



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Expresión de TGF- β 1 y deposición de colágena en cicatriz traqueal después de la aplicación de diferentes moduladores de la cicatrización postraqueoplastía. Estudio experimental.

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A:

MARIANA SILVA MARTÍNEZ

Asesores:
M en C J. Raúl Olmos Zuñiga
MC Rogelio Jasso Victoria



Ciudad de México

Marzo 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por estar siempre conmigo y confiar en mí, por enseñarme a nunca darme por vencida, porque gracias a ellos he logrado ser la persona que soy ahora.

A mi hermano Diego por enseñarme a defender mis sueños y disfrutar todos los momentos de la vida.

A mis tías Rocío y Marcela por siempre apoyarme en cualquier momento de la vida, y por ser un ejemplo a seguir.

Al Dr. Olmos por ser mi tutor y confiar en mí, por todas sus enseñanzas y por brindarme un enfoque diferente de lo que debe ser un MVZ.

A los integrantes del Departamento de Cirugía Experimental: Dr. Jasso, Dra. Matilde, Dra. Claudia, MVZ Sergio Martínez y Beto Rueda, por todas sus enseñanzas y apoyo.

A todos mis compañeros del INER que formaron parte de este proyecto, en especial a Axel por compartirme todos sus conocimientos y ser una parte importante de mi formación y a Jazmín, Beto y Adrián por brindarme su amistad y hacer los momentos de trabajo agradables.

Al Dr. Alberto Pizaña Jefe del Bioterio del INER y a Jazmín Calyeca por todo su apoyo, consejos y ayuda.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	2
1.1 Anatomía y fisiología de la tráquea	2
1.2 Cicatrización.....	4
1.3 Factor de Crecimiento Transformante (TGF- β).....	8
1.4 Fisiopatología de las cicatrices fibróticas	11
1.5 Estenosis traqueal (diagnóstico y tratamiento).....	12
1.6 Moduladores de la cicatrización	14
Mitomicina C.	14
Colágeno- polivinilpirrolidona	15
Pirfenidona	15
2 JUSTIFICACIÓN	16
3 HIPÓTESIS	17
4 OBJETIVOS	18
5 MATERIAL Y MÉTODOS	19
5.1 Animales de experimentación	19
5.2 Grupos de estudio.....	20
5.3 Anestesia	21
5.4 Técnica quirúrgica.....	22
5.5 Tratamiento	24
5.6 Evaluación.....	24
6 RESULTADOS	32
6.1 Hallazgos clínicos	33

6.2 Hallazgos macroscópicos.....	35
6.3 Hallazgos morfométricos.....	37
6.4 Hallazgos microscópicos.....	40
6.5 Hallazgos inmunohistoquímicos.....	47
6.6 Hallazgos bioquímicos	49
7 DISCUSIÓN	50
8 CONCLUSIONES	66
9 REFERENCIAS	67

RESUMEN

SILVA MARTÍNEZ MARIANA. Expresión de TGF β -1 y deposición de colágena en cicatriz traqueal después de la aplicación de diferentes moduladores de la cicatrización postraqueoplastía. Estudio experimental. M en C J. Raúl Olmos Zuñiga y MC Rogelio Jasso Victoria.

La estenosis traqueal (ET) es una disminución de la luz traqueal, ocasionada por fibrosis precedidas de una inflamación prolongada, incremento en la expresión del factor de crecimiento transformante beta 1(TGF- β 1) y deposición de colágena (DC). Su tratamiento es con procedimientos endoscópicos y quirúrgicos, solos o en combinación con la aplicación de moduladores de la cicatrización (MDC); sin embargo, esto no ha evitado las reestenosis, lo que justifica buscar MDC que la eviten. La pirfenidona (PIRFE) y colágeno polivinil-pirrolidona (CPVP) disminuyen la fibrosis, por lo que su uso postcirugía podría evitar las ET. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la administración de PIRFE (VO) por 4 semanas y la aplicación tópica de una dosis de CPVP sobre los cambios macroscópicos, microscópicos, expresión de TGF- β 1 y DC en cicatrices traqueales de ratas con resección y anastomosis termino-terminal de tráquea cervical (traqueoplastía). Cincuenta ratas Wistar con traqueoplastía cervical, divididas en 5 grupos (n=10), tratadas con: Grupo I: SSF, Grupo II: CPVP, Grupo III: Mitomicina C, Grupo IV: 20 mg/kg PIRFE y Grupo V: 40 mg/kg PIRFE. Se valoró la cicatrización macroscópica y microscópicamente, expresión de TGF- β 1 y DC. Los animales tratados con CPVP y PIRFE desarrollaron menor ET, inflamación y fibrosis que los otros grupos de estudio ($p < 0.05$ Kruskal Wallis) y menor expresión de TGF- β 1 y DC que el grupo I ($p < 0.05$ ANDEVA, Tukey). Conclusión. La CPVP y la PIRFE disminuyen la inflamación, fibrosis, expresión de TGF β -1 y deposición de colágena en la cicatriz postraqueoplastía de ratas.

Palabras clave: Estenosis traqueal, TGF- β 1, deposición de colágena, pirfenidona (PIRFE), Colágena polivinil pirrolidona (CPVP)

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Anatomía y Fisiología de la tráquea

La tráquea es un órgano tubular flexible que permite el paso, filtración, humidificación y calentamiento del aire que va hacia los pulmones. Se extiende desde la faringe hasta la mitad del tórax, por lo que tiene una porción cervical y una torácica, en donde se divide en dos bronquios principales (1).

Este órgano se encuentra formado de una porción cartilaginosa y una membranosa. La pared de la porción cartilaginosa está compuesta por cuatro capas: mucosa, submucosa, cartilaginosa y adventicia en la porción cervical y una serosa en la torácica (2).

La capa más interna es la mucosa, la cual contribuye al acondicionamiento del aire inspirado y está compuesta por epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, células ciliadas, caliciformes y basales, así como una lámina propia constituida por fibras elásticas reticulares. La siguiente capa es la submucosa compuesta principalmente por tejido conectivo laxo, tejido linfático y vasos sanguíneos. La capa cartilaginosa está compuesta por cartílago hialino, fibras de colágena tipo II, así como la matriz extracelular (MEC). La MEC está constituida por un conjunto de proteínas extracelulares como colágena, elastina, proteoglicanos (PGs) y glicosaminoglicanos (GAG). Esta provee la base mecánica para la adhesión, así como para la migración celular; mientras la colágena y la elastina proporcionan las propiedades mecánicas de los tejidos, así como la capacidad de resistir la tensión, compresión, extensibilidad y torsión. Los PGs tienen una función estructural y

sobre el metabolismo, mientras que los GAG en conjunto con los primeros, sirven de puentes de unión entre los componentes de la matriz y las células (3-8).

La porción membranosa de la tráquea está compuesta de fibras musculares lisas transversales (músculo traqueal) y tejido conectivo elástico, lo que permite la estabilización de los extremos abiertos de los anillos cartilagosos. En la porción más externa se encuentra la adventicia (tráquea cervical) o serosa (tráquea torácica), la cual une a este órgano con las estructuras subyacentes y contiene la arteria tiroidea inferior y las ramas de la subclavia, las cuales penetran entre la unión de la porción membranosa y cartilaginosa (formando plexos), además del nervio laríngeo recurrente, así como los vasos linfáticos que la drenan.

Es necesario mencionar que la tráquea al igual que cualquier otro órgano del cuerpo, no está exento de sufrir lesiones, las cuales requieren de un proceso de cicatrización, que si se presenta de manera coordinada, desarrollará una cicatriz adecuada; pero si este se altera, puede ocasionar anomalías en la MEC y alterar las propiedades morfológicas y mecánicas de los mismos, así como cambios en el transporte de aire hacia los pulmones. También es importante mencionar que existen tres factores que son determinantes para la reparación del cartílago traqueal y son: el tamaño del defecto, la madurez del cartílago y la posición del defecto sobre la superficie. Incluso bajo condiciones óptimas la reparación de los defectos del cartílago hialino, es difícil debido a su bajo grado de división de los condrocitos (9).

1.2 Cicatrización

La cicatrización es un proceso de reparación o regeneración de un tejido dañado mediante una cicatriz o un tejido igual al existente previo a la lesión, con el fin de restablecer la continuidad anatómica y funcional (10-13). Este es un proceso dinámico, continuo y complejo, en el que interactúan diferentes células (sanguíneas y de la matriz extracelular) y mediadores químicos (citocinas y factores de crecimiento) que influyen en la estructura de la cicatriz (14). Aunque el proceso de la cicatrización de las heridas varía entre los diferentes tipos de tejidos, hay más similitudes que diferencias entre ellos; no obstante muchos de los autores que se han dedicado a estudiar la cicatrización en la tráquea y bronquios mencionan que ésta sólo cuenta con 3 fases ya que incluyen la hemostasia (que se menciona en la cicatrización de la mayoría de los tejidos) dentro de la primera fase. De esta forma la cicatrización de la tráquea y bronquios la dividen en las siguientes fases: inflamación, proliferación y remodelación, en las cuales se producen una serie de eventos interrelacionados en los que las plaquetas, factores de crecimiento, células inflamatorias, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales interactúan para restaurar el tejido lesionado (10,15,16).

Inflamación

Esta fase se presenta como resultado de la exposición del tejido subendotelial e inicialmente es asociada con el control del sangrado y la coagulación (16) y se inicia con la vasoconstricción, seguida de la activación plaquetaria, formación de trombos de fibrina y concluye con la activación de la cascada de la coagulación (17). El coágulo que se forma contiene fibrina, trombina, colágeno, fibronectina,

células y plaquetas, que libera diferentes mediadores químicos necesarios para el proceso de cicatrización. En esta etapa, las plaquetas liberan citocinas y factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), derivados del ácido araquidónico los cuales inician la quimiotaxis de neutrófilos, macrófagos, células del músculo liso y fibroblastos. Además, estimulan la mitogénesis de los fibroblastos, células musculares lisas y otras células productoras de matriz para asegurar una rápida deposición de nuevo tejido conectivo en el sitio de la lesión (16,18,19).

Dentro de las células que participan en esta fase se encuentran los neutrófilos, que llegan al sitio de la lesión por el estímulo de prostaglandinas, complemento, IL-1, TNF- α , TGF- β y productos bacterianos (20), los cuales inician la eliminación de detritos de la herida mediante fagocitosis continua, secreción de proteasas que descomponen las bacterias y la MEC del foco de lesión y cumplen con la eliminación de bacterias (10). Además, perpetúan la fase inicial de la inflamación mediante la liberación de prostaglandinas, interleucinas (IL) 1 y 6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (16,18-20). Con el paso del tiempo, los neutrófilos son eliminados de la herida por apoptosis o por fagocitosis de los macrófagos. Llegan a su máximo nivel de expresión a las 48 horas.

De 48 a 96 horas después de la lesión, los monocitos del tejido se extravasan para convertirse en macrófagos. Los macrófagos, además de actuar como los neutrófilos, representan una fuente importante de citocinas y factores de

crecimiento como PDGF y TGF- β . A diferencia de los neutrófilos, los macrófagos permanecen dentro de la herida hasta que termina la cicatrización (10,17,20).

Otras células de importancia durante esta fase son los mastocitos, los cuales poseen gránulos en su interior, que liberan durante su degranulación histamina, TNF- α , prostaglandinas y proteasas, que favorecen la vasodilatación, permeabilidad vascular, activación celular, depósito de colágeno y la remodelación de la herida. Estos mediadores son los responsables de los signos característicos de inflamación alrededor del sitio de la herida (eritema, color, edema y dolor) (20). Por otro lado, durante la inflamación también se presentan los linfocitos T alrededor del día 5, los cuales están presentes en la herida en menor grado que los macrófagos pero se cree que son imprescindibles para la fase inflamatoria y proliferativa de la reparación, ya que además de la inmunidad celular y la producción de anticuerpos, los linfocitos actúan como mediadores dentro de la herida mediante la secreción de linfocinas que producen señales que estimulan a las células productoras de la MEC. Asimismo, en esta fase, una vez que el sitio de la herida fue limpiada por los neutrófilos y macrófagos, los fibroblastos migran para iniciar la fase proliferativa y depositar nueva matriz extracelular (10).

Proliferación

La fase proliferativa de la cicatrización está asociada con la epitelización y angiogénesis, durante esta etapa los macrófagos y linfocitos T envían señales que regulan la actividad de los factores de crecimiento y mediadores químicos como el PDGF, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), TGF- β , factor de

crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de insulina tipo 1 (IGF-1), IL-1, IL-6 e IL-8, que atraen a los fibroblastos, queratinocitos, así como células endoteliales y con esto se inicia la angiogénesis, la producción de colágena, elastina, fibronectina y proteoglicanos, que favorecen el reemplazo de la MEC por tejido de granulación (10,16,17,21,22) .

En esta etapa también se producen metaloproteinasas (MMPs) como la MMP1, MMP2 y MMP9 que regulan la permeabilidad endotelial, transmigración de los leucocitos de la vasculatura de los tejidos, así como la disponibilidad y la actividad de las citocinas y quimiocinas (23-25). La MMP-9 degrada el colágeno tipo IV y la laminina en la membrana basal, permitiendo así la migración de diferentes tipos celulares hacia la herida; la MMP-1 rompe las uniones de colágeno fibrilar y facilita la migración continua (26).

Finalmente, el proceso es sostenido por contracción (fibroplastia) de la herida, la migración de las células epiteliales y retroceso en la producción de tejido vascular (10,27).

Remodelación

La remodelación consiste en el depósito de matriz permanente y los subsecuentes cambios con el tiempo, se inicia al mismo tiempo que la fibroplastia y continúa por meses. Esta es controlada principalmente por las señales producidas por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el TGF- β . En esta fase inicialmente la matriz se compone de fibrina, fibronectina, además de otras proteínas, las cuales posteriormente se sustituyen principalmente por colágena tipo III y se forma una cicatriz madura que conforme se va remodelando incrementa su fuerza tensil de

ruptura. El proceso de cicatrización termina con la sustitución de la colágena tipo III por fibras organizadas y maduras de colágena tipo I, junto con una transformación de los fibroblastos en miofibroblastos que tienen capacidades de contracción. Al final del proceso, la cicatriz adquiere una resistencia máxima del 70% comparada con el tejido sano. La actividad celular disminuye y el tejido conjuntivo cicatrizal se torna rico en colágeno, pobre en células, así como vasos sanguíneos, además las fibras de colágeno se vuelven más gruesas y se reordenan a lo largo de las líneas de la lesión (9,16). Clínicamente se observa una disminución del eritema, contracción de la herida y del grosor de la cicatriz (17).

1.3 Factor de crecimiento transformante (TGF- β)

El TGF- β es una familia de citocinas con actividades multifuncionales, que está compuesta de diversas isoformas del mismo, activinas e inhibinas, los cuales regulan diversos eventos en el desarrollo embrionario, la respuesta inmunológica (28,29), carcinogénesis, inflamación, regeneración tisular y la cicatrización, en donde al inicio atrae a los neutrófilos, macrófagos y fibroblastos, posteriormente estimula la angiogénesis, fibroplasia y en las etapas finales, está involucrado en la remodelación de la MEC. Este factor incrementa la síntesis y depósito de componentes extracelulares tales como fibronectina, proteoglicanos y algunas formas de colágena (30-33).

Isoformas del TGF- β

Por otro lado el TGF- β tiene tres isoformas: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, los dos primeros (TGF- β 1 y TGF- β 2) actúan como profibrogénicos (17), mientras que el

TGF- β 3 funciona como antiinflamatorio y antifibrótico, asimismo estos actúan en todas las etapas de la cicatrización de heridas, especialmente en la fase proliferativa y de remodelación (10,17,34-37), en la que se convierte en una señal crítica, que actúa como control maestro para la regulación de la actividad de los fibroblastos, ya que incrementa la transcripción de genes de colágeno, proteoglicanos y fibronectina, lo que favorece el aumento en la producción global de proteínas de la MEC. La expresión del TGF- β 1 se da en células endoteliales, hematopoyéticas y células de tejido conectivo, TGF- β 2 en células epiteliales y células SNC, y el TGF- β 3 principalmente en células mesénquimales y son liberados al medio extracelular por las plaquetas (32,38). Al mismo tiempo, el TGF- β disminuye la producción de las MMPs encargadas de la degradación de la MEC y estimula la producción de sus inhibidores (TIMPs) (10). Cuando existe un incremento incontrolado de este factor de crecimiento en la producción y/o activación existe una producción excesiva de tejido conectivo (32).

Síntesis y degradación del TGF- β

Los TGF- β son secretados al medio extracelular en forma latente como precursores diméricos (pro-TGF- β), a partir de los cuales se originan las formas maduras activas del factor que también son diméricas. El precursor del TGF- β 1 maduro tiene 390 aminoácidos con 112 residuos localizados en el extremo carboxilo-terminal. Los residuos restantes, que se localizan en la porción amino-terminal, forman el llamado *péptido asociado de latencia* o LAP (por sus siglas en inglés *latency associated peptide*). Este complejo puede ser secretado o almacenado en los gránulos plaquetarios (que son el reservorio más grande de

TGF- β en el organismo). Posteriormente, para que el TGF- β se active se necesita que este se disocie del LAP; sin embargo, este proceso no está bien descrito, se ha sugerido que esta activación se da por la unión del complejo latente de TGF- β a la trombospondina 1; después de que el TGF- β es activado, ya puede unirse a su receptor (28,29,32,38).

Una vez que es liberado el TGF- β tiene una vida media corta y puede unirse a otras proteínas como la α -macroglobulina y la decorina, las cuales inhiben su actividad, o también unirse con acarreadores como la albumina y/o las IgGs que no interfieren con su actividad. El TGF- β activo puede ser degradado por proteasas y elastasas en el sitio de la inflamación o puede ser excretado por la orina (32).

Receptores del TGF- β

La regulación del TGF- β en procesos celulares está mediada por tres receptores de alta afinidad en la superficie celular: el receptor tipo I, II y III. El TGF- β transmite su señal al interior de las células mediante su interacción con los receptores tipo I y II, cuando el TGF- β se une a su receptor, el receptor tipo II fosforila al receptor tipo I, formando diferentes complejos que llevan la señal del TGF- β al núcleo celular (30,32). El envío de señales de TGF- β hacia el interior del núcleo es mediado por moléculas denominadas Smads. El tipo de Smad al que se une el receptor determina la unión directa al ADN, los cofactores que participarán y por lo tanto, los genes que van a expresarse (28).

Cuando esta información llega al núcleo se forman complejos que interaccionan con genes diana y producen cambios en la transcripción, lo cual desencadena

proliferación, diferenciación, o cualquier otra de las actividades desempeñadas por el TGF- β (29). Finalmente, se puede decir que durante la cicatrización, cuando se presenta un proceso coordinado en el que se mantiene un equilibrio entre la síntesis y degradación de la MEC durante la proliferación y remodelación se alcanza la reparación normal del tejido; pero si cualquier parte de la secuencia de la cicatrización se altera, se produce una cicatriz patológica, las cuales son totalmente diferentes a la respuesta normal de reparación y se caracterizan por ser fibróticas o por mostrar cicatrización deficiente o retrasos en la cicatrización, como consecuencia de una prolongación de la fase inflamatoria o deficiente angiogénesis (10,39).

Por otro lado, cualquier trastorno en la regulación o en los mecanismos de señalización del TGF- β puede ocasionar condiciones patológicas como procesos fibróticos que resultan de un exceso en la producción del mismo (29,32).

