



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
"ISMAEL COSÍO VILLEGAS"

EFFECTO 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**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE  
CABEZA Y CUELLO**

PRESENTA:

DR. ARTURO IVAN GONZÁLEZ GONZÁLEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

M. EN C. J. RAÚL OLMOS ZÚÑIGA

CO-TUTORES:

DR. ARTURO RAMÍREZ GARCÍA

DRA. CLAUDIA HERNÁNDEZ JIMÉNEZ

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE  
CABEZA Y CUELLO:

DR. ARTURO RAMÍREZ GARCÍA

MÉXICO, DF.

JULIO 2013.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

---

M. en C. J. Raúl Olmos Zúñiga

Investigador en Ciencias Médicas “D” del Departamento de Cirugía  
Experimental INER

Asesor de Tesis

---

Dr. Arturo Ramírez García

Profesor Titular del Curso de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y  
Cuello INER y Jefe del Departamento de Otorrinolaringología y Cirugía de  
Cabeza y Cuello INER y Co-Asesor de Tesis

---

Dra. Claudia Hernández Jiménez

Investigadora en Ciencias Médicas “B” del Departamento de Cirugía  
Experimental INER

Co-Asesora de Tesis

---

Dr. Juan Carlos Vázquez García

Director de Enseñanza INER

## COLABORADORES

---

Dr. Rogelio Jasso Victoria

Investigador en Ciencias Médicas “D” y Jefe del Departamento de Cirugía  
Experimental INER

---

Dr. Miguel Gaxiola Gaxiola

Investigador en Ciencias Médicas “C” del Departamento de Morfología INER

---

Q.F.B. Matilde Baltazares Lipp

Adscrita al Departamento de Cirugía Experimental INER

## **AGRADECIMIENTOS.**

En primer lugar le agradezco y dedico este trabajo a mis padres por todos los años de apoyo incondicional, de paciencia y amor; sin ellos mi formación no hubiera sido posible, así como gracias a ellos las cosas han tomado sentido.

A mi hermana Paola y a Miguel por la compañía, la convivencia, por respetar mi espacio y apoyar mis sueños.

A Lupe por caminar a mi lado, por darme la oportunidad de crecer, aprender y compartir tanto, así como por llenarme de ilusión y motivación.

A mis compañeros de residencia Jenny, Raúl y Pony por enseñarme la importancia de nunca perder la risa y siempre avanzar como equipo. Por otro lado a Karen, gracias por enseñarnos a alzar la cabeza y ver hacia adelante, te debemos mucho. A todos los residentes con quienes pude convivir y de quienes me llevé experiencia, conocimiento y momentos increíbles, Ingeborg, Karlita, Schobert, Daniel, Mario, Chuy, Michaca, Miriam, Liz, Rosalba, Iohannan y Rosty.

A todos mis profesores del INER, en especial al Dr. Gabriel Tona por su amistad, al Dr. Ramirez por ser un ejemplo como líder y médico. A la Dra. Cristerna, a la Dra. Sanchez, a la Dra. Carranco, a la Dra. Tirado, a la Dra. Prieto, al Dr. Jimenez y al Dr. Dávila por tantas oportunidades y enseñanzas.

Al Departamento de Cirugía Experimental en especial al Dr. Jasso, a Raúl y a Claudia por haberme extendido su mano y haber estado ahí en mi formación desde que inicié la carrera de Medicina.

A todas las enfermeras y trabajadores del Instituto, Chuyita, Porfi, Gaby, Betty, Jessy, Andrea, Irma, Anita, Ema, Marthita, Carmelita, Tere, Agustina, Arturo, pero sobre todo a Cecilia por todo su cariño y ejemplo como persona, enfermera y amiga.

# **ÍNDICE**

ÍNDICE.....	1
RESUMEN.....	2
ANTECEDENTES.....	3
JUSTIFICACIÓN.....	14
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS.....	15
MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES.....	37
ANEXOS.....	38
REFERENCIAS.....	47

## RESUMEN.

**Título.** 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.

**Introducción.** Las cicatrices fibróticas contienen altas cantidades de colágena y bajas de decorina. Las estenosis laringotraqueales son un ejemplo de estas; por lo que la aplicación de moduladores de la cicatrización (MDC) en el tejido dañado podría evitarlas. El ácido hialúronico (AH) y la colágena polivinil pirrolidona (CPVP) disminuyen y previenen la inflamación y fibrosis, pero el efecto de su combinación postraqueoplastía no se ha descrito.

