II se llevó a cabo una cervicotomía mediana, con divulsión de los músculos pretraqueales y disección de la tráquea; un segmento de 5 anillos fue seccionado y un segundo tubo endotraqueal para ventilación fue introducido en la tráquea distal; luego el segmento resecado fue reemplazado por un injerto de igual longitud de tráquea donante mediante anastomosis de ambos cabos con sutura continua de poligalactina 910 (Vicryl®) 4/0. Los músculos pretraqueales fueron cuidadosamente unidos con el mismo material; finalmente se cerró la cervicotomía con nylon (Prolene®) 4/0. En el subgrupo c mediante laparotomía mediana supraumbilical se disecó un colgajo pediculado de epiplón que se lo movilizó a través del tórax en forma retroesternal hasta el cuello para envolver el injerto, donde se lo fijó con puntos separados de poligalactina 910 (Vicryl®) 4/0.

Criopreservación: Los especímenes fueron coloca-

dos en recipientes de vidrio estériles sin ninguna solución de preservación y conservadas a -70°C por 60 días. Previo a ser implantadas, fueron entibiadas colocando el recipiente de vidrio en un baño de agua a 37°C durante 10 minutos.

Estudio morfológico; Los especímenes fueron recolectados a los 60 días posimplante o a la muerte del animal. Todos los injertos fueron evaluados macroscópicamente.

Dos muestras para estudio microscópico fueron tomadas de cada espécimen: inmediatamente antes del implante (al finalizar el período de preservación) y a los 60 días posimplante o a la muerte del animal.

Los especímenes fueron fijados en formalina y coloreados con hematoxilina-eosina y analizados por un observador externo (sin conocimiento de la correlación entre grupo y método de preservación). 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 cartílago⁶.

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 menor en los animales del grupo IIa (13,5 $\pm$ 9,8 días, rango 1 - 25 días) comparado con los animales del grupo IIb (25,2 $\pm$ 27,1 días, rango 5 - 72) y del grupo IIc (25,5 $\pm$ 16,7 días, rango 12 - 49), sin embargo, esta diferencia no alcanzó niveles estadísticamente significativos ($p=0.13$ NS) (Tabla 1).

Macroscopía: Los injertos del grupo Ia y Ib mostraban disminución del diámetro luminal con penetración del epiplón hacia la luz traqueal. Los especímenes del grupo Ic mostraban luz traqueal conservada, cartílagos indemnes y ocupación de la tráquea por el omento. En el grupo II los injertos obtenidos en el momento del sacrificio o muerte del animal mostraban estenosis marcada de la luz (5 % del diámetro de la luz traqueal vecina). Un animal del grupo IIb que falleció el 5° día posoperatorio mostraba la luz del injerto ocupada por abundante secreción purulenta.

Perro	Grupo IIa	Grupo IIb	Grupo IIc
I	1	72	49
II	13	5	15
III	25	21	12
IV	15	8	26
V	-	20	-
Media	13,5	25,2	25,5
Rango	1 - 25	5 - 72	12 - 49
Desvío Estándar	$\pm$ 9,8	$\pm$ 27,1	$\pm$ 26,7

Tabla 1: Sobrevida en días. $p=0.13$ (NS) grupo IIa vs. Grupos IIb y IIc.

Grupo	Preimplante	Sacrificio [‡]
Ia	0	3
Ib	1	3
Ic	-	1,3
IIa	0	2,7
IIb	0	2,2
IIc	1	2,5

Tabla 2: Score injuria histológica.

* p menor 0.05 grupo Ic vs. grupos IIb y IIc.

* p menor 0.01 grupo Ic vs. grupos Ia, Ib y IIa.



Fig. 1: Histoarquitectura normal de la pared traqueal (10x).

Microscopía: Las muestras procesadas inmediatamente antes del implante presentaban características normales (escore 0) (figura 1), excepto en los grupos Ib y IIc que mostraban lesiones aisladas del epitelio



Fig. 2: Necrosis del epitelio y la submucosa con infiltrado fibrinoleucocitario e inflamatorio crónico en el tejido colágeno remanente y hemorragia extensa.