1.4 Fisiopatología de las cicatrices fibróticas

La formación de cicatrices fibróticas (hipertróficas) siempre está precedida de una prolongación o exageración de la fase inflamatoria de la cicatrización o una alteración durante la contracción o remodelación. En la fase inflamatoria se presenta un incremento en la síntesis de citocinas fibrogénicas que promueven un aumento en la producción de tejido conectivo en la MEC. Este incremento en la MEC puede ser originado por una producción excesiva de colágena, fibronectina y otros proteoglicanos o a la disminución en la degradación de estas proteínas generalmente por la falta de colagenasas (MMP1) durante la contracción, lo que promueve un aumento importante en las fibras de colágena y su desorganización

provocando un defecto en la remodelación. La remodelación de la cicatriz también se ve alterada por un exceso en la producción del TGF- β 1 (34,35,40), cambios en la composición de los proteoglicanos de la herida, ya que se incrementa la concentración de versicán (aumenta el contenido de agua en la cicatriz, alterando el proceso de reorganización de las fibras de colágena) y disminuye la concentración de decorina, que promueve la formación de fibras gruesas y desorganizadas de colágena (10,11,39,41). En la tráquea, cuando se produce una cicatriz fibrótica se produce estenosis y la consecuente obstrucción al flujo de aire (16).

1.5 Estenosis traqueal

La estenosis traqueal (ET) es una patología que puede ser de origen congénito, como en el caso de las estenosis al nacimiento o anillos extravasculares que compriman la tráquea. Asimismo, pueden ser adquiridas, como las estenosis postintubación prolongada, postinfección, postcirugía (postraqueotomía, postraqueoplastía) o por quemaduras por inhalación (42).

La ET más común es la adquirida y se definen como una fibrosis desproporcionada de la luz traqueal que obstruye el paso de aire hacia los pulmones y visceversa, la cual es el resultado de un proceso cicatrizal anormal en el que se prolonga la fase inflamatoria y de remodelación de la herida durante la cicatrización y da como resultado la formación de cicatrices hipertróficas (43).

Las estenosis son inducidas por la pérdida del flujo sanguíneo regional por compresión del globo de la cánula orotraqueal, lo que produce isquemia y conduce

a la necrosis con pérdida de la mucosa y de la estructura de la vía aérea del sitio lesionado, el cual se inflama de forma crónica y conduce a la producción de fibras de colágena gruesas y desordenadas en la herida, lo cual origina fibrosis y obstrucción de la luz traqueal (43).

Signos de estenosis traqueal

Los signos que se presentan en pacientes con estenosis traqueal son el estridor, sibilancias a la inspiración, disnea progresiva de esfuerzo, algunas veces se observa la extensión del cuello a la inspiración forzada, o una combinación de estos signos (44,45).

Diagnóstico

Existen diferentes métodos para la evaluación de la vía aérea. Entre estos se encuentran la radiología convencional (radiografías laterales simples), tomografía computarizada (TC) y la traqueoscopia, la cual es el método de elección ya que permite la valoración directa de la obstrucción y en conjunto con los demás estudios, permite elegir cuál será el mejor procedimiento para restablecer la permeabilidad de la vía aérea (46,47).

Tratamiento de las estenosis traqueales

El tratamiento de las estenosis traqueales es variado y se han practicado procedimientos como las dilataciones con balón o cánulas, colocación de férulas intratraqueales y la permeabilización con láser, pero desafortunadamente éstas han sido solamente de tipo paliativo y no evitan que la tráquea se vuelva a

obstruir. El tratamiento quirúrgico de resección y anastomosis termino-terminal del segmento afectado (traqueoplastía) es relativamente efectivo pero tampoco impiden la re-estenosis (48-50).

Para tratar de solucionar los problemas de cicatrización después de que se realiza una dilatación, colocación de férulas intratraqueales, permeabilización con láser o una traqueoplastía, se han utilizado diversos fármacos en combinación con cada procedimiento, entre estos sobresale la mitomicina C (MC), la cual se ha utilizado con el propósito de manipular de manera temprana la formación de la nueva MEC mediante la regulación de la inflamación, formación de colágena y remodelación de la cicatriz formada en la herida, pero no han tenido el éxito deseado debido a que no siempre evitan la re-estenosis por fibrosis (51-53). También se ha utilizado la colágena polivinilpirrolidona (CPVP) con buenos resultados; sin embargo este hay que aplicarlo semanalmente vía intratraqueal por cuatro semanas (49); por ello es importante la búsqueda de nuevos moduladores de la cicatrización (MDC) como la Pirfenidona (PIRFE) para su uso en esta patología.

1.6 Moduladores de la cicatrización

Mitomicina C (MC)

La MC es un antibiótico antineoplásico producido por el *Streptomyces caespitosus*, el cual inhibe la proliferación y actividad de los fibroblastos con lo que evita la formación de una cicatriz fibrótica. Este fármaco ha mostrado buenos resultados cuando se usa como un tratamiento adyuvante después de la realización de gran número de procedimientos oftálmicos para disminuir la recurrencia del pterigión,

prevención de estenosis en cirugía de glaucoma, fibrosis del nervio óptico (54,55); sin embargo, ha mostrado resultados contradictorios cuando se ha utilizado para la disminución de las estenosis laringotraqueales tanto en forma experimental como clínica (51,53,56,57).

Colágeno polivinil-pirrolidona (CPVP)

La CPVP es un fármaco constituido de colágeno porcino tipo I tratado con rayos gama y polivinil-pirrolidona, del cual se ha observado que la aplicación intralesional semanal (vida media del fármaco) previene la fibrosis, ya que tiene actividad fibrinolítica y actúa como remodelador de procesos fibrosos a través de un mecanismo de equilibrio en los niveles de citocinas pro-inflamatorias y fibrogénicas como la IL-1 β , el TNF- α , el TGF- β 1 y el PDGF, así como en las moléculas de adhesión como ELAM-1 y VCAM-1, quienes en el tejido tratado alcanzan valores locales semejantes a los de la piel normal, lo que disminuye el volumen de la cicatriz, desaparece el infiltrado inflamatorio y restablece la arquitectura dérmica normal de la cicatriz tratada con ésta (58-60). Además, su uso postraqueoplastía disminuye la cantidad de colágena formada por gramo de tejido traqueal en el sitio de la anastomosis y provoca que la consistencia del tejido traqueal sea más firme que la del tejido normal; sin embargo, para lograr esto se requiere de 4 aplicaciones intratraqueales por traqueoscopia (49,61-64).

Pirfenidona (PIRFE)

La Pirfenidona (5-metil-1-fenil-2-[1H]-piridina) (PIRFE) es un fármaco antifibrótico, antiinflamatorio y antioxidante, que inhibe la síntesis de colágeno gracias que bloquea la expresión de citocinas como la IL-1 e IL-6 y factores de crecimiento

como el TNF- α y TGF- β , con lo que bloquea las fibrosis patológicas. Su uso tanto experimental como clínico ha mostrado buenos resultados en cicatrices fibróticas de piel (65,66), fibrosis pulmonar (67-69), cirrosis hepática (70,71), adherencias peritoneales (72,73), fibromiomas uterinos (74), fibrosis renal (75) y prevención de la contractura mamaria después de la colocación de un implante (76); sin embargo su uso en la cicatrización traqueal no se ha estudiado.

Aunque en la literatura se ha reportado que la aplicación intratraqueal de 1 dosis por semana durante 4 semanas de CPVP disminuye la cantidad de colágena formada por gramo de tejido traqueal y mejora la calidad de la cicatriz traqueal postcirugía, aún no se ha descrito el efecto de una sola dosis durante la cirugía sobre la cicatrización y la expresión de TGF- β 1 en la misma. Por otro lado, la PIRFE para el tratamiento de fibrosis pulmonar se administra 2 veces al día, pero su efecto sobre la producción de TGF- β 1 y colágena formada por gramo de tejido en la cicatrización traqueal, y el efecto de una sola dosis al día, no se ha descrito; es por lo que en este se estudió se valoró el efecto de la aplicación de 1 sola dosis de CPVP durante la resección y anastomosis termino terminal de tráquea cervical, y la de 1 y 2 dosis al día de PIRFE durante 30 días postcirugía, sobre la cicatrización traqueal.

2. JUSTIFICACIÓN

El Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INERICV) es un centro de referencia para el tratamiento de las estenosis laringotraqueales y en los últimos años se ha observado un incremento en el número de

pacientes con esta patología. La etiología principal de este padecimiento es una cicatrización patológica en la que se presenta inflamación crónica que altera las interacciones celulares coordinadas que se presentan durante ésta, y predispone a un trastorno en el que la expresión de factores de crecimiento como el TGF- β 1, favorecen el desarrollo de fibrosis. En la literatura se ha reportado que el uso de CPVP en tráquea y piel, así como la PIRFE en piel, hígado, pulmón y riñón, ya que disminuyen la reacción inflamatoria, así como la expresión de TGF- β 1 y la expresión exagerada de colágena. No obstante, aún no se ha reportado el efecto de estos fármacos con una sola dosis tópica de CPVP durante la cirugía, una y dos dosis diarias vía oral por 4 semanas de PIRFE sobre la expresión del TGF- β 1 en la cicatrización traqueal. En este trabajo se propone estudiar la expresión del TGF- β 1 y la producción de colágena en las cicatrices traqueales después de realizar resección y anastomosis termino-terminal de la tráquea cervical de ratas y aplicar el esquema de tratamiento con los moduladores de la cicatrización (MDC) mencionados, para valorar su potencial uso en humanos.

3. HIPÓTESIS

La CPVP y la PIRFE son fármacos que modifican la respuesta inflamatoria y disminuyen la producción de TGF- β 1 en los procesos cicatrizales; entonces, al ser aplicadas postraqueoplastía, disminuirá la expresión del TGF- β 1 y la producción de colágena, con lo que mejorará la calidad de la cicatriz traqueal.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la administración vía oral por 4 semanas de PIRFE y la aplicación tópica de una dosis de CPVP sobre los cambios macroscópicos, microscópicos, expresión de TGF- β 1 y deposición de colágena en las cicatrices traqueales de ratas con resección y anastomosis termino-terminal de tráquea cervical.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar el efecto de una sola aplicación tópica de CPVP, así como de una y dos dosis de PIRFE vía oral por 4 semanas, sobre los cambios macroscópicos y el tamaño de la luz traqueal que se producen en la cicatriz traqueal de ratas con anastomosis término-terminal de tráquea cervical.

- Determinar el efecto de una sola aplicación tópica de CPVP, así como de una y dos dosis de PIRFE vía oral por 4 semanas, sobre los cambios microscópicos que se producen en la cicatriz traqueal de ratas con anastomosis término-terminal de tráquea cervical.

- Determinar el efecto de una sola aplicación tópica de CPVP, así como de una y dos dosis de PIRFE vía oral por 4 semanas, sobre la expresión del TGF- β 1 y su relación con la deposición de colágena formada en la cicatriz traqueal de ratas con anastomosis término-terminal de tráquea cervical.

5. MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio experimental, prospectivo y longitudinal.

El financiamiento de este estudio fue otorgado por el INERICV y participó la pasante de MVZ Mariana Silva Martínez, los investigadores y técnicos del Departamento de Investigación en Cirugía Experimental del INER-ICV, que proporciono el quirófano, monitores de signos vitales, microscopios (OMP 19-FC Carl Zeiss, Faserbeleuchtung, West Germany) para la realización del procedimiento quirúrgico, así como el instrumental de microcirugía, fármacos y materiales necesarios para llevar a cabo los estudios. Los animales fueron proporcionados por el Bioterio del mismo Instituto. También intervino el personal del Departamento de Investigación en Morfología del INERICV, quienes procesaron y realizaron los estudios microscópicos de las muestras de los tejidos sometidos a estudio.

5.1 Animales de experimentación

Se utilizaron 50 ratas Wistar (cepa Hsd:WI) clínicamente sanas, de sexo indistinto, con rango de edad de 8-11 semanas y peso de 250-350 gramos, las cuales fueron manejadas de acuerdo a las especificaciones técnicas para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana y la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of USA (77,78) y aceptado por el CICUAE de la FMVZ, UNAM.

Criterios de exclusión

Los animales que presentaron cualquier cuadro clínico de enfermedad respiratoria durante su permanencia en el bioterio del INERICV previo al procedimiento quirúrgico, no fueron utilizados en este estudio.

Criterios de eliminación

Todo animal que presentó signos clínicos de cualquier patología que no fue provocada por el procedimiento quirúrgico se eliminó.

Criterios de terminación

Aquellos animales que mostraron signos de dolor agudo o crónico, de acuerdo a lo descrito por *The Rat Grimace Scale* (79) o signos de enfermedad respiratoria relacionada con el procedimiento y que no disminuyó con la aplicación de medicamentos, fueron sometidos a eutanasia con sobredosis anestésica utilizando pentobarbital sódico (Anestesal, Pfizer S.A. de C.V. Guadalajara, México) (77,78).

5.2 Grupos de Estudio

Los animales fueron divididos en 5 grupos de estudio:

Grupo I (n=10): Resección de tres anillos traqueales cervicales y anastomosis termino-terminal del segmento reseado (traqueoplastía) con aplicación tópica extraluminal de solución fisiológica (SSF).

Grupo II (n=10): Resección de tres anillos traqueales cervicales y traqueoplastía convencional con aplicación tópica extraluminal de 2.5 mg CPVP (49,63,64).

Grupo III (n=10): Resección de tres anillos traqueales cervicales y traqueoplastia convencional con aplicación extraluminal de 1.2 mg MC (51,63,64).

Grupo IV (n=10): Resección de tres anillos traqueales cervicales y traqueoplastia convencional con administración de PIRFE 40 mg/kg de peso vía oral dividida en 2 dosis diarias durante 4 semanas (67,68,80).

Grupo V (n=10): Resección de tres anillos traqueales cervicales y traqueoplastia convencional con administración de PIRFE 20 mg/kg de peso vía oral en 1 dosis diaria durante 4 semanas (68,80).

5.3 Anestesia

Todos las ratas fueron anestesiadas con ketamina (Anesket®, Pisa, Guadalajara, México) 120 mg/kg/IP y xilazina (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Alemania) 12 mg/kg/IP. Una vez anestesiadas se les administró como analgésico preoperatorio meglumina de flunixin (Napzin®, Pisa, México, DF, México) 4 mg/kg/SC y enrofloxacin (Baytril®, Bayer, Leverkusen, Alemania) a dosis de 5 mg/kg/SC como antibiótico (81). Durante la cirugía y la recuperación anestésica se vigilaron sus signos vitales con un monitor para los mismos fines (Datascopé Passport 5 Lead Monitor®, Mindray Medical International, Shenzhen, China) y se monitorizó la frecuencia cardiaca (FC) frecuencia respiratoria (FR) y saturación de oxígeno (SaO₂) durante todo el procedimiento quirúrgico y hasta la recuperación anestésica.

5.4 Técnica quirúrgica

Bajo anestesia general, se llevó a cabo una incisión media en la región cervical ventral, se disecó por planos hasta llegar a la tráquea, la cual fue disecada en toda su circunferencia y se le resecaron tres anillos traqueales a nivel medio de la tráquea cervical (3º, 4º y 5º anillo), se aplicaron los tratamientos tópicos e inmediatamente se realizó la anastomosis término-terminal del sitio resecado (traqueoplastia) con material de sutura no absorbible de polipropileno (Prolene, Ethicon, New Jersey, EU) calibre siete ceros (7-0). La porción membranosa de la tráquea se suturó con un patrón de sutura continua (súrgete continuo) y la porción cartilaginosa con puntos separados. Posteriormente se comprobó que no existieran fugas en la anastomosis y se procedió con el cierre convencional utilizando puntos simples de polidioxanona (PDS, Ethicon, New Jersey, USA) calibre cuatro ceros (4-0) (Figura 1). El procedimiento quirúrgico se realizó con técnica microquirúrgica utilizando un microscopio para estos fines (OMP 19-FC Carl Zeiss, Faserbeleuchtung, Alemania).

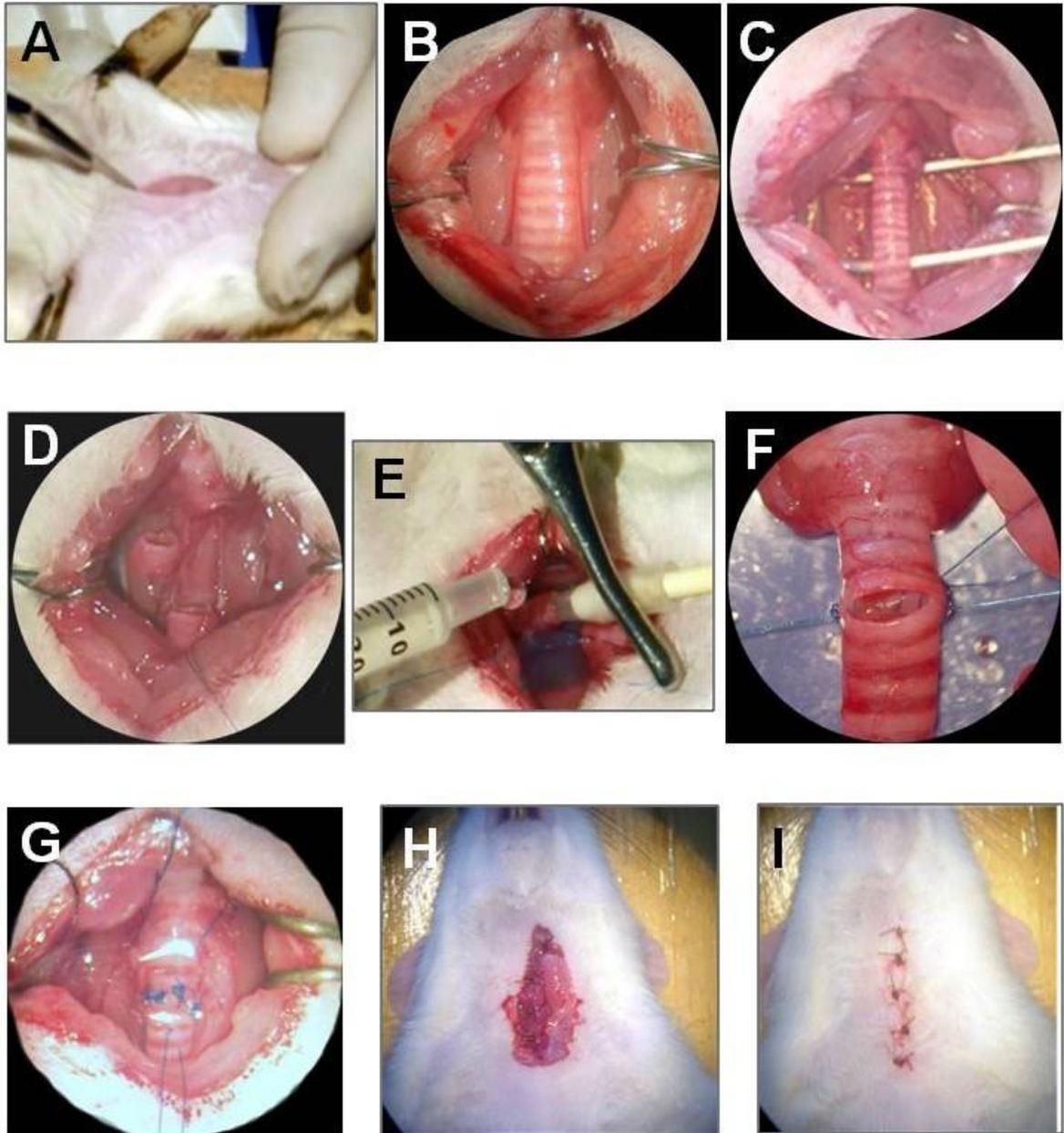


Figura 1. Foto que muestra el procedimiento quirúrgico. A) Incisión cervical media. B) y C) exposición y disección de la tráquea. D) Sección de tres anillos traqueales. E) Aplicación del tratamiento. F) Anastomosis de la porción membranosa. G) Fin de la traqueoplastía. H e I) Cierre convencional.