**Objetivo.** Determinar el efecto de la aplicación tópica de AH, CPVP, la mezcla AH-CPVP y MC sobre la expresión in situ de decorina y deposición de colágena en la cicatriz postraqueoplastía en un modelo experimental canino.

**Material y métodos.** En 30 perros postraqueoplastía cervical se aplicaron diferentes MDC: Grupo I: SSF. Grupo II: AH. Grupo III: CPVP. Grupo IV: AH-CPVP y Grupo V: Mitomicina C (MC). Se evaluaron 4 semanas clínica y traqueoscópicamente. Concluido el estudio se valoró la cicatriz macroscópica y microscópicamente, mediante inmunohistoquímica la expresión de decorina y bioquímicamente se cuantificó la colágena.

**Resultados.** Traqueoscópica, macroscópica y microscópicamente los grupos grupos II, III y IV mostraron menor inflamación ( $p < 0,001$  ANDEVA, Tukey), el grupo I fibrosis severa ( $p < 0,001$  ANDEVA, Tukey) y colágena desorganizada. La expresión de decorina fue superior en los grupos III y IV ( $p < 0.01$  ANDEVA, Tukey). Los grupos IV y V desarrollaron menor cantidad de colágena en comparación con el grupo I ( $p < 0.001$  ANDEVA,  $p < 0.01$  Tukey).

**Conclusión.** De acuerdo con lo descrito en el presente trabajo, se puede concluir que la aplicación tópica de CPVP, así como de la mezcla AH-CPVP en la anastomosis de traqueoplastías, incrementa la expresión in situ de decorina, lo cual pudiera formar parte del mecanismo de acción a través de lo cual reducen la cantidad de colágena formada postraqueoplastía, favorecen la organización de las de las mismas, disminuyen el infiltrado inflamatorio y evitan la formación de una estenosis traqueal.

**Palabras clave:** Cicatrices fibróticas, deposición de colágena, expresión in situ de decorina, moduladores de la cicatrización, ácido hialúronico, colágena polivinil pirrolidona.

## **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.**

### **ANTECEDENTES.**

El cartílago es una variedad de tejido conjuntivo, el cual es avascular y está constituido de una matriz extracelular (que representa más del 95% de su volumen), condrocitos, células condrogénicas, condroblastos y pericondrio. Éste, de acuerdo a su contenido de proteínas fibrosas específicas se clasifica en hialino, articular y elástico. La cirugía del cartílago es parte de varias disciplinas quirúrgicas como la ortopedia, otorrinolaringología, cirugía plástica y reconstructiva y traumatología.

La otorrinolaringología se encarga del tratamiento quirúrgico de patologías adquiridas o congénitas del esqueleto cartilaginoso de la oreja, nariz, laringe y tráquea (1).

### **Cicatrización.**

La cicatrización es un proceso complejo y dinámico que se encarga de restablecer la continuidad anatómica y funcional de un tejido cuando se lesiona (2,3).

El proceso de cicatrización de las heridas se compone por una secuencia de pasos denominados inflamación, proliferación y maduración. En estas fases las células epiteliales, endoteliales e inflamatorias, plaquetas y fibroblastos interactúan para restaurar el tejido lesionado. Después de la fase inflamatoria (0-5 días), se inicia la fase proliferativa cuando los fibroblastos llegan al tejido

lesionado e inician la síntesis de colágena (3-14 días). En la fase de maduración (7 días-1 año) se inicia la remodelación y termina la síntesis de la colágena nueva y la formación de tejido cicatrizal. El depósito de colágeno comienza cuando los fibroblastos entran a la herida entre 48-72 h después de la lesión. La colágena de la herida alcanza su nivel máximo a las 2-3 semanas posteriores a la lesión (4).