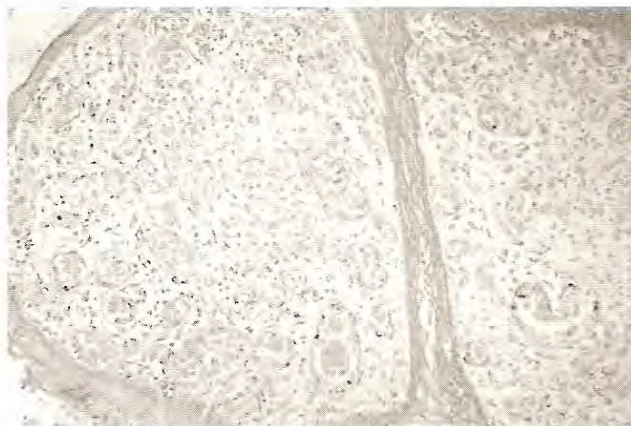


Fig. 3: Submucosa conservada con congestión y dilatación vascular en la misma.

(escore 1). En el grupo Ic (autotrasplante) no se tomaron muestras del injerto previo al implante ya que la ablación del mismo se llevó cabo preservando al máximo la tráquea remanente para disminuir el riesgo de dehiscencia de la anastomosis término-terminal.

Los escores del material obtenido en el momento del sacrificio fueron: grupo Ia: 3; grupo Ib: 3; grupo Ic: 1,3; grupo IIa: 2,75; grupo IIb: 2,2; grupo IIc: 2,5. ($p < 0.05$ grupo Ic vs grupos IIb y IIc y $p < 0.01$ grupo Ic vs grupos Ia, Ib y IIa (Tabla 2).

Los hallazgos en los especímenes más dañados fueron necrosis o desaparición del epitelio y la submucosa con infiltrado fibrinoleucocitario e inflamatorio crónico en el tejido colágeno remanente y hemorragia extensa (figura 2). Los injertos con submucosa conservada presentaban congestión y dilatación vascular en la misma (figura 3).

Discusión

El enfriamiento rápido del órgano para alcanzar una inhibición metabólica reversible forma las bases de toda preservación de órganos sólidos previo al trasplante²¹, así el pulmón tolera periodos de isquemia de 6 horas²², el corazón 4, hígado 20 y riñón hasta 30 horas²³. En nuestro laboratorio obtuvimos buenos resultados con el uso de injertos traqueales preservados por 24 horas luego de irrigados con solución de Euro Collins^{19, 20}. Por otra parte, la criopreservación prolongada (mayor a 30 días) disminuiría la inmunogenicidad del injerto^{24, 25}, de esta manera, se evitaría la necesidad de inmunosupresión, hecho que mejoraría la calidad de vida del paciente trasplantado, y eliminaría la contraindicación al trasplante de aquellos pacientes con neoplasias de la vía aérea²⁶. Debido a esto diseñamos un modelo alogénico de trasplante para evaluar la interferencia del rechazo en la viabilidad del injerto.

La mayor sobrevida observada en los grupos IIb y IIc (injertos criopreservados) comparados con el grupo IIa (no criopreservados) sugiere que la congelación retrasa la aparición de rechazo aunque no la elimina por completo; otros autores consideran que esta aparición tardía corresponde a formas de rechazo crónico²⁷. Del mismo modo, la sobrevida similar en los grupos IIb (sin omentopexia) y IIc (con omentopexia) demuestra que la dificultad de revascularización del injerto no influye negativamente en la evolución del mismo. Más aún, los mejores resultados histológicos del grupo de tráqueas criopreservadas autotrasplantadas (grupo Ic) avalan este concepto.

Si bien las muestras estudiadas al finalizar el período de preservación muestran que la isquemia fría y la congelación no dañan la estructura de la mucosa, del análisis de los especímenes de los grupos Ia y Ib se desprende que este modelo no es útil para evaluar evolución alejada del injerto ya que a los 60 días posimplante las lesiones histológicas de los grupos no criopreservados y criopreservados es similar.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la respuesta inmune tiene mayor incidencia en la evolución del injerto que las dificultades eventuales de revascularización y que la criopreservación sin crioprotectores retrasa pero no elimina la respuesta inmune.