5.5 Tratamiento

En los grupos I,II y III, después de haber resecado el segmento traqueal, se aplicó el tratamiento sobre ambos extremos de la tráquea reseca de la siguiente manera: en el grupo I se instiló 1 mililitro de SSF. Las ratas del grupo II, recibieron 2.5 mg de CPVP (dosis utilizada para los problemas de piel, tendones y experimentalmente en estenosis traqueales crónicas) diluidos en 1 ml de agua destilada (49,63,64). En el grupo III, se aplicó 1.2 mg/kg de MC (dosis utilizadas para las estenosis traqueales) (51,63,64); pero en este grupo, cinco minutos después de haber sido instilado la MC, la tráquea fue lavada con SSF (51). En los animales de los grupos IV y V recibieron PIRFE vía oral (VO), el grupo IV recibió dos dosis de 20 mg/kg de peso cada 24 horas y el grupo V solo una dosis de 20 mg/kg de peso cada 24 horas. Este fármaco se utilizó por esta vía, debido a que no se cuenta con otra presentación.

5.6 Evaluación

Clínica

El estudio tuvo una duración de 28 días y todos los animales fueron sometidos a evaluación clínica diaria durante la primera semana postcirugía y cada semana el tiempo restante del estudio. Durante ésta se evaluó la presencia de estridor, disnea, estado de la herida quirúrgica (inflamación, infección, dehiscencia, formación de enfisema subcutáneo) y signos de dolor de acuerdo a los criterios establecidos por Sotocinal et al, que se basan en los cambios en la expresión facial (79).

Macroscópica

Al concluir el estudio todos los animales se sometieron a eutanasia con sobredosis de pentobarbital sódico (150mg/kg/IP) (Anestesal, Pfizer S.A. de C.V. Guadalajara, México) (77,78.81) y se evaluó macroscópicamente la cicatrización de la anastomosis, presencia de dehiscencia, infección y la formación de fístulas. También se valoró la presencia de adherencias de acuerdo a la escala descrita por Olmos-Zúñiga et al. (82) basada en la severidad de estas: Grado 0= sin adherencias, Grado 1= adherencias mínimas fácilmente despegables, Grado 2= adherencias completas fácilmente despegables y Grado 3= adherencias completas y firmes. Concluida esta evaluación, se procedió a la extracción del segmento traqueal anastomosado para la evaluación de la luz traqueal.

Tamaño de la circunferencia de la luz traqueal

Una vez extraído el segmento traqueal anastomosado, el cual incluía un anillo proximal y uno distal, se evaluó morfométricamente la circunferencia de la luz traqueal postcirugía y se comparó con la luz de los anillos retirados durante la traqueoplastia para obtener el grado de estenosis postcirugía.

El grado de estenosis se evaluó utilizando la escala de Freitag et al. (83), la cual se basa en el porcentaje de severidad de disminución de la luz traqueal: Grado 0= sin estenosis, Grado 1= <25%; Grado 2= 25-50%; Grado 3= 50-75%; Grado 4= 75-90% y Grado 5= estenosis del 100%. Después de realizar esto, el segmento reseco se incidió por la parte membranosa de la tráquea para evaluar la cicatrización de la mucosa traqueal. De este tejido obtenido, una porción de la

parte membranosa de la tráquea fue designada para la cuantificación bioquímica de la colágena formada en la cicatriz traqueal y el restante para estudio histológico e inmunohistoquímico para determinar la expresión del TGF- β 1.

Microscópica

Para la evaluación microscópica las muestras tomadas de los sitios de anastomosis se fijaron en formaldehído al 10% y a las 24 horas se incluyeron en parafina, se les realizaron cortes de 4 μ m, se tiñeron con hematoxilina-eosina, así como tricrómica de Masson y se les evaluó la presencia de fibrosis, forma y distribución de la fibras de colágena, grado de inflamación y neovascularización.

La evaluación de éstos se realizó en toda la circunferencia de la muestra mediante una escala semicuantitativa descrita por (84) en la cual a cada parámetro evaluado se le asignó un grado de acuerdo a la intensidad de los cambios histopatológicos (Grado 1: ausente 0-10%, Grado 2: leve 11-25%, Grado 3: moderado 26-50% y Grado 4: severo 51-100%).

Determinación de la expresión Inmunohistoquímica del TGF- β 1

La determinación de la expresión *in situ* del TGF- β 1 en la cicatriz traqueal se llevó a cabo por inmunohistoquímica, para esto a las muestras incluidas en parafina se les realizaron cortes de tres micras y se montaron en laminillas silanizadas.

Para desparafinarlas se pusieron en una estufa (Fisher Scientific) a 60 °C durante 30 minutos, se deshidrataron mediante transferencia en xilol por cinco minutos y posteriormente un minuto hasta Alcohol 96%, después se colocaron en una

cámara de recuperación de antígenos con buffer de citratos pH 6, el antígeno se recuperó con calor en baño húmedo (StableTemp®, Cole Parmer®) a 60°C por 30 minutos, se dejaron enfriar y se lavaron con Tris-Buffered Saline with Tween (TBST) tres veces por cinco minutos. La peroxidasa endógena se removió con peróxido de hidrógeno al 30% (J.T. Baker, Méx.) diluido (1:9 en H₂O desionizada) durante 15 minutos y se lavó nuevamente en tres tiempos de cinco minutos con TBST. Posteriormente se agregó suero bloqueador (Vectastain Universal Quick Kit., Burlingame, CA) durante 15 minutos a temperatura ambiente para el bloqueo del pegado inespecífico y se lavo nuevamente. Una vez que se llevaron a cabo los pasos anteriores las secciones de tejido fueron incubadas con anticuerpo policlonal de conejo para TGF-β1 (Abcamab25121, USA) a una concentración de 5µg/ml durante 24 horas a 4°C, pasado este tiempo se lavaron nuevamente en tres ocasiones con TBST por cinco minutos cada uno y se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo biotilnado universal (Vectastain Universal Quick Kit, Burlingame,CA) 10 minutos, se lavó al final en tres tiempos de cinco minutos, posteriormente se utilizó el sistema Biotina-Estreptavidina-Peroxidasa (Vectastain Universal Quick Kit., Burlingame, CA) y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y nuevamente se lavaron como ya se describió, se utilizó 3,3´Diaminobencidina (DAB) (BioCare Medical, USA) como revelador durante cinco minutos, para virar el contraste se utilizó una solución saturada de Carbonato de Litio (Fisher Chemical,USA) y finalmente se tiñeron con Hematoxilina. En todos los grupos se realizaron controles negativos, a los cuales no se les agregó anticuerpo primario.

La cuantificación de la expresión del TGF-β1 fue realizada con el software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), desarrollado por el National Institute of Health (NIH) y el plugin IHC Profiler. Para esto se tomaron imágenes de microscopía en formato digital, a través de un microscopio, una cámara fotográfica digital (Hitachi digital), una computadora y el software necesario para capturar las imágenes. Todas las fotografías se tomaron a la vez utilizando el mismo objetivo y el mismo tiempo de exposición. De esta manera nos aseguramos que las diferencias obtenidas fueron originadas por una mayor área positiva para el marcador y no a que la imagen tiene una exposición mayor. Una vez que se obtuvieron las imágenes se cuantificó el área positiva de acuerdo a lo descrito por Varghese et al. (85): se seleccionó y abrió la imagen a cuantificar, se analizó como imagen citoplasmática y se produjeron 3 imágenes por deconvolución de color: DAB, hematoxilina y una imagen complementaria (Start > ReadImage > CytoplasmicImage > IHC Macro). Se clasificó a cada imagen en un rango de intensidad del color que se dividió por cuatro zonas dentro de la escala del color de 0-255; alto positivo, positivo, bajo positivo y negativo, asimismo, se les asignó una puntuación con los valores obtenidos en el análisis con el siguiente algoritmo matemático:

$$\text{Puntuación} = \frac{\text{Número de píxeles por zona} \times (\text{Puntuación de la zona})}{\text{Total del número de píxeles por imagen}}$$

Total del número de píxeles por imagen

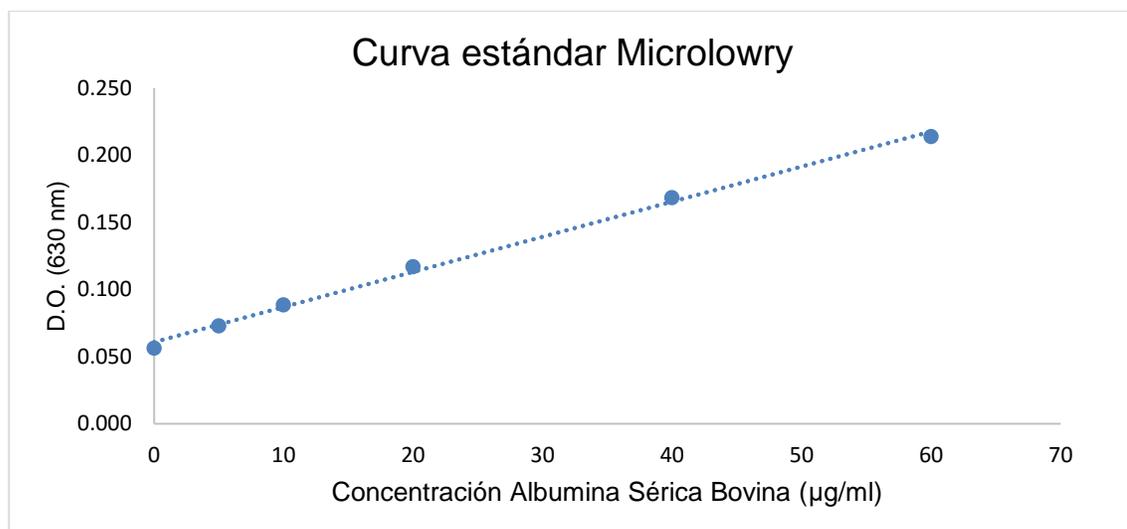
Determinación de colágena formada por miligramo de tejido

La determinación de colágena en la cicatriz traqueal se realizó mediante el ensayo de Sircol (86) utilizando el Kit Sircol™ (Sircol Kit Pack Standard Assay Kit Product Code: S1000, Biocolor, UK) (Figura 2), el cual es un método colorimétrico y se realizó de la siguiente manera: Una vez obtenido y pesado el segmento de la anastomosis traqueal, se depositó en un vial y se le agregó 1 ml de buffer de lisis de pepsina (P7012 Sigma-Aldrich, USA) a una concentración de 0.001g/1ml de Ácido acético 0.5 M (Macron Fine Chemicals™, Mex) las muestras fueron incubadas por 48 horas a 4°C, para lisar el tejido y liberar las proteínas. Al término de la incubación las muestras fueron centrifugadas a 8000 rpm a 4°C por 5 minutos en una micro centrífuga (Legend Macro 21 R, Thermo Scientific, USA). Se decantó el sobrenadante y se le determinó la concentración de proteínas totales utilizando Micro método de Lowry, debido a las bajas concentraciones de proteínas de la muestras que no fueron detectadas con el método convencional de Lowry (Gráfica 1) (87). Posterior a la determinación de proteínas totales se procedió a determinar la colágena en las muestras de los sobrenadantes, manejándose una curva estándar previamente establecida por ensayos preliminares de rango de concentración de la colágena en las muestras (Gráfica 2), para establecer la curva se utilizó el colágeno de referencia del Kit de Sircol (colágeno bovino) con las concentraciones mostradas en la curva (Gráfica 2) en un volumen final de 100 µl. Se utilizaron tubos Eppendorf de 1.5 ml (Eppendorf Protein LoBind Tubes, Sigma-Aldrich) en los cuales se colocaron 100 µl por duplicado tanto de los puntos de la curva establecida como de las muestras

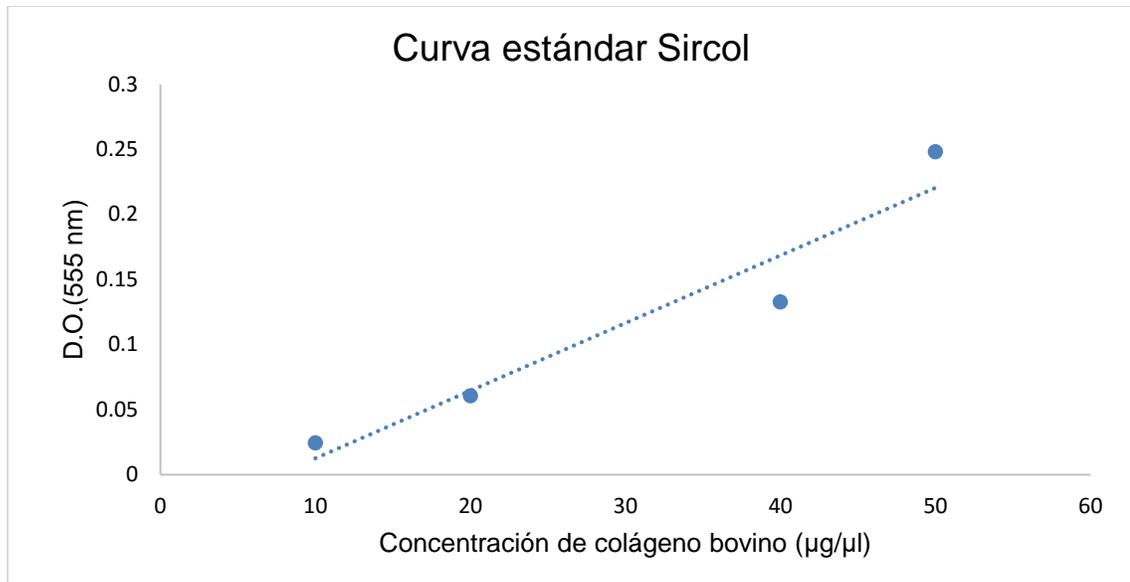
problema, manejándose como blanco el buffer de lisis previamente descrito, a todos los tubos se les agregó 1 ml de reactivo colorante Sircol y se dejaron en agitación constante por 30 minutos, para favorecer la unión de colágena al colorante, posteriormente se centrifugaron los tubos a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue decantado y al pellet obtenido se le agregó 750 µl de reactivo de lavado ácido-salino (dilución 1:4, en agua desionizada) y nuevamente se centrifugó a 12000 rpm a 4°C por 10 minutos. Al término de la centrifugación se decantó el sobrenadante totalmente y el pellet fue secado completamente para ser re-suspendido en 250 µl de reactivo alcalino y se agitó utilizando un Vortex (Velp Scientific, Europe). Finalmente se transfirieron 200 µl de la mezcla anterior de cada tubo a una microplaca Nunc-Immuno MaxiSorp™ (Sigma-Aldrich, USA). La lectura se realizó en un espectrofotómetro Epoch (Bio-teck Instruments, USA). A una longitud de onda de 555 nm.



Figura 2. Esquema sistema Sircol para la determinación de colágena.



Gráfica 1. Muestra la curva estándar de las concentraciones utilizadas (5µg/ml, 10µg/ml, 20µg/ml, 40 µg/ml y 60µg/ml) para la realización del método de Microlowry.



Gráfica 2. Muestra la curva estándar de las concentraciones utilizadas (10µg/µl, 20µg/µl, 40 µg/µl y 50µg/µl) para la realización del ensayo Sircol.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los hallazgos clínicos y macroscópicos, se llevó a cabo con la prueba de Kruskal-Wallis debido a que son datos no paramétricos, mientras que para los hallazgos histológicos, bioquímicos e inmunohistoquímicos, se realizó mediante las pruebas de ANDEVA, Dunnett y Tukey. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

6. RESULTADOS

Todos los animales sobrevivieron al procedimiento quirúrgico, pero no al tiempo de estudio establecido, debido a que mostraron signos de insuficiencia respiratoria y fueron sometidos a eutanasia en los siguientes tiempos: un animal del grupo I (SSF) falleció en la 1er semana postcirugía, uno del grupo II (CPVP) en la 2da semana postraqueoplastía, dos del grupo III (MC) los cuales murieron en la 3ra y

4ta semana postcirugía; mientras que del grupo tratado con PIRFE a dosis de 40mg/kg (Grupo IV) fallecieron dos ratas en la 1er semana postcirugía y en el grupo V sobrevivieron todos los animales. Al comparar entre grupos, no se observó ninguna diferencia estadística ($p > 0.05$, Chi cuadrada).

Grupos de estudio	Número de animales que completaron el estudio
I SSF	9
II CPVP	9
III Mitomicina C	8
IV PIRFE Doble	8
V PIRFE 1 dosis	10

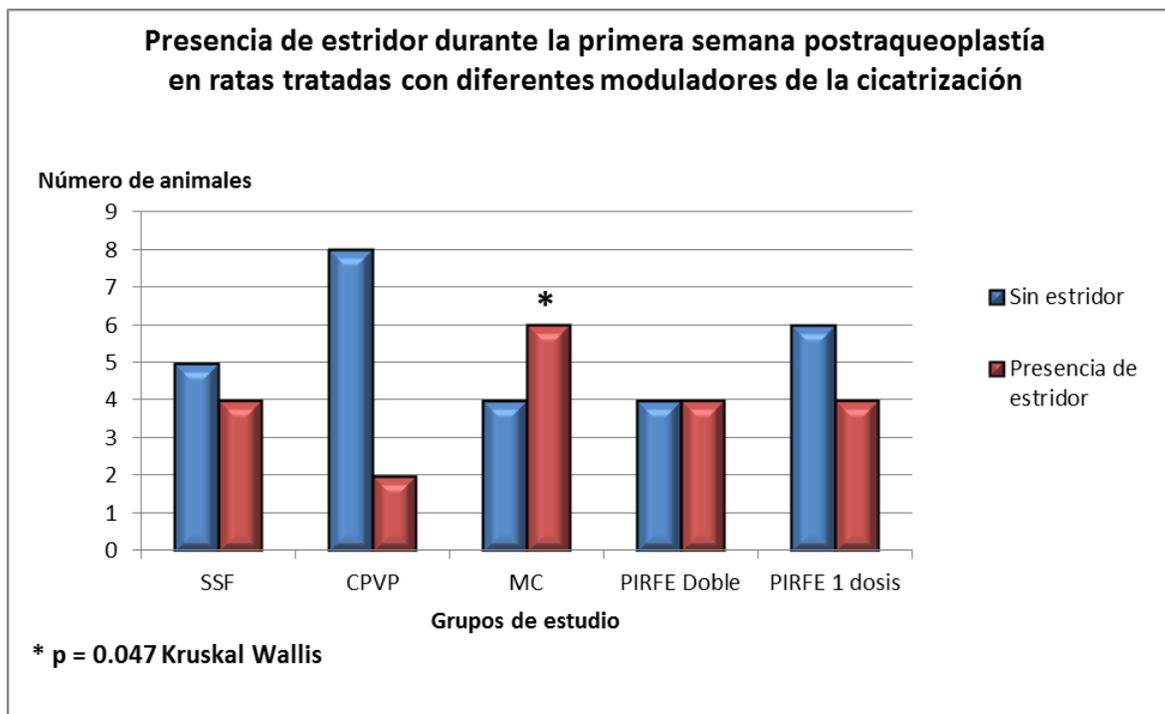
Cuadro 1. Muestra la sobrevivencia de cada grupo al final del estudio.

6.1 Hallazgos clínicos

En todos los casos la herida quirúrgica se encontró bien cicatrizada al concluir la 1er semana postcirugía; sin embargo, en los animales tratados con MC esta se

observó con inflamación severa, durante las 2 primeras semanas postcirugía, la cual desapareció en la tercera semana postcirugía.

Con respecto a la presencia de otros hallazgos clínicos sólo se observó la presencia de estridor durante la 1er semana en cuatro ratas del grupo I, dos del grupo II, seis del grupo III, cuatro de los grupos IV y V; sin embargo, este desapareció en los primeros días de la segunda semana postcirugía en todos los grupos, con excepción del grupo tratado con MC (grupo III) en el cual permaneció a finales de la tercera semana (Gráfica 3).



Gráfica 3. Muestra la presencia de estridor durante la primera semana postcirugía en todos los animales incluidos en el estudio.

En ningún caso se presentó enfisema subcutáneo, infección, ni dehiscencia de la herida quirúrgica.