Cuando se presenta una lesión la respuesta de cicatrización puede ser normal o patológica de acuerdo a la eficiencia y control con el que se realicen eventos, señalizaciones celulares y producción de matriz extracelular de cada fase de la cicatrización. Las reparaciones normales de los tejidos se caracterizan por mostrar un equilibrio entre la formación y la remodelación de la cicatriz. Mientras que la cicatrización patológica puede presentar fibrosis (por una excesiva deposición de colágena), cicatrización deficiente o retrasos en la cicatrización (por insuficiente deposición de matriz de tejido conectivo o mantenimiento de la fase inflamatoria de la cicatrización), las cuales alteran la estructura morfológica del tejido y su función (5).

### **Fisiología de la cascada normal de la cicatrización.**

La respuesta normal de cicatrización se inicia en el momento en el que se lesiona el tejido y las plaquetas entran en contacto con la colágena expuesta y con otros elementos de la matriz extracelular (6). Este contacto provoca que las plaquetas liberen factores de coagulación, citocinas y factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento de transformante beta (TGF- $\beta$ ) (7), los cuales inician la quimiotaxis de neutrófilos, macrófagos, células del músculo liso y fibroblastos. Además

estimulan la mitogénesis de los fibroblastos y células musculares lisas de las células productoras de matriz para asegurar una rápida deposición de nuevo tejido conectivo en el sitio de la lesión. Después de que se produjo la hemostasia, los neutrófilos llegan al sitio de la herida e inician con la fagocitosis para eliminar los cuerpos extraños, bacterias y tejido dañado.

A las 48 horas post-lesión se activan los monocitos y se convierten en macrófagos de la herida que continúan con el proceso de fagocitosis y su presencia indica que la fase inflamatoria va a concluir y que se inicia la fase proliferativa. Durante la fase proliferativa los macrófagos y linfocitos T envían señales que regulan la actividad de los factores de crecimiento, atraen a los fibroblastos y se inicia la producción de colágena, fibronectina y proteoglicanos de la nueva matriz extracelular (8). Al mismo disminuye la secreción de proteasas responsables de la degradación de la matriz. Por último la colágena liberada en el espacio extracelular sufre hidroxilación y forma enlaces cruzados estables, se reticula (esta etapa de reticulación de la colágena es la que le da fuerza y estabilidad con el tiempo) y se inicia la maduración de la cicatriz (2,9).

### **Fisiopatología de las cicatrices fibróticas.**

La formación de cicatrices fibróticas siempre está precedida de una prolongación o exageración de la fase inflamatoria de la cicatrización. Durante esta fase se presenta un incremento en la síntesis de citocinas fibrogénicas que promueven un incremento en la producción de tejido conectivo en la matriz extracelular (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), 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 una diferencia 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 colágeno, traduciéndose en la presencia de un tejido más rígido) y disminuye la concentración de decorina que promueve la formación de fibras gruesas y desorganizadas de colágena (10). Con base en esto se puede mencionar que la formación de cicatrices fibróticas se debe más a las alteraciones de la matriz extracelular que a la cantidad de fibroblastos presentes en la herida.

### **Matriz extracelular.**

La matriz extracelular (MEC) está constituida por varios componentes, los cuales determinan la histología específica de cada órgano y provee células con información biológica, así como una base mecánica para la adhesión y migración entre otras funciones. La MEC está formada por un conjunto de proteínas extracelulares como colágena, elastina, proteoglicanos (PGs) y glicosaminoglicanos (GAG) (11-13). Las dos proteínas fibrosas más importantes de MEC son la colágena y la elastina, las cuales son las responsables de proporcionar las propiedades mecánicas de los tejidos como la capacidad de resistir la tensión, compresión, extensibilidad y torsión. Los PGs tienen una función estructural y metabólica, mientras que los GAG en conjunto con los primeros sirven de puentes de unión entre los componentes de la matriz y las células (14-16).