Bibliografía

1. Nakanishi R, Shirakusa T, Takachi T: Omentopexy for tracheal autografts. *Ann Thorac Surg* 57: 841-845, 1994.
2. Macchiarini P, Machmanian G, Montpréville V et al: Experimental tracheal and tracheoesophageal allotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110 (4): 1037-1046, 1995.
3. Delaere P, Ziyang Liu, Hermans R et al: Experimental tracheal allograft revascularization and transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110 (3): 728-737, 1995.
4. Delaere P, Ziyang Liu, Pauwels P et al: Experimental revascularization of airway segments. *Laryngoscope* 104: 736-740, 1994.
5. Davreux Ch, Chu B, Waddell T, et al: Improved tracheal allograft viability in immunosuppressed rats. *Ann Thorac Surg* 55: 131-134, 1993.
6. Macchiarini P, Lenot B, Montpréville V et al: Heterotopic pig model for direct revascularization and venous drainage of tracheal allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108 (6): 1066-1075, 1994.
7. Takachi T, Shirakusa T, Shiraishi T, et al: Experimental carinal autotransplantation and allotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110 (3): 762-767, 1995.
8. Lenot B, Macchiarini P, Darteville P: Tracheal Transplantation: an experimental technique with revascularization and venous drainage. *Transplantation Proceedings* 27 (2): 1684-1685, 1995.
9. Date M. Experimental studies on canine tracheal preservation. *J Jpn Surg Soc* 91: 1740-1748, 1990.
10. Messineo A, Filler R, Smith Ch et al. Cryopreservation of pig trachea. *Pediatr Surg Int* 8: 476-479, 1993.
11. Torres Rodríguez T, Santill Doherty P, Sotres A et al. Criopreservación de tráquea. Estudio experimental. *Rev Guat Cirug* 2 (1): 18-22, 1993.
12. Gaissert H, Mathisen D, Grillo H, et al: Tracheobronchial sleeve resection in children and adolescents. *J Pediatr Surg* 29 (2): 192-198, 1994.
13. Smith D, Waddell T, DeCampos K, et al: Effect of methylprednisolone on angiogenesis in syngeneic rat tracheal grafts. *Ann Thorac Surg* 57: 652-656, 1994.
14. Yokomise H, Inui K, Wada H, et al: High-dose irradiation prevents rejection of canine tracheal allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 107 (6): 1391-1397, 1994.
15. Nakanishi R, Yasumoto K, Shirakusa T: Short-course immunosuppression after tracheal allotransplantation in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 109 (5): 910-917, 1995.
16. Nakanishi R, Yasumoto K, Kosei: Minimal dose of cyclosporin A for tracheal allografts. *Ann Thorac Surg* 60: 635-639, 1995.
17. Hashimoto M, Nakanishi R, Umesue M et al. Feasibility of cryopreserved tracheal xenotransplants with the use of short-course immunosuppression. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121 (2): 241-248, 2001.
18. 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.
19. Boglione M, Morandini M, Siminovich M et al. Comparación de distintos métodos de preservación traqueal. *Rev Cir Infantil* 10 (1): 11-16, 2000.
20. Boglione M, Cadario M, Barrenechea M et al. En un modelo ortotópico de trasplante de tráquea, la irrigación con Euro-Collins proporciona mayor sobrevida al injerto. *Rev Cir Infantil* 10 (2): 76-80, 2000.
21. Van Raemdonck D, Jannis N, Rega F et al: External cooling of warm ischemic rabbits lungs after death. *Ann Thorac Surg* 1996; 62: 331-7.
22. Trulock E. State of the Art. Lung Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 789-818, 1997.
23. 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.
24. 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* 111: 930-934, 1996.
25. Tojo T, Niwaya K, Sawabata N et al. Tracheal allogeneic immunoreponse is reduced by cryopreservation: canine experiment. *Transplant Proc* 28 (3): 1814-1815, 1996.
26. Delaere P, Liu Z, Feenstra L. Tracheal autograft revascularization and transplantation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 103: 215-221, 1994.
27. Moriyama H, Sasajima T, Hirata S et al. Revascularization of canine cryopreserved tracheal allografts. *Ann Thorac Surg* 69: 1701-1706, 2000.

Trabajo presentado en el IV Congreso del Cipesur. Noviembre de 2001, Montevideo, Uruguay.

Dr. M. Boglione
Pichincha 1850 (1245)
Buenos Aires, Argentina