6.2 Hallazgos macroscópicos

Macroscópicamente, en ningún caso se presentó necrosis, infección, dehiscencia de la anastomosis o fístulas. La anastomosis se observó bien cicatrizada en todos los casos, pero en los animales que no concluyeron su estudio (uno de los grupos I y II, así como dos del grupo III y IV) la cicatriz de la anastomosis se observó fibrótica y con disminución de la luz traqueal mayor al 50%.

Con respecto a la formación de adherencias, en el grupo I se observó que tres animales (33%) desarrollaron adherencias grado 2, tres (33%) grado 4, dos (22%) grado 3 y el restante no presento. En el grupo II, tres (33%) animales presentaron adherencias grado 2, tres (33%) grado 3, uno (11%) grado 4 y dos (22%) no presentaron adherencias. En el grupo III, cinco (62 %) de los animales presentaron adherencias grado 2, dos (25%) no presentaron adherencias y uno (12 %) grado 1; además la porción externa de la anastomosis traqueal se observó con inflamación y edema leve. En el grupo IV, se presentaron los 4 grados de adherencias en 25 % de los sujetos respectivamente. Mientras que en el grupo V, cinco animales (50%) presentaron adherencias grado 3, dos (25%) grado 2 y dos (25%) grado 4 (Figura 3) (Gráfica 4).

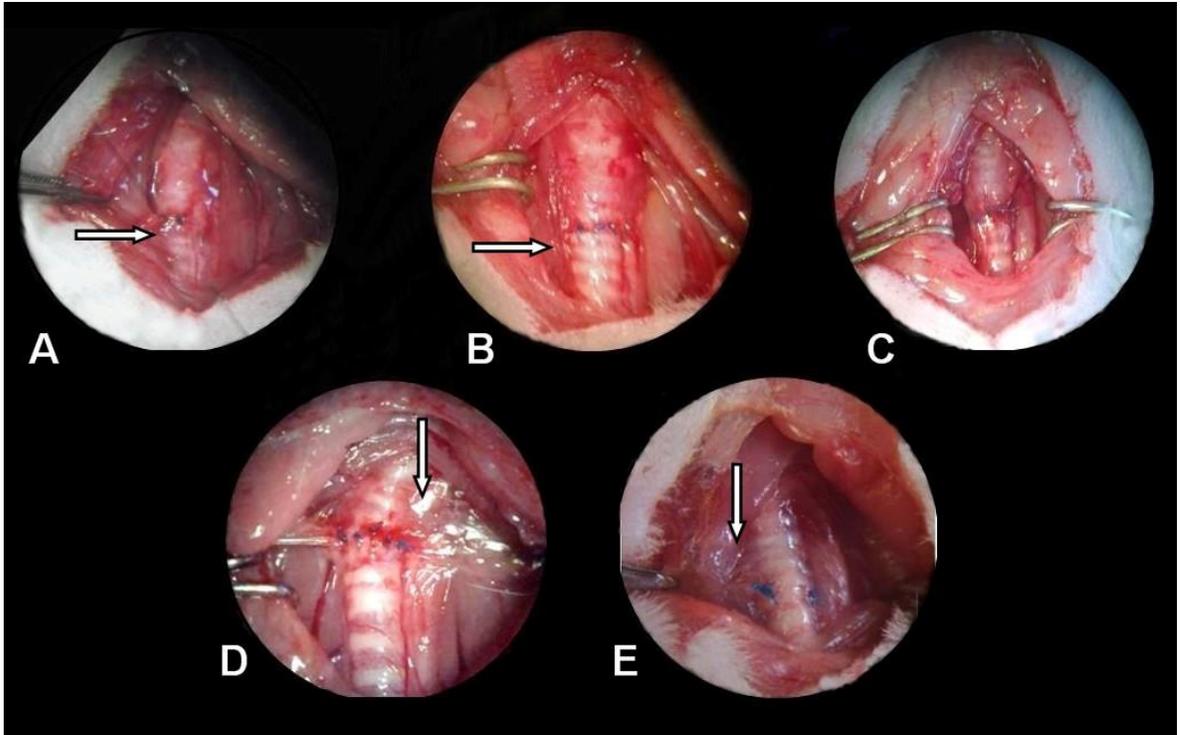
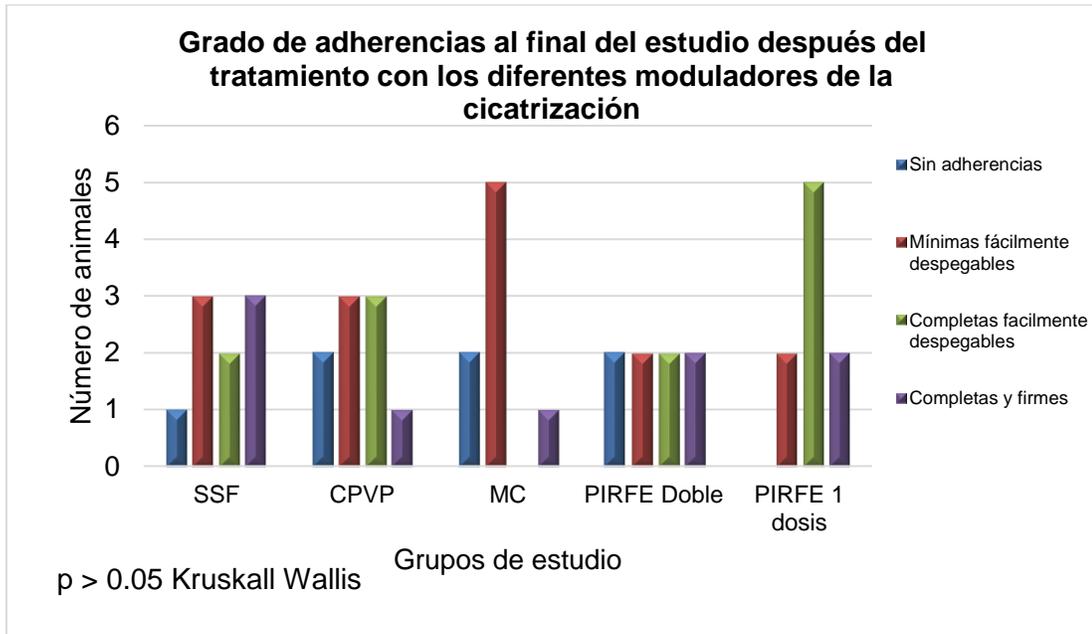


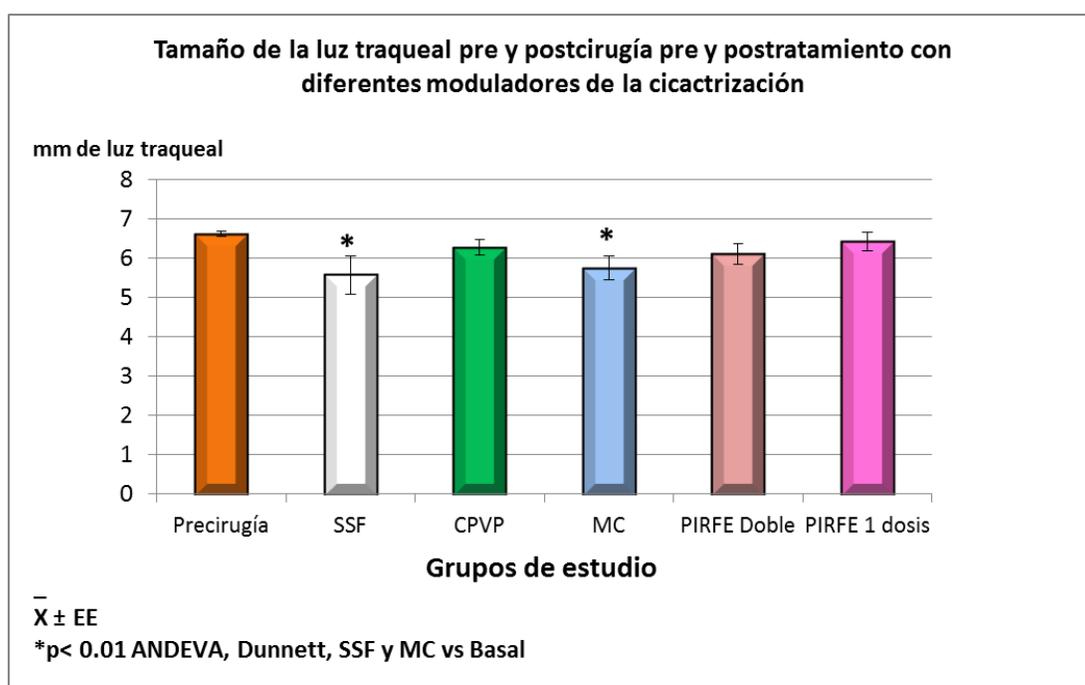
Figura 3. Fotografía tomada al final del estudio en la que se observa la formación de adherencias postquirúrgicas. Se observan adherencias mínimas fácilmente despegables en los grupos II y III (B y C), completas fácilmente despegables en los grupos IV y V (D, E) y completas y firmes en el grupo I (A).



Gráfica 4. Grado de adherencias observadas al final del estudio en todos los animales.

6.3 Hallazgos morfométricos

Al valorar morfométricamente el tamaño de la luz traqueal pre y postcirugía, se observó que en todos los grupos disminuyó el tamaño de esta; sin embargo los grupos tratados con CPVP y PIRFE mantuvieron valores similares a los basales, pero los tratados con SSF y MC la luz disminuyó de manera significativa en comparación con la luz de los anillos controles ($p < 0.01$, ANDEVA, Dunnett) (Gráfica 5).



Gráfica 5. Disminución de la luz traqueal en todos los grupos de estudio 1 mes después del procedimiento quirúrgico.

Al comparar el grado de estenosis después de haber medido la circunferencia postcirugía, se observó que tres ratas del grupo I presentaron estenosis grado 1, dos grado 2 y una grado 3. En el grupo II, solo dos animales presentaron estenosis grado 1. En el grupo III, tres animales desarrollaron estenosis grado 1 y

una grado 2. Por otro lado, dos ratas del grupo IV presentaron estenosis grado 1 y una grado 2. En el grupo V, cuatro ratas mostraron estenosis grado 1 y una grado 2 (Figura 4). En todos los animales que mostraron estenosis grado 1, ésta no puso en riesgo su vida. Al comparar entre grupos, la mayor permeabilidad de la tráquea en las ratas del grupo tratado con CPVP fue significativa en comparación con los grupos I y III ($p < 0.05$ Kruskal Wallis) (Gráfica 6).

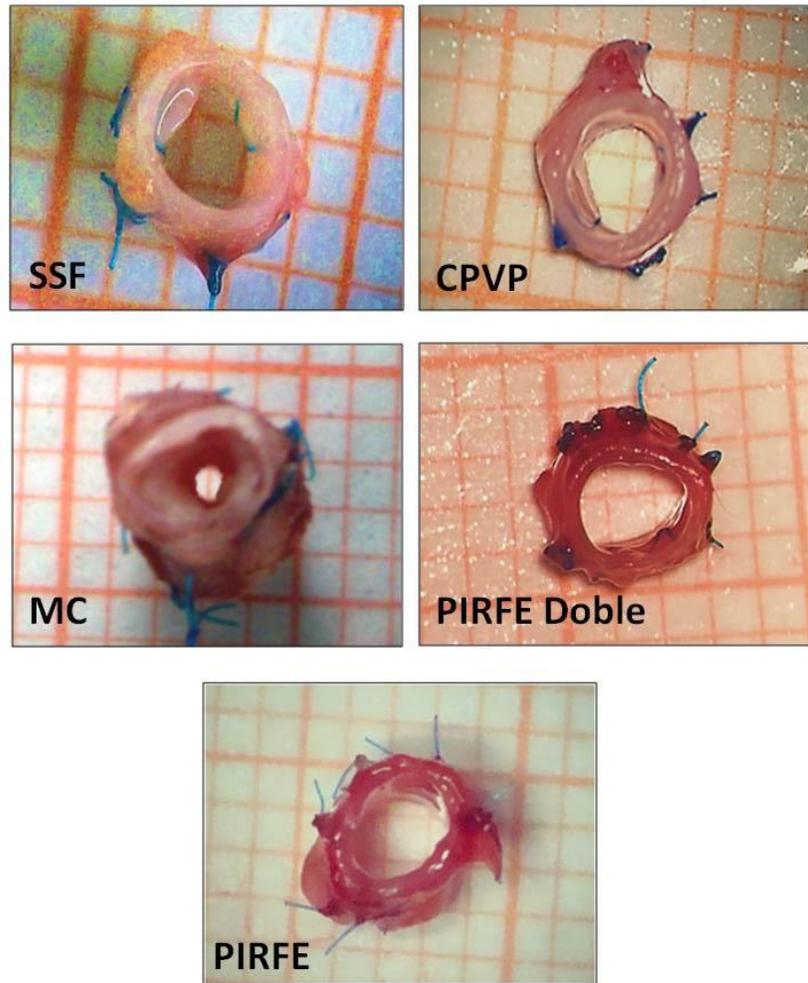
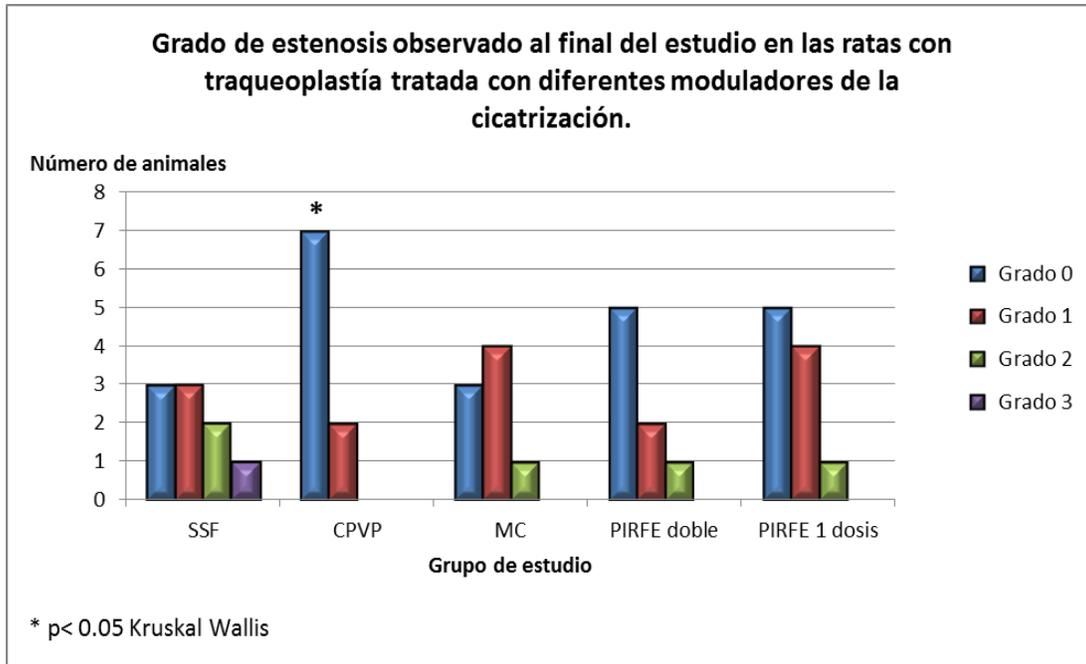


Figura 4. Fotografía que muestra el tamaño de la luz traqueal al final del estudio en todos los grupos. Se observa la estenosis traqueal desarrollada por un animal del grupo de MC.



Gráfica 6. Relación entre el número de animales y el grupo de estudio de acuerdo al grado de estenosis desarrollada.

6.4 Hallazgos microscópicos

Microscópicamente todos los anillos controles mostraron apariencia normal. En todos los grupos se observó pérdida parcial del epitelio, además todos los animales del grupo I, uno del grupo IV y uno del grupo V desarrollaron hiperplasia del mismo. Con respecto al grado de inflamación se observó que el 55% de los animales del grupo I desarrollaron inflamación moderada, 33% leve y 11% severa (Gráfica 7) (Figura 5). En el grupo II, el 55% de los casos tratados con CPVP presentaron inflamación leve y el 45% restante moderada (Figura 5). El grupo tratado con MC el 75% de los animales desarrollo inflamación moderada y el 25% leve (Figura 5). Mientras que las ratas tratados con PIRFE el 90% de los animales tratados en ambos grupos no mostraron inflamación, mientras que el 10% de los

animales restantes mostraron inflamación leve (Figura 5). Al comparar entre grupos la ausencia de inflamación microscópica presentada por los grupos tratados con PIRFE, fue significativa en comparación con los otros grupos de estudio ($p < 0.05$ Kruskal Wallis) (Gráfica 7).