La decorina es un proteoglicano pequeño (90 y 140 kDa) rico en leucina con un núcleo proteínico de 330 aminoácidos que tiene una cadena lateral del glicosaminglicano dermatán sulfato cerca de su porción amino-terminal y tres oligosacáridos. El núcleo de esta contiene varios sitios de unión para un gran número de componentes de la MEC incluyendo colágena, fibronectina y trombospondina. La decorina se encuentra en gran una variedad de tejidos e interactúa con diversas proteínas que están involucradas en el ensamblado de la matriz (principalmente colágena tipo I) y en la regulación de funciones biológicas fundamentales como la adhesión celular, migración y proliferación. Además tiene un efecto antiproliferativo, favoreciendo la sobreexpresión de los inhibidores de la quinasa cíclica dependiente como el p21 y p27 o a través de su capacidad para interactuar con los factores de crecimiento. Es bien conocido que la decorina se une al TGF- $\beta$  que es un factor importante en la cicatrización de heridas e inhibe su actividad biológica sobre varios tipos de células y se ha demostrado experimentalmente que tiene un efecto antifibrótico en el riñón, pulmón, cerebro y musculo (17-20).

En estudios previos se ha demostrado que la decorina regula la unión de la colágena en la MEC e influye en su porcentaje de formación y grosor de las fibras, por lo que las alteraciones en la expresión y la deposición de la misma pueden influir en la deposición y organización de la colágena durante la remodelación de la cicatriz (13,21-24). Esto se ha confirmado en varios estudios de cuerdas vocales lesionadas en los que se ha visto que la presencia de decorina en la lámina propia de estas, favorece la formación de cicatrices mínimas (25,26); sin embargo el papel de los proteoglicanos y las

glicoproteínas no han sido el foco de los esfuerzos de investigación para el proceso cicatrizal de la tráquea.

### **Tráquea.**

La tráquea es un órgano tubular de forma circular que se encuentra sostenida por anillos cartilaginosos en forma de herradura que se conectan por detrás mediante una membrana elástica, posee una porción extratorácica y otra intratorácica y su función es llevar el aire inspirado ya sea por la nariz o boca hacia las zonas de intercambio gaseoso (27).

El cuerpo de la tráquea se compone principalmente de cartílago hialino y su estructura es a base de colágena tipo II y bandas de agregano, los cuales se encuentran rodeados por una zona fibrosa formada por elastina, así como colágena tipo I. La relación entre el agregano y la colágena II son los responsables de mantener la óptima flexibilidad de los cartílagos traqueales, mientras que la relación que existe entre la decorina y la colágena tipo I es necesaria para mantener la integridad estructural de los anillos traqueales (28,29); por lo que cualquier respuesta de cicatrización traqueal en la que no se sinteticen proteoglicanos provocara anomalías en las propiedades morfológicas y mecánicas del tejido, estenosis o traqueomalacia debido a la rápida formación de cicatriz o a la ausencia de este, ya que que la cicatrización del cartílago traqueal es un balance entre la deposición de colágena tipo I en forma de tejido cicatrizal y la reparación por la expresión de colágena tipo II, III y proteoglicanos, así como la severidad de la inflamación del sitio de lesión (30,31).

### **Estenosis traqueales.**

La tráquea al ser una estructura tubular semirrígida, como se mencionó previamente, tiene la desventaja de que cualquier tejido de cicatrización formado como parte de la evolución natural de una herida que tiende a estrechar su lumen y a este proceso lo conocemos con el nombre estenosis.

Una estenosis traqueal puede ser provocada por lesión e isquemia de la mucosa por intubación orotraqueal prolongada, cirugía traqueal, endoscopias, infecciones, inflamación crónica o factores congénitos en la respuesta de cicatrización y se define como la reducción anormal en el calibre de la luz traqueal, ya sea por retracción de una cicatriz o por depósito de tejido fibroso durante el proceso de cicatrización, lo cual da como consecuencia la limitación del flujo de aire hacia los pulmones, un problema clínico grave que compromete la vida de los pacientes (32-36).

El mecanismo fisiopatológico por el que se forma una estenosis traqueal en una intubación prolongada (causa más frecuente) obedece una serie de pasos secuenciales los cuales inician con una necrosis isquémica de la mucosa debido a la presión por el globo de la cánula endotraqueal. Posteriormente la mucosa se ulcera y en presencia de bacterias la infección produce una pericondritis y una condritis con reabsorción cartilaginosa. Una vez iniciado el proceso de cicatrización inicia la formación submucosa de tejido fibroso así como la contracción cicatrizal (37).