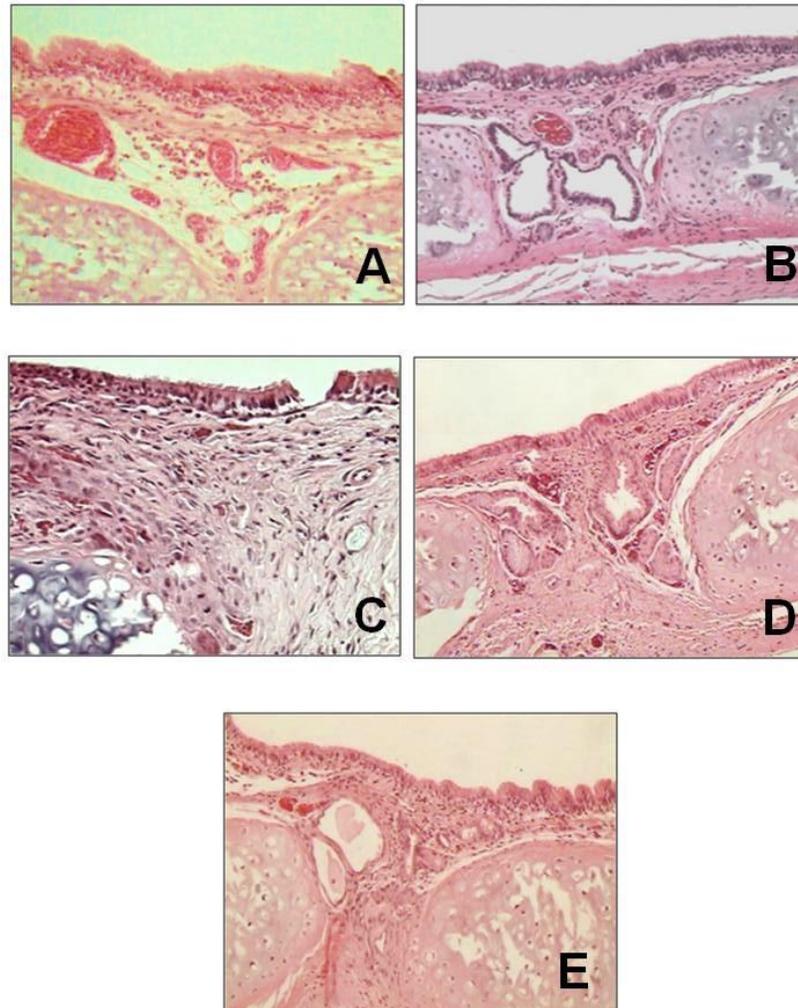
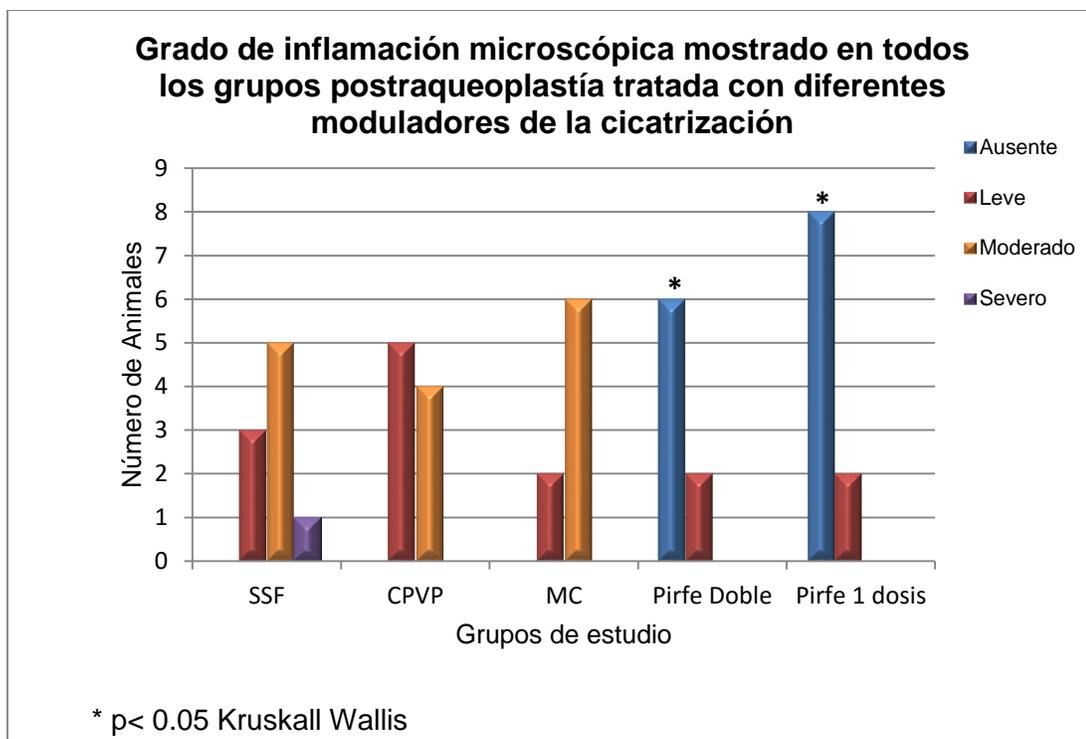
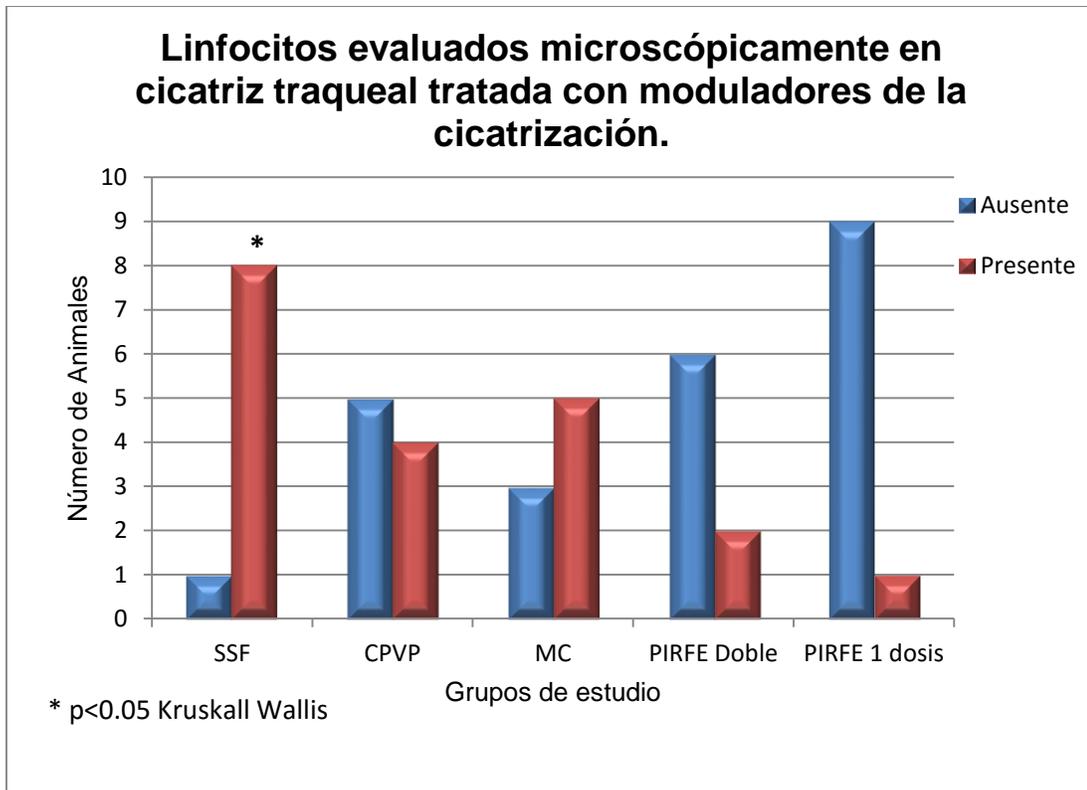


Figura 5. Fotomicrografías que muestran el grado de inflamación en la cicatriz traqueal. En A y C se observa la inflamación moderada en los animales tratados con SSF y MC. B) inflamación leve en el grupo de CPVP. D y E) cicatriz traqueal sin inflamación (H-E 400x).



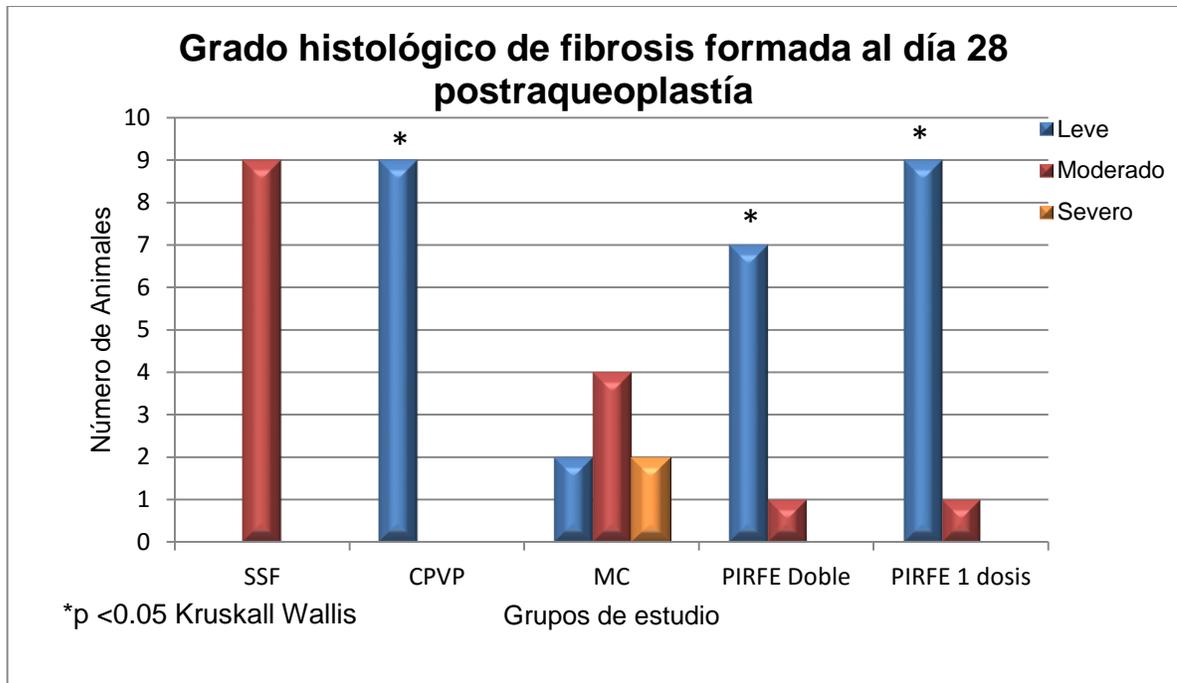
Gráfica 7. Relación entre el número de animales y el grado de inflamación que desarrollaron los animales en cada grupo de estudio.

Con respecto a las células inflamatorias presentes, en todos los grupos se observaron linfocitos; sin embargo, la presencia de estos fue mayor en los grupos I y III, pero sólo se observaron cambios estadísticamente significativos entre el grupo I y los tratados con PIRFE ($p < 0.05$ Kruskal Wallis) (Gráfica 8). En todos los grupos hubo leve presencia de células gigantes de reacción a cuerpo extraño, lo cual al compararse entre grupos no fue significativo ($p > 0.05$ Kruskal Wallis).



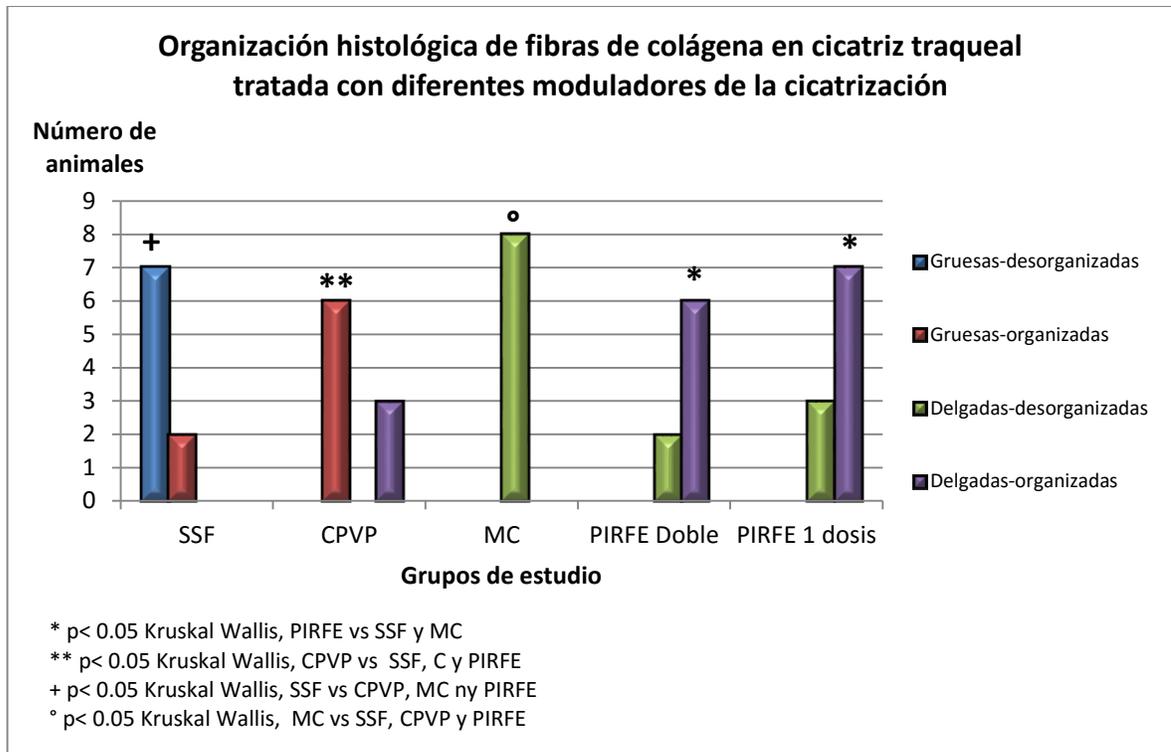
Gráfica 8. Relación entre el número de animales y la presencia de linfocitos observados en los cortes histológicos de todos los grupos de estudio.

Al valorar el grado de fibrosis formada al día 28 postraqueoplastía, se observó que los animales tratados con SSF y MC desarrollaron fibrosis moderada; mientras que los tratados con CPVP y PIRFE mostraron fibrosis leve ($p < 0.05$ Kruskal Wallis) (Gráfica 9) (Figura 6).



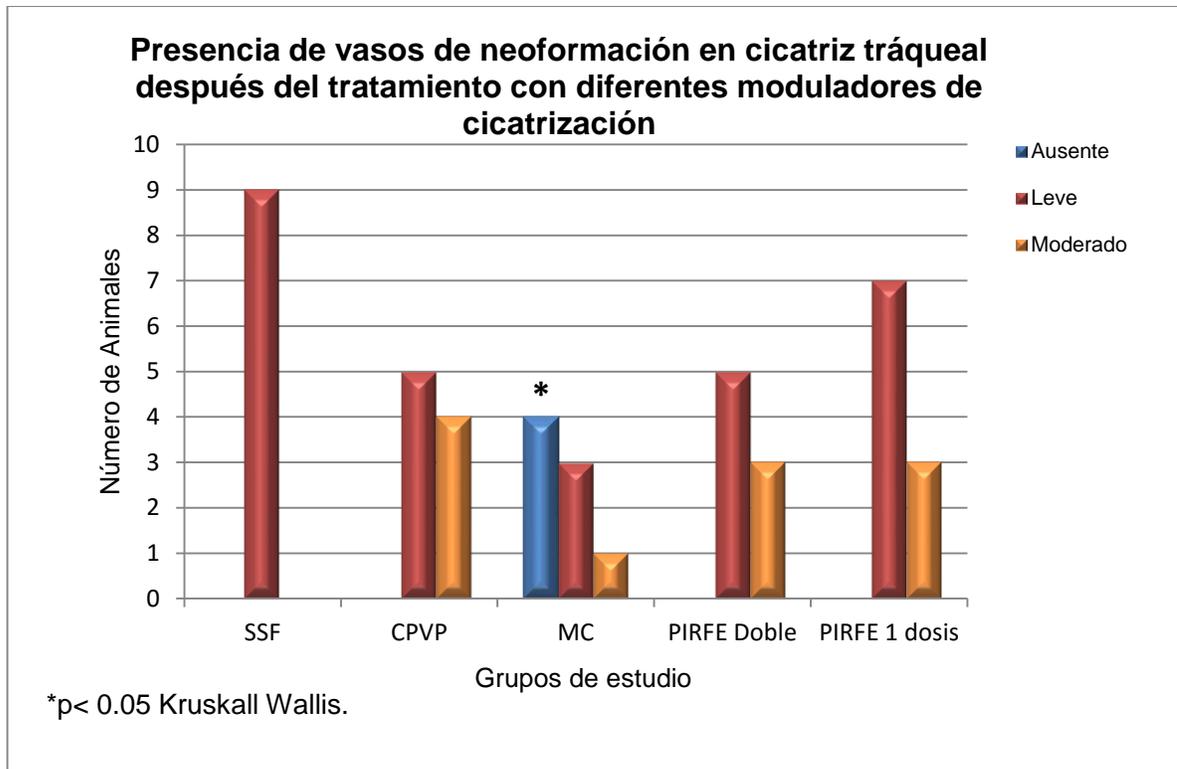
Gráfica 9. Relación entre el grado de fibrosis mostrado por los animales sometidos a tratamiento con los diferentes MDC.

Al evaluar la organización de las fibras de colágena, se observó que los animales del grupo I desarrollaron fibras de colágena gruesas y desorganizadas, los tratados con CPVP gruesas organizadas, los de MC delgadas desorganizadas y los tratados con PIRFE delgadas organizadas. Al comparar entre grupos lo mostrado por cada uno fue significativo vs los otros grupos de estudio ($p < 0.05$ Kruskal Wallis) que al comparar entre grupos fue significativo (Gráfica 10) (Figura 6).



Gráfica 10. Muestra el grosor y organización histológica de las fibras de colágena al final del estudio en todos los grupos.

En todos los casos se observó presencia de vasos de neoformación, leve en el grupo I, leve a moderado en el grupo II, IV y V; mientras que en el grupo III en fue leve en el 50% de los casos y ausente en el 50% restante, lo cual fue significativo ($p < 0.05$ Kruskal Wallis) en comparación con los otros grupos de estudio (Gráfica 11) (Figura 5 y 6).



Gráfica 11. Relación entre el número de animales y desarrollo de nuevos vasos sanguíneos en todos los grupos de estudio.

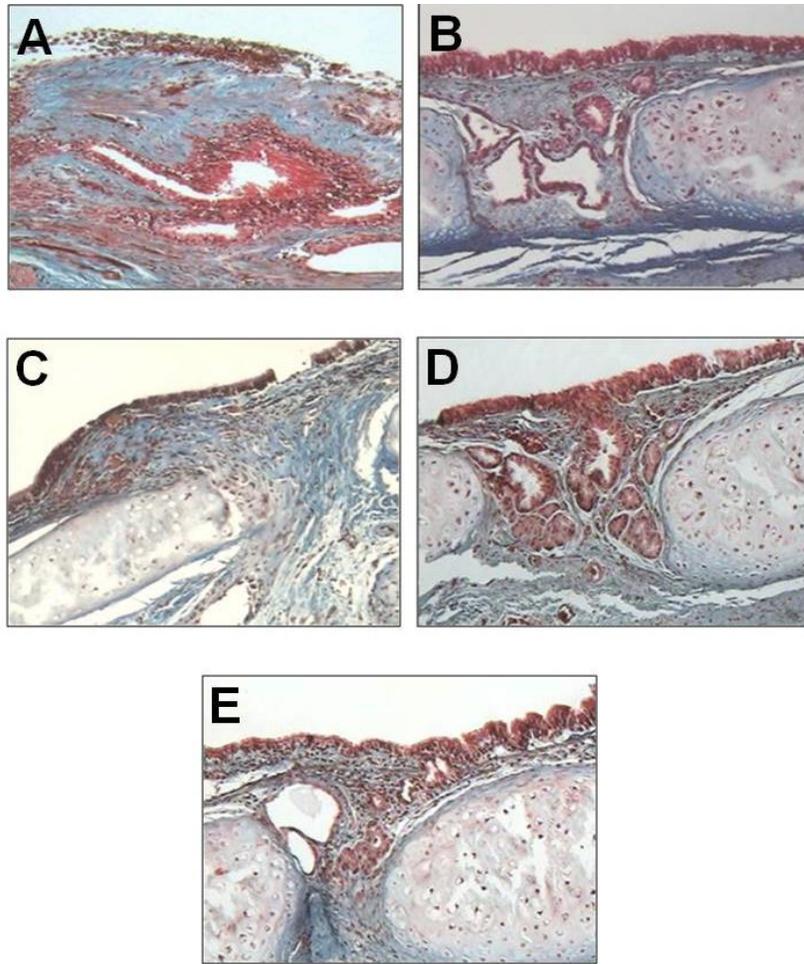
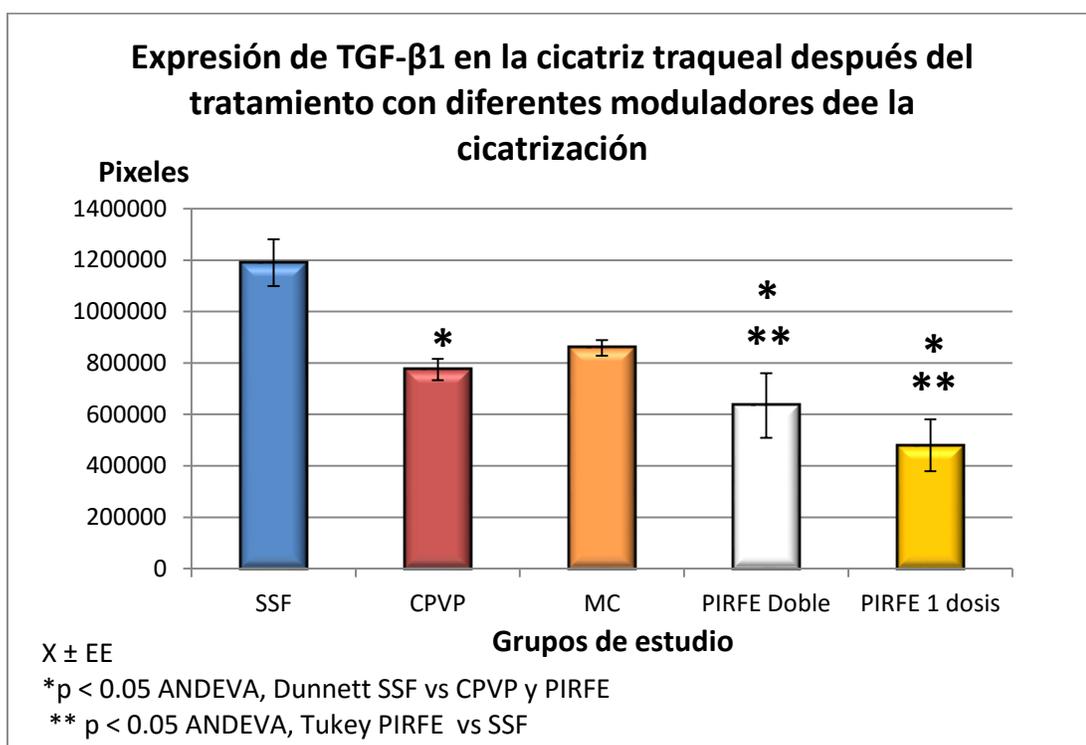


Figura 6. Fotomicrografías en las que se observa: A) Moderada cantidad de fibras de colágena gruesas desorganizadas en el grupo I. B) leve cantidad de fibras de colágena gruesas y organizadas en el grupo de CPVP. C) Fibrosis moderada con fibras de colágena delgadas y desorganizadas. D y E) Leve cantidad de fibras de colágena delgadas y organizadas en los grupos tratados con PIRFE. En A, B, D y E se muestran vasos de neoformación (Masson 100X).