### **Tipos de estenosis traqueales.**

A grandes rasgos podemos dividir las estenosis traqueales según su etiología en Congénitas y Adquiridas encontrándose dentro del segundo grupo la gran

mayoría y a su vez subdividiéndose éstas en; Traumáticas (intubación prolongada, traqueostomía, trauma laríngeo externo, posradiación, quemaduras endotraqueales térmicas o químicas, etc.), Infecciosas (Escleroma respiratorio, Sífilis, Tuberculosis, Lepra, Sarcoidosis, etc.), Inflamatorias (Granulomatosis de Wegener, Policondritis recidivante, Lupus eritematoso sistémico, etc.), Neoplásicas (Papilomatosis, Carcinoma, Linfoma, etc.) o Idiopáticas.

Dentro del grupo postraumático, donde encontramos la mayoría de las estenosis, se ha reportado una incidencia de estenosis traqueal posterior a la traqueostomía y a la intubación orotraqueal prolongada que va del 0.6% al 21% y del 6% al 21% respectivamente (38).

Para su estudio se han desarrollado diversos sistemas de clasificación los cuales son de ayuda importante en el momento de decidir la opción terapéutica adecuada así como en algunos casos su pronóstico como en el caso de la clasificación de McCaffrey para el número de pacientes que se lograrán decanular.

La clasificación de Myers-Cotton mide el porcentaje circunferencial de una estenosis dividiéndola en; Grado I (0-50%), Grado II (51-70%), Grado III (71-99%) y Grado IV (sin lumen detectable) (39).

McCaffrey las dividió según el subsitio afectado así como por su longitud en Grado I (subglótica o traqueal pura <1cm), Grado II (subglótica >1cm), Grado III (subglótica y traqueal sin involucro de glotis) y Grado IV (estenosis con extensión a glotis) (40).

### **Tratamiento de las estenosis traqueales.**

Se podrían considerar 3 factores en la planeación del tratamiento de una estenosis no neoplásica: la etiología, el sitio y la severidad. El sitio de la estenosis es el factor de mayor peso al seleccionar el tipo de manejo quirúrgico, así como por otro lado la severidad de la estenosis sugiere la probabilidad de éxito (40).

A su vez existe una gran gama de opciones de tratamiento lo cual obedece a la complejidad en su manejo y a los resultados considerablemente lejos de la perfección, dividiendo éstos en dos grandes grupos, abierto o endoscópico; aunque en ambos la formación de tejido de cicatrización y reestenosis comprende la causa más frecuente de falla quirúrgica (41).

Se han practicado diversos procedimientos como las dilataciones con balón o cánulas, la colocación de los distintos tipos de férulas intratraqueales (silastic o metálicas expandibles) y la permeabilización con láser, pero desafortunadamente estas han sido en gran número de casos solamente de tipo paliativo (42,43).

Actualmente el estándar de oro continúa siendo la traqueoplastia termino-terminal, reportándose un 5%-20% de reestenosis postquirúrgico (32,44,45).

Existen otras alternativas en el tratamiento conocidas como adyuvantes dentro de los cuales se ha utilizado la aplicación de fármacos como los esteroides, mitomicina C (MC), antiinflamatorios no esteroides y agentes latirógenos, con el fin de modular el proceso de cicatrización y prevenir la formación de una cicatriz excesiva (46-48).

Para disminuir las estenosis traqueales, también se ha evaluado la utilidad de fármacos como los esteroides, antiinflamatorios no esteroideos y algunos

fármacos como la 5 fluorouracil, triamcinolona y  $\beta$ -aminopropionitrilo para prevenir la formación de una cicatrización excesiva, pero ninguno ha tenido el éxito deseado (35,46,48).

Existen otros medicamentos como el ácido hialurónico (AH) (49,50), colágena polivinil-pirrolidona (CPVP) (51,52) y la mitomicina C (35,53,54), que han demostrado ser buenos moduladores de la cicatrización.

El AH es un componente de la matriz extracelular de la herida fetal, el cual modula la fibrogénesis de colágena durante el proceso de cicatrización de las heridas fetales y favorece la regeneración, así como la reparación tisular con menor inflamación y fibrosis (34,43,49,50). Este medicamento ha sido usado con buenos resultados para la disminución de procesos fibróticos en el tratamiento de la osteocondritis de rodilla (55), regeneración de las heridas de la mucosa nasal (56) y para prevenir la formación de adherencias intrabdominales postquirúrgicas (50,57). También se ha observado en estudios experimentales que este medicamento evita las estenosis traqueales (34,43).