6.5 Hallazgos inmunohistoquímicos

Al valorar la expresión del TGF- β 1 por inmunohistoquímica se observó que éste se expresa en todos los grupos, pero su expresión es menor en los grupos II, IV y V

(Figura 7). Al comparar entre los grupos, la disminución mostrada por los grupos tratados con PIRFE fue diferente en comparación con el grupo I ($p < 0.05$ ANDEVA, Dunnett, Tukey), pero no los grupos II y III. Al comparar el grupo tratado con CPVP solo mostró diferencia significativa vs el grupo I ($p < 0.05$ ANDEVA, Dunnett, Tukey) (Gráfica 12).



Gráfica 12. Expresión de TGF- β 1 por grupo de estudio, en la cicatriz traqueal al final del estudio.

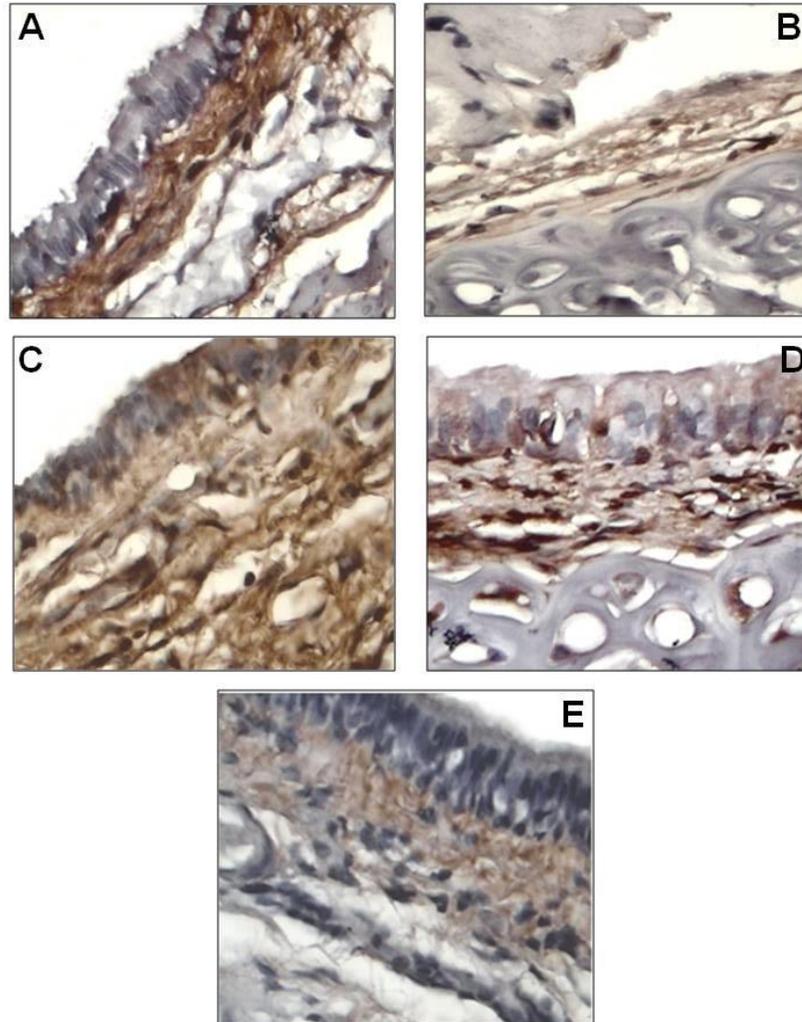
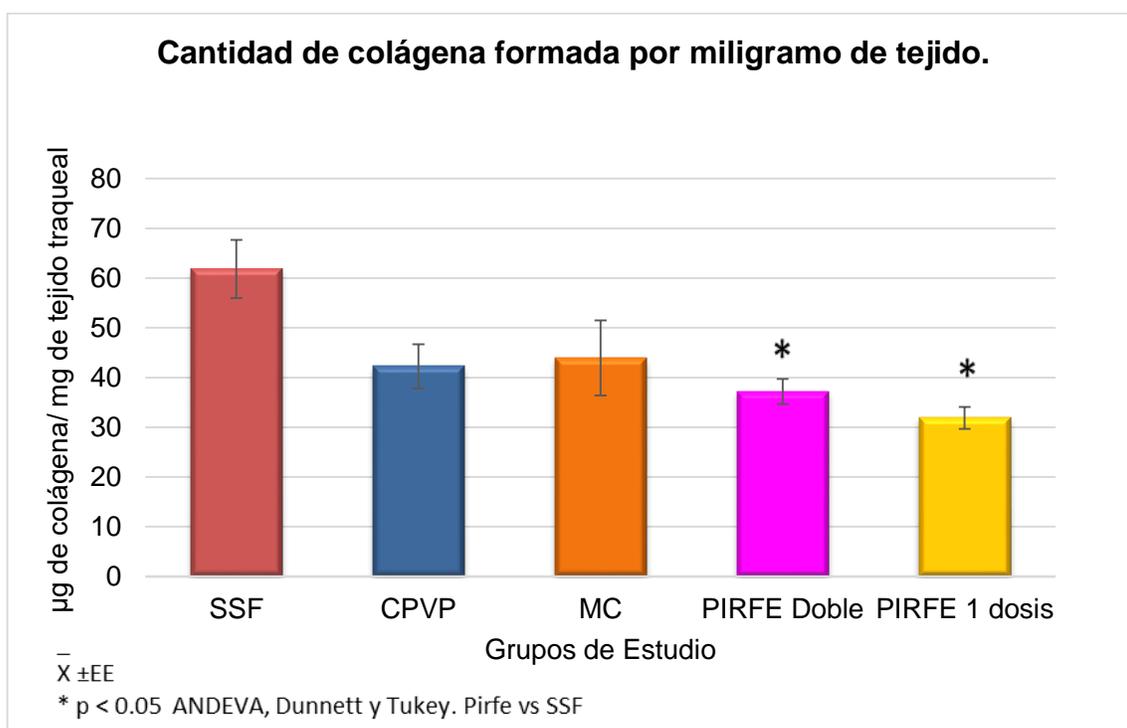


Figura 7. Fotomicrografías de IHQ (400x) de tejido traqueal en un animal de cada grupo. Muestra la expresión de TGF- β 1 en los grupos de SSF (A) y MC (C) en la inmunotinción marrón fuerte. Mientras que la inmunotinción marrón suave muestra la expresión de TGF- β 1 en los animales tratados con CPVP (B) y PIRFE (D y E).

6.6 Hallazgos bioquímicos

Al evaluar la cantidad de colágena formada por miligramo de tejido postraqueoplastía, se observó que en todos hay deposición de colágena; pero la

producida en los grupos que recibieron tratamiento con algún modulador de la cicatrización fue menor que la de los de SSF. Al comparar entre grupos se observó que la menor producción de colágena en los grupos Tratados con PIRFE (IV y V) sólo fue significativa en comparación con el grupo I ($p < 0.05$ ANDEVA, Dunnett, Tukey) (Gráfica 13).



Gráfica 13. Relación entre la deposición de colágena por grupo de estudio, veintiocho días después de la cirugía traqueal.

7. DISCUSIÓN

La ET es una fibrosis desproporcionada de los bordes de las heridas traqueales que obstruyen su luz e impiden la circulación de aire (53). Esta es producto de una cicatrización patológica en la que se presenta una prolongación y/o exageración de la fase inflamatoria que provoca incrementos en la producción de TGF- β 1, el

cual en las etapas finales de la cicatrización está involucrado en la remodelación de la MEC, ya que incrementa la síntesis y depósito de componentes extracelulares tales como fibronectina, proteoglicanos, así como algunas formas de colágena (11,35) y esto promueve un aumento en las fibras de la misma y su desorganización, lo que origina defectos en la remodelación (11,28-33,35).

El tratamiento de las ET se lleva a cabo con procedimientos endoscópicos y quirúrgicos combinado con la aplicación de varios agentes MDC de heridas, para manipular farmacológicamente la formación de la nueva MEC y evitar la reestenosis; sin embargo, no han tenido el éxito deseado debido a que retardan la cicatrización y producen defectos en la revascularización de la mucosa (51,53), y los que evitan la re-estenosis hay que aplicarlos varias veces por vía endoscópica (49,63,64), por lo que es necesario buscar otros MDC.

La PIRFE es un fármaco que en estudios de piel (65,66), fibrosis pulmonar (67-69), cirrosis hepática (70,71), fibrosis renal (75), fibromiomas uterinos (74), adherencias peritoneales (72,73) y prevención de la contractura mamaria después de la colocación de un implante (76), ha mostrado ser efectivo para inhibir la síntesis de colágeno al bloquear la producción de TGF- β 1, además de reducir la respuesta inflamatoria exagerada, con lo que disminuye las fibrosis patológicas; sin embargo, su uso en la cicatrización traqueal no se ha estudiado.

En este estudio se evaluó el efecto de una sola aplicación tópica de CPVP, así como de una y dos dosis vía oral por 4 semanas de PIRFE sobre la expresión de TGF- β 1, deposición de colágena, cambios macroscópicos, tamaño de la luz

traqueal y microscópicos en las cicatrices traqueales de ratas con resección y anastomosis termino-terminal de tráquea cervical.

La dosis de CPVP utilizada en este trabajo, fue la que se ha reportado para el tratamiento de fibrosis epidérmicas, cirugía de tráquea, así como para mejorar el cierre de la membrana timpánica postmiringotomía y se ha observado que favorecen la recuperación de la arquitectura normal del tejido, disminuye la formación de colágena por gramo de tejido y favorece el cierre de la membrana timpánica con un tejido similar al normal (49,60,88). Mientras que la dosis de MC utilizada es la que ha sido reportada con mejores resultados para su uso en humanos (51,63,64). Finalmente en los grupos IV y V se utilizaron dosis de 20 mg/kg una vez al día y 40mg/kg dos veces al día porque en otros estudios realizados por Oku et al. (68), Tian et al. (80) y Selman et al. (67) observaron que estas dosis eran útiles para el tratamiento de la fibrosis pulmonar tanto en animales como en pacientes humanos. Los primeros realizaron un estudio en ratones con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, los cuales fueron tratados con PIRFE a dosis 30 y 100 mg/kg tres veces al día y observaron que a los 28 días postratamiento el uso de esta disminuye la expresión de citocinas proinflamatorias y fibrogénicas, así como la colágena formada en los pulmones de estos animales. Por otro lado Tian et al. reportaron que las dosis de 25, 50 y 100 mg/kg al día de PIRFE tienen efectos antifibróticos y disminuyen la fibrosis histológica. Finalmente Selman et al. describieron que el uso de dosis a 40 mg/kg/día de PIRFE en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, después de 6

meses de tratamiento mejoró sus pruebas funcionales respiratorias y estabilizaron su padecimiento.

Clínicamente, la presencia de estridor observada en todos los grupos de estudio durante la primera semana postcirugía probablemente fue originada porque al realizarse el procedimiento quirúrgico se produjo una lesión, la cual estimulo la presencia de inflamación como mecanismo de defensa y su consecuente presencia de células y mediadores que eliminan los cuerpos extraños, bacterias, tejido dañado o degradan la MEC, que a su vez ocasionaron el incremento en el grosor de la mucosa traqueal que al paso del aire ocasiono la presencia de este signo (10,16,18,19). La presencia de este en los animales del grupo II desapareció durante la segunda semana postcirugía porque la CPVP ejerció su efecto antiinflamatorio y coincide con lo descrito por otros autores que han estudiado el efecto de este fármaco sobre la cicatrización traqueal y han observado los mismo (49,63). En lo que respecta a lo observado en los en los grupos IV y V, no existen reportes de su efecto en la tráquea, pero se puede pensar que la PIRFE también mostró sus efectos antiinflamatorios como lo han observado varios autores que la han utilizado para el tratamiento experimental de la inflamación pulmonar aguda y mencionan que esta droga puede inhibir el reclutamiento de células inflamatorias tanto en los procesos alérgicos como en los no alérgicos (89,90), así mismo en otro estudio realizado en un modelo murino de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina se reportó que el tratamiento con PIRFE después de 10 días disminuye la presencia del edema provocado por la lesión y quizá por esta razón se disminuyó la inflamación de la mucosa traqueal y el estridor (68). Por otro lado, en

el grupo III, la permanencia del estridor por 3 semanas fue debida a que la MC no tiene efecto antiinflamatorio e incluso a los 2 meses de su aplicación, causa irritación del sitio lesionado, acumulación de detritus fibrinoides, tejido de granulación y necrosis del cartílago traqueal expuesto con pérdida de soporte como lo han descrito Roh et al. (53,91), Iñiguez et al. (92), Lama et al. (93), Hueman et al. (94) y Hardillo et al. (95) al estudiar los efectos de la MC clínica y experimentalmente.

Con respecto al cierre de la herida quirúrgica, en los grupos II, IV y V, esta se observó bien cicatrizada y sin inflamación porque los fármacos utilizados en estos grupos inhiben la producción de citocinas proinflamatorias. Lo encontrado en este estudio coincide con lo observado por otros autores que utilizaron la CPVP para mejorar la cicatrización en otros tejidos (49,58,59,88). También concuerda con lo observado por Torres (65) quien utilizó PIERFE al 8% en aplicación tópica para el tratamiento de queloides y describió que el uso de esta disminuye la altura de la cicatriz, tamaño, ancho, pigmentación, vascularidad, dolor y prurito e incrementa la flexibilidad y ellos atribuyen esto a sus propiedades antifibróticas. Además, coincide con lo observado por Gancedo et al. (76) y Shetlar et al. (66) quienes en ratas y ratones (respectivamente) colocaron injertos subcutáneos de varias texturas, así como de tejido queloide y observaron que favorece la contracción de la herida sin fibrosis e inhibe la proliferación de las queloides. Por otro lado, el retraso en la desaparición de la inflamación en el grupo III fue porque la MC no tiene efecto antiinflamatorio e incluso a los 2 meses de su aplicación, provoca

inhibición en la revascularización, irritación del sitio lesionado, acumulación de detritus fibrinoides y tejido de granulación (53,91-95).

En el grupo I la presencia de adherencias moderadas y severas fue ocasionada porque la SSF no tiene efectos antiinflamatorios, ni antifibróticos y el proceso de cicatrización siguió su curso normal. Por otro lado en este trabajo se demostró que la CPVP administrada *in situ* después de la traqueoplastia no evita la formación de adherencias, pero la presencia de estas no son tan severas y son fácilmente despegables, probablemente porque éste fármaco tiene actividad fibrinolítica (49,59,63). Estos hallazgos concuerdan con lo descrito por Cervantes et al. (96) quienes realizaron apendicectomía en conejos, les aplicaron la CPVP intraperitonealmente y un mes después les realizaron nuevamente una laparotomía exploratoria y observaron que no evita la presencia de adherencias intrabdominales, pero disminuye la severidad de estas. En el grupo III, se observaron menos adherencias porque este fármaco tiene un efecto antiproliferativo sobre los fibroblastos con lo que evita la fibrosis, por lo que probablemente cuando estuvo en contacto con los planos musculares y la tráquea ejerció su efecto sobre estas células y evito la formación de adherencias (63,97,98). Estos hallazgos son similares a los observados por Kurt (99), Lee (100), Dogulu (101) y Su (102) quienes evaluaron el efecto del tratamiento tópico con MC sobre la formación de fibrosis peridural y adherencias dures después de realizar laminectomias en ratas y conejos.

La presencia de adherencias completas fácilmente despegables que se observaron en los grupos tratados con PIRFE, probablemente fue originado porque las dosis no fueron suficiente para inhibir la respuesta inflamatoria y la fibrosis provocada por el procedimiento quirúrgico, ya que los efectos del fármaco son dosis dependiente como lo describió Bruss et al. (103) quienes administraron diferentes dosis del fármaco vía oral aplicada diariamente por 26 y 39 semanas en perros y estudiaron la farmacocinética; sin embargo nuestros hallazgos coinciden con lo descrito por Bello et al. (73), quienes estudiaron en ratas el grado de formación de adherencias intra-abdominales después de retirar la serosa del colon y tratar a los animales con PIRFE en gel sobre el sitio de la lesión, y observaron que este fármaco permite la presencia de adherencias laxas a firmes pero despegables a las 3 semanas postcirugía. Por otro lado nuestros hallazgos no concuerdan con lo descrito por Bayhan et al. (104) quienes evaluaron la formación de adherencias intraperitoneales en ratas a las que les provocaron lesiones en el ciego y las trataron con una dosis de 500mg/kg/día de PIRFE durante dos semanas. En referencia a la presencia de edema en la tráquea post aplicación de la MC, aún no ha sido esclarecido del todo; pero se sabe que su efecto antiproliferativo retrasa la cicatrización pero no previene los procesos inflamatorios (105). En estudios realizados en la córnea se ha descrito la presencia de edema en el postoperatorio temprano y se atribuye a que el fármaco retrasa la reepitelialización, provoca cambios en la morfología endotelial, incrementa la apoptosis, la formación de vacuolas y de vesículas (106).

La mayor disminución de la luz traqueal observada en los grupos tratados con SSF y MC probablemente fue originada porque ninguno de los 2 compuestos tiene

propiedades antiinflamatorias y favorecen que prevalezca la inflamación y por lo tanto la acumulación de tejido cicatrizal inmaduro en el sitio de la anastomosis que hace se reduzca la luz del órgano y coincide con lo observado por otros autores han estudiado las complicaciones provocadas por la aplicación tópica de MC en las lesiones traqueales (53,91,92,94). Mientras que en los grupos tratados con CPVP y PIRFE los hallazgos encontrados se pudieron haber presentado porque ambos fármacos tienen actividad fibrinolítica (58-60,90,96,107). Estos hallazgos concuerdan con lo observado en otros trabajos en los que se utilizó la CPVP y la MC como moduladores de la cicatrización traqueal en perros (63,64) y también coinciden con lo observado por Zhou et al. (108) quienes en un modelo murino de trasplante heterotópico traqueal observaron que los animales tratados con PIRFE desarrollaron menor fibrosis luminal.

Los hallazgos observados en este estudio acerca del mayor grado de inflamación histológica desarrollada por los animales de los grupos I y III, fue originado porque ninguno de los tratamientos aplicados en estos grupos tienen actividad antiinflamatoria y nuestras observaciones concuerda con lo reportado por otros autores que han estudiado la utilidad de la MC en las estenosis traqueales y han observado que hasta 2 meses después de su aplicación este fármaco provoca irritación del sitio lesionado, con lo que favorece la inflamación (53,91,92). Mientras que la inflamación leve a moderada desarrollada por los animales tratados con la CPVP fue originada porque este fármaco con periodos de administración cortos y largos posee propiedades anti-inflamatorias como se ha observado en estudios clínicos y experimentales realizados en pacientes con

artritis reumatoide, cicatrices hipertróficas de piel, esclerodermia, úlceras por presión y en las cicatrices postraqueoplastía (49,109-111). Con respecto a la PIRFE presentaron inflamación nula a leve fue porque esta con sus propiedades para evitar el estrés oxidativo inhibe el reclutamiento de células inflamatorias alérgicas y no alérgicas (90), lo cual coincide con lo observado en este estudio y lo reportado por varios autores que han estudiado su efecto en modelos fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (68,112). También concuerda con lo observado por Gancedo et al. (76) quien observó esto en las cicatrices de piel de ratas tratadas con PIRFE. No obstante nuestros hallazgos no concuerdan con lo descrito por Takakuta et al. que estudio los efectos de esta droga sobre la protección renal y observaron que evita la fibrosis pero no la presencia de infiltrado inflamatorio en el intersticio cortical (113). En todos los caso se observó presencia de linfocitos debido a que durante el proceso de cicatrización estos (principalmente los linfocitos T) migran dentro del tejido, produciendo linfocinas y factores de crecimiento que estimulan a los fibroblastos para la producción de colágena (114).