La colágena polivinil-pirrolidona (CPVP) es un fármaco constituido por una mezcla de colágena porcina tipo I irradiada con rayos gamma y polivinil-pirrolidona (CPVP), el cual tiene actividad fibrinolítica y actúa como remodelador de procesos fibrosos debido a que inhibe la expresión de moléculas de adhesión (ELAM-1, VCAM-1), así como de citocinas proinflamatorias y fibrogénicas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF-1 $\beta$  y PDGF-AB) (58). Se ha observado que la aplicación intralesional semanal (vida media del fármaco) de este medicamento para el tratamiento de las cicatrices queloides e hipertróficas, en fibrosis dérmicas y de tendones disminuye el volumen de la

cicatriz, desaparece el infiltrado inflamatorio y restablece la arquitectura dérmica normal de la cicatriz tratada con ésta (51,52).

Experimentalmente se ha observado que disminuyen las adherencias intrabdominales (59) y su uso postraqueoplastía sola o en combinación con el AH 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 (34,43,60,61). Además en las miringotomías favorece la cicatrización de la membrana timpánica (62).

La mitomicina C es un antibiótico antineoplásico producido por el *Streptomyces caespitosus*, el cual inhibe la proliferación y actividad de los fibroblastos evitando la fibrosis y formación de cicatriz. 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 (35,53,54,63,64) y disminución de las estenosis laringotraqueales.

Aunque en la literatura se ha reportado que tanto la mezcla AH-CPVP y la MC disminuyen la cantidad de colágena formada por gramo de tejido traqueal; aun no se ha descrito si esta disminución se debe a que estos fármacos alteran la expresión y deposición de los proteoglicanos de la MEC; es por lo que en este estudio se valoró el efecto de la aplicación postraqueoplastía de los mismos sobre la producción de decorina.

## **JUSTIFICACIÓN.**

Las estenosis traqueales son originadas por mala cicatrización y es uno de los problemas más difíciles de resolver para el otorrinolaringólogo. Lo cual afecta de forma importante la calidad de vida del paciente ya sea por restricción importante de la actividad física, por infecciones respiratorias recurrentes, por el riesgo de insuficiencia respiratoria aguda, o por el hecho de tener que portar una cánula de traqueostomía de forma temporal o permanente. La cicatrización de lesiones traqueales depende de un balance entre los componentes de la MEC (proteoglicanos, glicoproteínas, metaloproteinasas, etc) y la deposición de colágena en el tejido cicatrizal. La decorina es un componente de la MEC que regula la unión de la colágena en la misma e influye en la deposición y organización de la colágena durante la remodelación de la cicatriz. En la literatura se ha reportado que la mezcla AH-CPVP y la MC disminuyen la cantidad de colágena formada por gramo de tejido traqueal; sin embargo aun no se ha descrito si esta disminución se debe a que estos fármacos alteran la expresión y deposición de los proteoglicanos de la MEC; es por lo que en este estudio se evaluó el efecto de la aplicación de estos fármacos postraqueoplastía sobre la producción de decorina; lo cual permitiría fomentar otras líneas de investigación mejorando las opciones de tratamiento para pacientes con estenosis traqueal.

## **HIPÓTESIS.**

La aplicación de la mezcla de AH-CPVP y la MC postraqueoplastía incrementa la expresión de decorina, lo cual disminuirá el grado de estenosis traqueal.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Determinar el efecto de la aplicación de la mezcla AH-CPVP y la MC sobre la expresión de decorina en la cicatriz postraqueoplastía en un modelo experimental canino.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS.**

- Evaluar los cambios macroscópicos y microscópicos producidos por la mezcla AH-CPVP y la MC sobre la cicatriz formada, después de su aplicación postraqueoplastía en perros.
- Determinar la cantidad de colágena formada en la cicatriz traqueal, después de la aplicación tópica postraqueoplastía de la mezcla AH-CPVP y la MC en perros.
- Determinar inmunohistoquímicamente el efecto de la aplicación de la mezcla AH-CPVP y la MC sobre la expresión de decorina en la cicatriz postraqueoplastía en un modelo experimental canino.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

El financiamiento de esta investigación fue otorgado por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INERICV).

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

Se utilizaron 30 perros mestizos, sanos, sin importar el sexo o la edad, con un peso entre 15 y 20 Kg. Todos los animales fueron tratados de acuerdo a las Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana (65) y de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos (66).

### ***Criterios de inclusión.***

Se incluyeron perros clínicamente sanos, sin antecedentes de alguna enfermedad respiratoria desde su llegada al bioterio del INER"ICV" y antes de que se les realizará la cirugía.

### ***Criterios de exclusión.***

Los animales con datos clínicamente patológicos a su llegada al INER"ICV" y previos al procedimiento quirúrgico o con antecedentes de alguna cirugía de cuello, fueron excluidos del estudio.

### ***Criterios de eliminación.***

Todo animal que presento signos clínicos de cualquier patología que no fuera provocada por el procedimiento quirúrgico, fue eliminado.

### ***Criterios de terminación.***

Todo animal que mostro dolor excesivo provocado por la cirugía y no cedió al uso de analgésicos.

### ***Grupos de Estudio.***

Los animales fueron divididos en 5 grupos de estudio:

**Grupo I (n=6):** Resección de tres anillos traqueales cervicales y traqueoplastía convencional con aplicación intraluminal de solución fisiológica.

**Grupo II (n=6):** Resección de tres anillos traqueales cervicales y traqueoplastía convencional con aplicación intraluminal de AH.

**Grupo III (n=6):** Resección de tres anillos traqueales cervicales y traqueoplastía convencional con aplicación intraluminal de CPVP.

**Grupo IV (n=6):** Resección de tres anillos traqueales cervicales y traqueoplastía convencional con aplicación intraluminal de la mezcla AH-CPVP.

**Grupo V (n=6):** Resección de tres anillos traqueales cervicales y traqueoplastía convencional con aplicación intraluminal de MC.

### ***Técnica quirúrgica.***

Todos los perros fueron inducidos a la anestesia con hidrocloreuro de xilacina (Rompun, Bayer, Leverkusen Germany) a dosis de 0.1 mg/Kg y 6 mg/kg de propofol (Recofol, PISA, Guadalajara, México) vía intravenosa (IV), posteriormente fueron intubados con una sonda orotraqueal (Baxter, California, USA) y la anestesia se mantuvo con isofluorano al 1.5% (67).

Bajo anestesia general se realizó una incisión media en la región cervical ventral, se disecó por planos hasta llegar a la tráquea, la cual se disecó en toda su circunferencia y se le resecaron tres anillos traqueales a nivel medio de la tráquea cervical (3°,4° y 5° anillo), se introdujo una cánula orotraqueal en la porción distal de la misma para mantener la ventilación y se realizó anastomosis término terminal con polidioxanona de 3 ceros (PDS, Ethicon, New Jersey USA) con súrgete continuo en la porción membranosa y puntos separados en la cartilaginosa. Finalmente se continuó con el cierre convencional. A todos los perros se les aplicó como analgésico ácido tolfenámico (Tolfedine, Vetoquinol, Lure Cedex, Francia) (2mg/kg IM) y tramadol (Tradol, Grünenthal, D.F., México) (2mg/kg IM), así como enrofloxacina (5 mg/Kg) (Baytril, Bayer, Leverkusen, Germany) IM durante 5 días.

### ***Tratamiento.***

En los grupos I, II, III y IV, el tratamiento se aplicó inmediatamente después de la cirugía y cada semana (durante 4 semanas), mientras que en el grupo V solo se aplicó durante el procedimiento quirúrgico.

Para la aplicación del tratamiento en los grupos I, II, III y IV, los animales se sometieron a anestesia general y a través de visión directa con un equipo de videocirugía se introdujo una cánula orogástrica hasta el sitio de la traqueoplastia para la instilación del fármaco. En el grupo I se instilaron 3 mililitros de solución fisiológica. En el grupo II se 15 microgramos de AH diluidos en 3 ml de agua destilada (dosis usada para evitar adherencias

intrabdominales y estenosis uretrales e intestinales y para prevenir las estenosis traqueales) (43). Los perros del grupo III recibieron 28.2 mg de CPVP (que es la dosis utilizada para los problemas de piel y tendones y experimentalmente en estenosis traqueales crónicas) diluidos en 3 ml de solución fisiológica (34). Mientras que en el grupo IV se instilaron una mezcla de AH-CPVP a la dosis antes mencionada.