En el presente trabajo, en el grupo de CPVP hubo menor presencia de infiltrado linfocitario posiblemente por el control inflamatorio que proporciona el fármacos al inhibir el infiltrado crónico con lo que disminuye la quimiotaxis y estimulación de los linfocitos (35,115-117). Los hallazgos de este estudio concuerdan con lo observado en estudios realizados en cirugía de tráquea (49) y en cobayos asmáticos que fueron tratados con la droga, que durante la remodelación del tejido presentan leve expresión de linfocitos (109); sin embargo no concuerdan con lo

observado por Furuzawa et al. (110) quienes evaluaron *in vitro* e *in vivo* la seguridad de la CPVP y observaron que este biofármaco no estimula la linfoproliferación. En los grupos tratados con PIRFE la menor cantidad de estos también fue originada porque ejerció sus efectos antiinflamatorios y nuestros hallazgos concuerdan con lo descrito por Shetlar et al. (66) quienes estudiaron el efecto de la PIRFE sobre la proliferación de las cicatrices queloides implantadas en el dorso de ratones y observaron que el tratamiento con esta droga disminuye la producción de linfocitos. También concuerda con lo descrito por Hirano et al. (118) quienes en un modelo de hiperreactividad bronquial alérgica producida por la exposición crónica a ovoalbúmina, les aplico el tratamiento con PIRFE y observaron que esta disminuye acumulación de eosinófilos y de linfocitos; además concuerdan con lo observado por Corbel et al. (119) que estudiaron la remodelación de la vía aérea durante el daño pulmonar agudo en ratones tratados con PIRFE y describieron que esta reduce la afluencia de linfocitos en el lavado broncoalveolar durante las fases tempranas de la fibrosis.

Las células gigantes a cuerpo extraño que se observaron en la zona de las suturas de un animal de todos los grupos es una respuesta de inflamación crónica granulomatosa, en la cual el material de sutura que fue el utilizado para la anastomosis, actuó como un irritante y provocó la fusión de los macrófagos, que al digerir el material dieron lugar a la formación de células gigantes a cuerpo extraño y concuerda con lo descrito por otros autores que han estudiado la cicatrización traqueal después del tratamiento con diferentes MDC y han observado lo mismo (48,49).

Los resultados observados en los grupos tratados con CPVP y PIRFE concuerdan con lo reportado por Fielder et al. (120) quienes al estudiar cicatrices fibróticas postquemaduras, confirmaron que la inhibición de las citocinas proinflamatorias y profibrogénicas como lo hacen estos fármacos, evitan la fibrosis, promueven la formación de fibras de colágena organizadas como en los tejidos normales (60,121), además porque son fármacos bloqueadores de TGF- β , producción de colágena y activadores de MMPs, con lo que modulan la fibrosis (64,66,90,107). También concuerdan con lo observado por varios autores que han aplicado la CPVP tópicamente y concluyen que la aplicación de esta droga favoreció la producción y depósito organizado de colágena en la MEC como se ha descrito en otros tejidos (35,48,49,88,117), así mismo concuerda con lo observado por otros autores que han observado menor fibrosis y organización de la colágena después del tratamiento con PIRFE para el tratamiento de lesiones de piel (65), pulmón (68,112), tráquea (108), hígado (70,122), riñón (113) y en ojos con glaucoma (123).

En el grupo tratado con MC, la presencia de fibrosis moderada a severa con y fibras de colágena desorganizadas en el sitio de la herida fue porque este fármaco no posee propiedades antiinflamatorias y además su aplicación provoca irritación del sitio lesionado e inflamación prolongada que favorece la fibrosis. Sin embargo nuestros hallazgos, no concuerdan con los hallazgos histológicos descritos por Abbas et al. (97) quienes estudiaron los cambios microscópicos producidos por la MC y el fluoracil en miringotomías y con los descritos por Ozturk et al. (98) que investigaron los cambios histopatológicos producidos por la aplicación tópica de

este fármaco en la mucosa mastoidea. Tampoco concuerdan con lo observado por Zhong et al. (123) quienes compararon el uso de MC y PIRFE en un modelo animal de cirugía de glaucoma y observaron que ambos fármacos reducen la fibrosis. Sin embargo nuestros hallazgos concuerdan con lo descrito por Reza et al. (124) y Eliashar et al. (125) que estudiaron los efectos de esta droga en estenosis traqueales. También coinciden por lo observado por Glen et al. (126) que observaron histológicamente que tanto el tratamiento intradérmico como el tópico en las heridas de piel producen disminución en la fibrosis y deposición de colágena a las 4 semanas post-tratamiento.

Probablemente la leve cantidad de vasos sanguíneos observados en los animales tratados con MC se debió a que la estimulación de la angiogénesis durante la cicatrización de las heridas se presenta durante las dos primeras semanas después de la cirugía (127) y la MC tiene efecto entre la 2 y 4 semanas postratamiento e inhibe la angiogénesis porque bloquea expresión del VEGF como lo describió Su et al. al estudiar el efecto de este fármaco en la cicatrización poslaminectomía (102). A diferencia de la moderada presencia de vasos de neoformación observada en los otros grupos II, IV y V en los que los fármacos no inhibieron la angiogénesis como se ha descrito en otros estudios (49,63,76,121,128).

Con respecto a la expresión inmunohistoquímica del TGF- β 1, todos los fármacos mostraron menor expresión del mismo. En el grupo de CPVP probablemente fue ocasionada porque este fármaco provoca cambios en el metabolismo celular y disminuye la producción de citocinas proinflamatorias y profibrogénicas (129), lo

cual coincide con lo descrito por Krötzsch et al. (60) quienes evaluaron la expresión *in situ* de TGF- β 1 por inmunohistoquímica en biopsias de piel normal, con cicatriz hipertrófica y cicatrices hipertróficas tratadas con inyección intradérmica por 8 semanas con CPVP y encontraron que la expresión de este factor de crecimiento profibrogénico disminuyó en las cicatrices tratadas con CPVP comparadas con las no tratadas; además en este estudio el autor realizó cultivo de fibroblastos de piel normal y con cicatrices hipertróficas con y sin tratamiento y se percataron que el TGF- β 1 se expresó menos en la cicatrices tratadas que en las muestras de piel normal y cicatrices hipertróficas (60). Lo observado en este estudio también concuerda con lo descrito por Furuzawa et al. quienes compararon la utilidad de la CPVP y la triamcinolona para el tratamiento de lesiones de piel producidas por escleroderma y observaron que ambos disminuyen la expresión de TGF- β 1, pero la primera lo hace de forma regulada (130). Existen pocos estudios en el que se haya evaluado la expresión de TGF- β 1 después de la aplicación de MC; sin embargo en un estudio *in vitro* se reportó que la aplicación por 5 minutos de esta droga en cultivos de fibroblastos dérmicos humanos inhibe la expresión de los niveles del ARNm de TGF- β 1 a los 7 días postcultivo y concluyen que esto se presentó por que la MC inhibe la proliferación de fibroblastos e induce la apoptosis de fibroblastos con lo que evita la expresión de este factor de crecimiento y de colágena (131), lo cual concuerda con lo observado en este estudio. Sin embargo nuestros resultados no coinciden con lo reportado por Glen et al, que compararon el efecto de la aplicación dérmica y tópica de MC sobre la expresión de TGF- β 1 en las cicatrices de piel del dorso de ratas a la semana, segunda semana, un mes y seis meses posteriores a la lesión

y encontraron que este no se expresa en ningún tiempo (126). En los grupos tratados con PIRFE se observó menor expresión de TGF- β 1 porque es un fármaco que tiene propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y antifibróticas que evitan la inflamación prolongada, permiten la regulación a nivel transcripcional y traduccional de la expresión de citocinas proinflamatorias y profibrogénica, así como la regulación de la homeostasis entre la síntesis y la degradación de la colágena en la MEC (90,122) y nuestros hallazgos concuerdan con lo observado por Oku e Iyer et al. que estudiaron los efectos del tratamiento con PIRFE sobre la producción de diferentes citocinas pulmonares y el TGF- β 1 en ratones, cobayos y ratas, respectivamente (68,80,112). También coinciden con lo descrito por Gancedo et al. (76) quienes después de aplicar PIRFE por 8 semanas a ratas a las que se les colocaron implantes mamarios en el dorso, encontraron que este factor de crecimiento disminuye su expresión en los animales que recibieron el tratamiento en comparación con los que no lo recibieron. Además en otro estudio se reporta la disminución en la expresión del TGF- β 1 en suero y tejidos a los 26 y 28 días después de aplicar este fármaco a ratas con trasplante heterotópico de tráquea (108). Así mismo otros autores han reportado que en ratones asmáticos tratados con PIRFE, disminuye la presencia de TGF- β 1 en el lavado bronquioalveolar (118).

La evaluación bioquímica reveló que hubo menor deposición de colágeno cuando los animales fueron tratados con los diferentes moduladores de la cicatrización, esto posiblemente se debió a que la CPVP, disminuyó el proceso inflamatorio e inhibió la producción de citocinas fibrogénicas (49,61,67-76,88); mientras que la MC disminuyó la proliferación, replicación e indujo la apoptosis de los fibroblastos

con lo que promueve la disminución en la expresión de los niveles de procolágena I y III (97,131). Hasta la fecha existen pocos estudios de cicatrización traqueal en los que se haya cuantificado bioquímicamente la cantidad de colágena formada por gramo de tejido traqueal. Se ha reportado la cuantificación de esta en varios modelos experimentales caninos de cicatrización traqueal en los que se realizó anastomosis termino terminal de un segmento de tráquea cervical con la aplicación tópica de ácido hialurónico (AH), CPVP, la mezcla AH-CPVP, así como MC en el sitio traqueal anastomosado para evaluar su efecto sobre la deposición de colágena en la cicatriz postraqueoplastía y se observó los tres fármacos disminuyen la deposición de colágena en la cicatriz traqueal; pero tanto la mezcla como la MC la reducen de manera más significativa, lo que concuerda con nuestro estudio (48,63,64). No obstante cabe mencionar que en esos estudios la aplicación de la CPVP se realizó en 4 ocasiones vía endoscópica a diferencia de este trabajo en el que se aplicó solo al momento de la cirugía, lo cual sería importante para su uso en forma clínica ya que los pacientes no tendrían que someterse a otro procedimiento invasivo para la aplicación del tratamiento. Con respecto a lo observado en los animales de los grupos IV y V, se debió probablemente a que la PIRFE redujo la producción de colágena por mg de tejido traqueal posiblemente porque es un fármaco que aparte de bloquear la producción de factores profibrogénicos, activa la producción de MMPs con lo que modula la vía fibrogénica (90), pero tampoco existen estudios en los que se haya estudiado la deposición de colágena en la cicatriz traqueal después del tratamiento con PIRFE; sin embargo los resultados de esta investigación concuerdan con los estudios realizados en modelos de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en

ratones y hamsters en los que si se ha cuantificado la deposición de colágena en el tejido dañado y se ha observado que esta disminuye de manera importante (68,112). Nuestros resultados también concuerdan con lo descrito por Zhao et al. (107) quienes evaluaron el efecto de la PIRFE sobre la fibrosis histológicas y deposición de colágena en un modelo de cirrosis hepática producida por tetracloruro de carbono en ratones, así como por el complejo antígeno-anticuerpo de albúmina en ratas y observaron que esta disminuye significativamente los niveles de hidroxiprolina en el tejido hepático. Cabe mencionar que con lo observado en este estudio se puede decir que la PIRFE disminuye más la formación de colágena por mg de tejido traqueal que la CPVP, pero hay que aplicarla por 28 días consecutivos.

8. CONCLUSIONES

Con base a lo anterior se puede concluir que tanto la aplicación tópica de una dosis de CPVP y la administración de PIRFE evitan la estenosis traqueal, ya que disminuyen la inflamación, fibrosis, expresión de TGF- β 1 y deposición de colágena en la cicatriz postraqueoplastía en un modelo experimental de cicatrización traqueal. No obstante con lo observado en este estudio se tiene que considerar que aunque los resultados son similares con los dos fármacos, la mejor opción terapéutica es la CPVP porque sólo requirió de una aplicación, lo cual en la clínica es menos molesto para el paciente, además de ser más económico. También se tiene que tomar en cuenta que lo observado en esta investigación sólo muestra los resultados de un modelo de cicatrización en animales sanos; por lo que se requiere de nuevas investigaciones experimentales en las que se evalué el efecto de estos fármacos en animales con estenosis traqueales.

9. REFERENCIAS

1. Tortora GJ, Derrickson B. Principios de Anatomía y fisiología. 11 ed. México DF: Ed. Medica Panamericana; 2006.
2. Ross MH, Pawlina W. Histología. Texto y atlas de color con biología celular y molecular. 6ª ed. Buenos Aires: Ed. Medica Panamericana; 2012./
3. Wiberg C, Klatt AR, Wagener R, Paulsson M, Bateman JF, Heinegard D. Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan. *J Biol. Chem.* 2003; 278: 37698-37704.
4. Hinderer S. Engineering of fibrillar decorin matrices for a tissue-engineered trachea. *Biomaterials.* 2012; 33: 5259-5266.
5. Schaefer L. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res.* 2010; 339: 237-246.
6. Aumailley M, Gayraud B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J. Mol. Med.* 1998; 76: 253-265.
7. Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther.* 1999; 79: 308-319.
8. Scott JE. Elasticity in extracellular matrix 'shape modules' of tendon, cartilage, etc. A sliding proteoglycan-filament model. *J Physiol.* 2003; 553: 335-343.
9. Silver FH, Glasgold AI. Cartilage wound Ealing. An overview. *Otolaryngologic Clin North Am.* 1995; 28:847-864.

10. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 2004; 9: 283-289.
11. Salem C, Vidal A, Mariangel P, Concha M. Cicatrices hipertróficas y queloides. *Cuad. Cir.* 2002; 16: 77-86.
12. Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Pecoraro RE, Rodeheaver G. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Arch Dermatol.* 1994; 130: 489-493.
13. Schroeder JW, Rastatter JC, Walner DL. Effect of vascular endothelial growth factor on laryngeal wound healing in rabbits. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007; 137: 465-470.
14. Hernández-Ramírez GA. Fisiología de la cicatrización cutánea. *RFS.* 2010; 2:69-78.
15. Limana ST, Kara CO, Bir F, Yildirim DB, Topcu S, Sahin B. The effects of estradiol and progesterone on the synthesis of collagen in tracheal surgery. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2005; 69: 1327-1331.
16. Hirshoren N, Eliashar R, Wound-healing modulation in upper airway stenosis-myths and facts. *Head Neck;* 2009; 31:111-126.
17. Hernández CA, Toro AM. Enfoque y manejo de las cicatrices hipertróficas y queloides. *Rev Asoc Colomb Dermatol.* 2011; 19: 218-228.
18. Clark RA. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 936: 355-367.

19. Kim WJ, Gittes G K, Longaker MT. Signal transduction in wound pharmacology. *Arch Pharm Res.* 1998; 21: 487-495.
20. Teller P, White TK. Fisiología de la cicatrización de la herida: de la lesión a la maduración. *Surg Clin N Am.* 2009; 89: 599–610.
21. Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int.* 1992; 41: 557-559.
22. Seibold KL, Sherwood MB, Kahook MY. Wound Modulation After Filtration Surgery. *Surv Ophthalmol* 2012; 57: 530-550.
23. Manicone AM, McGuire JK. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cell Dev Biol.* 2008; 19: 34-41.
24. Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40: 1334-1347.
25. Nissinen L, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 8: 2571-2580.
26. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 2007; 25: 9-18.
27. Hornstra IK, Birge S, Starcher B, Bailey AJ, Mecham RP, Shapiro SD. Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice. *J Biol Chem.* 2003; 278: 14387-14393

28. Senties-Gómez MD, Gálvez-Gastélum FJ, Meza-García Eduardo, Armendáriz-Borunda J. Fibrosis Hepática. El papel de las metaloproteinasas y de TGF- β . Gac Méd Méx 2005; 141: 315-322.
29. Prieto M, Rivas JV, López-Novoa JM, Pérez-Barriocanal F. El TGF- β : síntesis y mecanismo de acción. Nefrología. 2002; 22: 135-143.
30. Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. Int J Burn Trauma 2012; 2: 18-28
31. Walraven M, Gouverneur M, Middelkoop E, Beelen R, Ulrich M. Altered TGF- β signaling in fetal fibroblasts: What is known about the underlying mechanisms?. Wound Rep Reg. 2014; 22: 3-13.
32. Vilchis-Landeros MM, Juárez P, López-Casillas F. El papel fisiopatológico del TGF- β en las nefropatías de diversas etiologías: los inhibidores del TGF- β como agentes terapéuticos potenciales. Gac Méd Méx. 2003; 2: 126-134.
33. Hernández-Pando R. Participación del factor de transformación tumoral- β en la regulación de la inflamación y la respuesta inmunológica. Gac Méd Méx. 2003; 2: 135-138.
34. Elicora A, Liman ST, Yegin BA, Akgül AG, Eroglu H, Yildiz K, Topcu S, Ozer C. Effect of Locally Applied Transforming Growth Factor Beta 3 on Wound Healing and Stenosis Development in Tracheal Surgery. Respir Care. 2014; 59: 1281-1286.

35. Ferguson MW, O'Kane S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004; 359: 839-850.
36. Rolfe KJ, Grobbelaar AO. A review of fetal scarless healing. *ISRN Dermatol.* 2012;2012:698034. doi: 10.5402/2012/698034. Epub 2012 May 17.
37. Zheng Z, Nguyen C, Zhang X, Khorasani H, Wang JZ, Zara JN, Chu F, Yin W, Pang S, Le A, Ting K, Soo Ch. Delayed wound closure in fibromodulin-deficient mice is associated with increased TGF- β 3 signaling. *J Invest Dermatol.* 2011; 131: 769-778.
38. Cordeiro MF. Beyond mitomycin: TGF- β and wound healing. *Prog Retin Eye Res.* 2002; 21:75-89.
39. Rahban SR, Garner WL. Fibroproliferative scars. *Clin Plast Surg.* 2003; 30:77-89.
40. Loewen M, Walner DI, Caldarelli DD. Improved airway healing using transforming growth factor beta-3 In a rabbit model. *Wound Rep Reg.* 2001; 9:44-49.
41. Nedelec B, Ghahary A, Scott PG, Tredget EE. Control of wound contraction. Basic and clinical features. *Hand Clin.* 2000; 16: 289-302.
42. Temiz A, Kazikdas KC, Ergur B, Tugyan K, Bozok S, Kaya D, Guneli E. Esterified hyaluronic acid improves cartilage viability in experimental tracheal reconstruction with an auriculargraft. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010; 143: 772-778.

43. Papla B, Dyduch G, Frasik W, Olechnowicz H. Post-Intubation Tracheal Stenosis - Morphological-Clinical Investigations. *Pol J Pathol.* 2003; 54: 261-266.
44. Wain JC. *Postintubation Tracheal Stenosis.* Elsevier Inc 2009: 284-289.
45. Zaldívar-Cervera JA, Santiago-Romo JE, Mora-Fol R, Torres-Guillén NA, Careaga-Reyna G. Manejo quirúrgico de la estenosis traqueal en pediatría. Experiencia de 2001 a 2011. *Neumol Cir Torax* 2011;70:243-246.
46. Navarro-Reynoso FP. Tratamiento multidisciplinario de la obstrucción de la vía aérea. Simposio. *Gac Méd Méx* 2002; 138: 427-428.
47. Mutrie CJ, Eldaif SM, Rutledge CW, Force SD, Grist WJ, Mansour KA, Miller DL. Cervical Tracheal Resection: New Lessons Learned. *Ann Thorac Surg* 2011;91: 1101-1106.
48. Olmos-Zuñiga JR, Santos-Cordero A, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, Gaxiola-Gaxiola M, Mora-Fol JR, Franco-Oropeza JA, Santillan-Doherty P. Efecto del ácido hialurónico sobre la cicatrización traqueal en un modelo experimental canino. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2004; 55: 81-87.
49. Olmos JR, Hernández C, Díaz E, Jasso R, Sotres A, Gaxiola M. Wound healing modulators in a tracheoplasty canine model. *J Invest Surg.* 2007; 20: 333-338.
50. Chen Z, Luo J, Xu L, Ma R, Zhang N, Cui P. A model of canine tracheal stenosis induced by radiofrequency cauterization. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2012; 76: 183-188.

51. Rahbar R, Shapshay SM, Healy GB. Mitomycin: Effects on laryngeal and tracheal stenosis, benefits and complications. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2001; 110:1-6.
52. Livingstone GL, Schild JA. Lathirogenic agents as therapy for subglottic stenosis a pilot study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1987; 97:446-451.
53. Roh JL, Kim DH, Rha KS, Sung MW, Kim KH, Park CH. Benefits and risks of mitomycin use in the traumatized tracheal mucosa. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007; 136: 459-463.
54. Palmer S. Mitomycin as adjunct chemotherapy with trabeculectomy. *Ophthalmol.* 1991; 98: 317-321.
55. Bergstrom TJ, Wilkinson WS, Skuta GL, Watnick RL, Elner VM. The effects of subconjunctival mitomycin C on glaucoma filtration surgery in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 1725-1730.
56. Smith ME, Elstad M. Mitomycin C and the endoscopic treatment of laryngotracheal stenosis: are two applications better than one?. *Laryngoscope.* 2009; 119: 272-283.
57. Simpson CB, James JC. The efficacy of mitomycin-C in the treatment of laryngotracheal stenosis. *Laryngoscope.* 2006; 116: 1923-1925.
58. Rodríguez R, Furuzawa J, Corchado A, Krötzsch F. Collagen-polyvinylpyrrolidone promotes human wound healing through cytokine down modulation. *Wound Rep Reg.* 2001; 9: 166.

59. Suárez C, Salgado RM, Apis AM. Inducción del tejido de granulación por pasta de Lassar vs colágena polivinilpirrolidona en úlceras por insuficiencia venosa. *Cir Plast.* 2004; 14: 5-13.

60. Krötzsch E, Díaz de León E, Furuzawa GJ, Marquez R, Quiroz E, Citokine expresión is down regulated by collagen-polivinylylpirrolidone in hyperthrophic scars. *J Invest Dermatol.* 1998; 111: 828-834.

61. Loyola U. Respuesta Terapéutica A La Colágeno-Polivinil Pirrolidona En Un Modelo Experimental De Estenosis Traqueal Canino. Tesis Especialidad de Cirugía Torácica. México D.F. Facultad de Medicina. UNAM, 2001.

62. Santillán A. Efecto de diferentes moduladores cicatrízales en la traqueoplastía. Tesis Especialidad de Otorrinolaringología, Cirugía de Cabeza y Cuello. México D.F. Facultad de Medicina. UNAM, 2006.

63. González I. Efecto de la aplicación de la mezcla de ácido hialurónico y colágeno polivinil-pirrolidona y de la mitomicina c sobre la expresión de decorina en la cicatriz postraqueoplastía en un modelo experimental canino. Tesis Especialidad de Otorrinolaringología, Cirugía de Cabeza y Cuello. México D.F. Facultad de Medicina. UNAM, 2013.

64. Solís N. Tesis: Efecto de diferentes moduladores de la cicatrización sobre la expresión de metaloproteinas 9 en la cicatrización de traqueoplastías en perros. Maestría en Ciencias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2014.

65. Torres J, Ramos A, Rodríguez J, De la Parra M. El uso de Pirfenidona tópica en el tratamiento de cicatrices patológicas: estudio clínico en fase II. XIX Congreso Internacional de Cirugía Endoscópica. Asoc Mex Cir End. 2010.
66. Shetlar MR, Shetlar DJ, Bloom RF, Shetlar CL, Margolin SB. Involution of keloid implants in athymic mice treated with pirfenidone or with triamcinolone. *J Lab Clin Med.* 1998; 132: 491-496.
67. Selman M, Navarro MC, Gaxiola M. Fibrosis pulmonar idiopática: en busca de un tratamiento eficaz. *Arch Bronconeumol.* 2005;41:15-20.
68. Oku H, Shimizu T, Kawabata T, Nagira M, Hikita I, Ueyama A, Matsushima S, Torii M, Arimura A. Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: Different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *Eur J Pharm.* 2008; 590: 400-408.
69. Nakayama S, Mukae H, Sakamoto N, Kakugawa T, Yoshioka S, Soda H, Oku H, Urata Y, Kondo T, Kubota H, Nagata K, Kohno S. Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF- β 1-stimulated human lung fibroblasts. *Life Sci.* 2008; 82: 210-217.
70. García L, Hernández I, Sandoval A, Salazar, García J, Vera J, Grijalva G, Muriel P, Margolin S, Armendariz-Borunda J. Pirfenidone affectively reverses experimental liver fibrosis. *J Hepatol.* 2002; 32: 797-805.
71. Armendáriz-Borunda J, Islas-Carbajal MC, Meza-García E, Rincón AR, Sandoval AS, Salazar A, Berumen J, Alvarez A, Alvarez A, Covarrubias A,

Aréchiga G, García L. A pilot study in cirrhotic patients using a new antiinflammatory and antifibrotic agent, pirfenidone. *Gut*. 2006; 55: 1663-1665.

72. Al-Took S, Murray C, Tulandi T. Effects of pirfenidone and dermoid cyst fluid on adhesion formation. *Fertil Steril*. 1998; 69: 341-342.

73. Bello-Guerrero JA, Cruz-Santiago CA, Luna-Martínez J. Pirfenidone vs sodium hyaluronate/carboxymethylcellulose as prevention of the formation of intra-abdominal adhesions after colonic surgery. A randomized study in an experimental model. *Cir Esp*. 2016; 94: 31-37.

74. Lee BS, Margolin SB, Nowak AR. Pirfenidone: A novel pharmacological agent that inhibits leiomyoma cell proliferation and collagen production. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83: 219-223.

75. Shimizu T, Kuroda T, Hata S, Fukagawa M, Margolin SB, Kurokawa K. Pirfenidone improves renal function and fibrosis in the postobstructed kidney. *Kidney Int*. 1998; 54: 99-109.

76. Gancedo M, Ruiz-Corro L, Salazar-Montes A, Rincón AR, Armendáriz-Borunda J. Pirfenidone prevents capsular contracture after mammary implantation. *Aesth Plast Surg*. 2008; 32: 32-40.

77. Estados Unidos Mexicanos. AFÍA. 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* 6 dic, 1999.

78. National Institutes of Health U.S.A. Guía Para el Cuidado y Uso de Los Animales de Laboratorio. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health U.S.A. Edición Mexicana Auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. México, D.F. 2002.

79. Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain*. 2011; 7: 55. <http://www.molecularpain.com/content/7/1/55>

80. Tian XL, Yao W, Guo ZJ, Gu L, Zhu YJ. Low dose pirfenidone suppresses transforming growth factor beta-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and protects rats from lung fibrosis induced by bleomycina. *Chin Med Sci J*. 2006; 21: 145-151.

81. Academy of Surgical Research. Course of Animal Anesthesia and Models. Memories of the Course of Animal Anesthesia and Models of the 12th Annual Meeting and 1ST International Conference of the Academy of Surgical Research; October 1996: Muenster, Germany. Academy of Surgical Research, 1996.

82. Olmos-Zúñiga JR, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, Gaxiola-Gaxiola MO, Argote-Green LM, Lara-Guerra H, et al. Evaluación de la utilidad del pericardio bovino en resecciones pulmonares no anatómicas en perros. *Rev Investig Clínica*. 2002; 54:334-341.

83. Freitag L, Ernst a, Unger M, Kovitz K, Marquette CH. A proposed classification system of central airway stenosis. *Eur Respir J.* 2007; 30: 7-12.
84. Veiga A, Rendal M, Matheu G, Andi3n C. S3nchez J, Segura R, et al. Cambios histopatol3gicos en arterias humanas sometidas a procesos de isquemia fr3a y criopreservaci3n. *Angiolog3a.* 2004; 56: 97-105.
85. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: An open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *Plos One.* 2014; 9: 1-11.
86. Mungu3a A. Tesis: Comparaci3n de dos m3todos para la determinaci3n del contenido de col3gena en pulm3n de rat3n. Maestr3a en Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM, 2007.
87. Garza M. Tesis: Evaluaci3n de una t3cnica de aglutinaci3n simple para la detecci3n de entamoeba histolytica schaudinn, 1903 (protozoa: endamoebidae). Maestr3a en ciencias. Facultad De Ciencias Biol3gicas. UANL, 1996.
88. Olmos-Z3niga JR, Gonz3lez-L3pez R, Gaxiola-Gaxiola M, Cristerna-S3nchez L, Villalba-Caloca J, Baltazares-Lipp M, Soda-Merhy Antonio, Hern3ndez-Jim3nez C, Jasso-Victoria R. Effects of middle ear packing with collagen polyvinylpyrrolidone and hyaluronic acid in guinea pigs. *J Invest Surg.* 2012; 25: 398-404.
89. Spond J, Case N, Chapman RW, Crawley Y, Egan RW, Fine J, Hey JA, Kreutner W, Kung T, Wang P, Minnicozzi M. Inhibition of experimental acute pulmonary inflammation by pirfenidone. *Pulm Pharmacol Ther.* 2003; 16: 207-214.

90. Macías-Barragán J, Sandoval-Rodríguez A, Navarro-Partida J, Armendáriz-Borunda J. The multifaceted role of pirfenidone and its novel targets. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2010;3:16. <http://www.fibrogenesis.com/content/3/1/16>.
91. Roh JL, Koo BS, Yoon YH, et al. Effect of topical mitomycin C on the healing of surgical and laser wounds: a hint on clinical application. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 133:851-856.
92. Iñiguez R, San Martín JS, Iñiguez M, Zuñiga S, Jofre D, González S, Guilemani JM, Iñiguez R. Effect of mitomycin in the surgical treatment of tracheal stenosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 134: 709-714.
93. Lama PJ, Fechtner RD. Antifibrotics and wound healing in glaucoma surgery. *Surv Ophthalmol.* 2003; 48: 314-346.
94. Hueman EM, Simpson CB. Airway complications from topical mitomycin C. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 133:831-835.
95. Hardillo J, Vanclooster C. An investigation of airway wound healing using a novel in vivo model. *Laryngoscope.* 2001; 111:1174-1182.
96. Cervantes C, Olaya E, Testas M, García N, Coste G, Arrellin G, Luna A, Krötzsch F. Collagen-PVP, a collagen synthesis modulator, decreases intraperitoneal adhesions. *J Surg Research.* 2003; 110: 207-210.
97. Abbas MM, Mohajeri D. Microscopic comparison of topical use of Mitomycin C and Fluorouracil on cold knife myringotomy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2012; 76: 9-13.

98. Ozturk L, Kaygusuz I, Akpolat N, Keles E, Karlidag T, Alpay HC, Yalcin S. Histopathologic changes in guinea pig mastoid mucosa after topical mitomycin C application followed by mastoidectomy. *Am J Otolaryngol.* 2008; 29: 300-304.
99. Kurt G, Aytar MH, Dogulu F, Cemil B, Erdem O, Baykaner MK, Ceviker N. A comparison of the local effectiveness of mitomycin C, aprotinin, and Adcon-L in experimental peridural fibrosis. *Surg Neurol.* 2008; 70: 608-613.
100. Lee JY, Stenzel W, Ebel H, Wedekind C, Ernestus RI, Klug N. Mitomycin C in preventing spinal epidural fibrosis in a laminectomy model in rats. *J Neurosurg.* 2004; 100: 52-55.
101. Dogulu F, Kurt G, Emmez H, Erdem O, Memis L, Baykaner K, Ceviker N. Topical mitomycin C induced inhibition of postlaminectomy peridural fibrosis in rabbits. *J Neurosurg.* 2003; 99: 76-79.
102. Su C, Sui T, Zhang X, Zhang H, Cao X. Effect of topical application of mitomycin-C on wound healing in a postlaminectomy rat model: An experimental study. *Eur J Pharmacol.* 2012; 674: 7-12.
103. Bruss ML, Margoli SB, Giri SN. Pharmacokinetics of orally administered pirfenidone in male and female beagles. *J Vet Pharmacol Ther.* 2004; 27: 361-367.
104. Bayhan Z, Zeren S, Kocak FE, Kocak C, Akcilar R, Kargı E, Tiryaki C, Yaylak F, Akcilar A. Antiadhesive and antiinflammatory effects of pirfenidone in postoperative intraabdominal adhesion in an experimental rat model. *J Surg Res.* 2015, doi: 10.1016/j.jss.2015.11.033.

105. Roh JL, Lee YW, Park CI. Can mitomycin C really prevent airway stenosis? *Laryngoscope*. 2006; 116: 440-445.
106. Shu-Wen C. Early corneal edema following topical application of mitomycin-C. *J Cataract Refract Surg* 2004; 30: 1742-1750.
107. Zhao XY, Zeng X, Li XM, Wang TL, Wang BE. Pirfenidone effectively inhibits carbon tetrachloride- and albumin complex-induced liver fibrosis in rodents by preventing activation of hepatic stellate cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009, 36:963-8.
108. Zhou H, Latham CW, Zander DS, Margolin SB, Visner GA. PIRFENidone Inhibits Obliterative Airway Disease in Mouse Tracheal Allografts. *J Heart Lung Transplant*. 2005; 24: 1577-1585.
109. Bazán-Perkins B, Campos MG, Sánchez-Guerrero E. Polymerized type I collagen reverts airway hyperresponsiveness and fibrosis in a guinea pig asthma model. En *Inflammatory Diseases 2*. Editor. Mahin Khatami, 2011, ISBN: 978-953-307-762-8.
110. Furuzawa-Carballeda J, Rojas E, Valverde M, Castillo I, Diaz de León L, Krötzsch E. Cellular and humoral responses to collagen–polyvinylpyrrolidone administered during short and long periods in humans. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003, 81: 1029-1035.
111. Furuzawa-Carballeda J, Lima G, Llorente L, Nuñez-Alvarez C, Ruiz-Ordaz BH, Echevarría-Zuno S, Hernández-Cuevas V. Polymerized-type I collagen

downregulates inflammation and improves clinical outcomes in patients with symptomatic knee osteoarthritis following arthroscopic lavage: A randomized, double-blind, and placebo-controlled clinical trial. *Scientific World Journal*. 2012, 342854. doi:10.1100/2012/342854.

112. Iyer SN, Gurujeyalakshmi G, Giri SN. Effects of pirfenidone on transforming growth factor-beta gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999; 291: 367-373.

113. Takakuta K, Fujimori A, Chikanishi T, Tanokura A, Iwatsuki Y, Yamamoto M, Nakajima H, Okada M, Itoh H. Renoprotective properties of pirfenidone in subtotaly nephrectomized rats. *Eur J Pharmacol*. 2010; 629: 118-124.

114. Tsirogianni AK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. Wound healing: Immunological aspects. *Injury, Int J Care Injured*. 2006; 37S: S5-S12.

115. Sánchez CJ. Cicatrización en el neonato con labio y paladar hendidos. *Cir Plast* . 2006; 16:24-27.

116. Cowin AJ, Brosnan MP, Holmes TM, Ferguson MWJ. Endogenous inflammatory response to dermal wound healing in the fetal and adult mouse. *Dev. Dyn*. 1998; 212:385-393.

117. Cowin AJ, Holmes TM, Brosnan P, Ferguson M W J. Expression of TGF- β and its receptors in murine fetal and adult dermal wounds. *Eur J Dermatol*. 2001; 11: 424-431.

118. Hirano A, Kanehiro A, Ono K, Ito K, Yoshida A, Okada C, Nakashima H, Tanimoto Y, Kataoka M, Gelfand EW, Tanimoto M. Pirfenidone modulates airway responsiveness, inflammation, and remodeling after repeated challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006; 35: 366-377.
119. Corbel M, Lanchou J, Germain N, Malledant Y, Boichot E, Lagente V. Modulation of airway remodeling-associated mediators by the antifibrotic compound, pirfenidone, and the matrix metalloproteinase inhibitor, batimastat, during acute lung injury in mice. *Eur J Pharmacol.* 2001; 426: 113-121.
120. Fiedler LR, Eble JA. Decorin regulates endothelial cell-matrix interactions during angiogenesis. *Cell Adh Migr.* 2009; 3: 3-6.
121. Furuzawa J, Rodríguez R, Díaz de León L, Alcocer J. Mediators of inflammation are down-regulated while apoptosis is up-regulated in rheumatoid arthritis synovial tissue by polymerized collagen. *Clin Exp Immunol.* 2002; 130: 140-149.
122. Salazar-Montes A, Ruiz-Corro L, López-Reyes A, Castrejón-Gómez E, Armendáriz-Borunda J. Potent antioxidant role of pirfenidone in experimental cirrhosis. *Eur J Pharmacol.* 2008; 595: 69-77.
123. Zhong H, Sun G, Lin X, Wu K, Yu M. Evaluation of pirfenidone as a New Postoperative Antiscarring Agent in Experimental Glaucoma Surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52: 3136-3142.

124. Reza R, Stanley MS, Gerald BH. Mitomycin: Effects on Laryngeal and Tracheal Stenosis, Benefits and Complications. *Ann Otol Laryngol*. 2001; 110: 1-6.
125. Eliashar R, Eliachar I, Esclamado R, Gramlich T and Strome M. Can Topical Mitomycin Prevent Laryngotracheal Stenosis?. *Laryngoscope*. 1999; 109: 1594-1600.
126. Glen T. Porter GT, Gadre SA, Calhoun KH. The effects of intradermal and topical mitomycin C on wound healing. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006; 135: 56-60.
127. Brown NJ, Smythe, EA, Cross SS, Reed MW. Angiogenesis induction and regression in human surgical wounds. *Wound Repair Regen*. 2002; 10: 245-251.
128. Furuzawa J, González I, Corchado A, Arrellin G, Kröttsch E. La colágenopolivinilpirrolidona administrada localmente previene la formación de adherencias peritoneales en un modelo murino. *Rev Esp Med Quir*. 2001; 6: 11-16.
129. Castro-Alba PJ. Expresión de Factor Inducible de Hipoxia HIF 1 α y VEGF implicados en el síndrome del túnel del carpo y su asociación con la aplicación de Colágeno y Polivinilpirrolidona in vitro. Tesis Maestría en Ciencias de la Salud. Escuela Superior de Medicina. Instituto Politécnico Nacional. México; D.F. Marzo de 2011.
130. Furuzawa-Carballeda J, Kröttsch E, Barile-Fabris L, Alcalá M, Espinosa-Morales R. Subcutaneous administration of collagen-polyvinylpyrrolidone down

regulates IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1, ELAM-1 *and* VCAM-1 expression in scleroderma skin lesions. Clin Exper Dermatol. 2005; 30: 83-86.

131. Wang YW, Ren JH, Xia K, Wang SH, Yin TF, Li LH. Effect of mitomycin on normal dermal fibroblast and HaCat cell: an in vitro study. J Zhejiang Univ Sci B. 2012; 13: 997-1005.