En los animales del grupo V se instilaron directamente sobre ambos extremos de la tráquea reseca (antes de llevar a cabo la anastomosis) 1.2 mg de MC, diluidos en 3 ml de SSF (dosis utilizadas para las estenosis traqueales) y 5 minutos después de haber sido instilada, la tráquea fue lavada con SSF (35).

### **Evaluación.**

El estudio tuvo una duración de 4 semanas.

### ***Clínica.***

A todos los perros se les realizó evaluación clínica diaria durante la primera semana posquirúrgica, cada tercer día en la segunda y semanalmente las 2 semanas restantes. En esta se evaluó la presencia de disnea, estridor y el estado de la herida quirúrgica.

### ***Traqueoscópica.***

En todos los animales se llevo a cabo evaluación traqueoscópica antes de la cirugía, cada tercer día durante las 2 primeras semanas postcirugía y cada semana el tiempo restante del estudio. En esta se evaluó el estado de la anastomosis, inflamación y la presencia de fistulas o estenosis. Cuando esta última se presento, el grado fue evaluado de acuerdo a la escala descrita por

Cotton (39): Grado 1 = 0 – 50 % estenosis, Grado 2 = 51 – 70 %. Grado 3 = 71 - 99 % y Grado 4 = Luz no detectable.

### ***Macroscópica.***

Al concluir el estudio (cuatro semanas postcirugía) todos los animales fueron sometidos a eutanasia con sobredosis de pentobarbital sódico (Anestesal, Pfizer S.A. de C.V. Guadalajara, México) (67) y se evaluó macroscópicamente la cicatrización de la anastomosis, presencia de dehiscencia, infección y la formación de fístulas. Posteriormente se retiró el segmento anastomosado, se incidió por la parte membranosa de la tráquea para evaluar la cicatrización de la mucosa y el estado de la luz 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 inmunohistoquímica para determinar la expresión de decorina.

### ***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 $\mu$ , se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómica de Massón y se les evaluó la presencia de fibrosis, forma y distribución de la fibras de colágena, grado de inflamación, así como la neovascularización.

La evaluación de éstos se llevo a cabo en toda la circunferencia de la muestra mediante una escala semicuantitativa descrita por Veiga (68), 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%).

### ***Inmunohistoquímica.***

La determinación de decorina en la cicatriz traqueal se llevó a cabo por inmunohistoquímica y para esto a las muestras incluidas en parafina se les realizaron cortes de 3 micras, se montaron en laminillas silanizadas, se desparafinaron durante 20 minutos a 80°C, se deshidrataron mediante transferencia en xilol por 5 minutos, posteriormente 1 minuto en alcohol, después se colocaron en una cámara de recuperación de antígenos con buffer de citratos pH 6, se recuperaron antígenos con calor en baño María 20 minutos a 70°C, se dejó enfriar y se lavaron con Triz-buffered saline with tween (TBST) 3 veces por 3 minutos. La peroxidasa endógena se removió con peróxido de hidrógeno y suero bloqueador durante 10 min., se lavo nuevamente con TBST. Una vez eliminada la peroxidasa endógena, se utilizó el sistema Biotina-Streptavidina-peroxidasa, (Vectastain Universal Quick Kit., Burlingame,CA), las secciones de tejido fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-decorin abcam ab67449, diluidos en buffer (suero bloqueador) durante 24 horas a 4°C, pasado este tiempo fueron lavadas nuevamente con TBST 3 lavados de 3 minutos cada uno y se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo biotilnado universal (Vectastain Universal Quick Kit, Burlingame,CA) 10 minutos, lavándose al final 3 tiempos de 3 minutos cada uno, fueron incubadas con streptavidina/peroxidasa (Vectastain Universal Quick Kit Burlingame,CA) por 10 minutos y se lavaron como ya se describió, se utilizó

3,3´Diaminobencidina (DAB) Sigma-aldrich como revelador durante 5 minutos y finalmente se trataron con Hematoxilina para virar el contraste. Se realizaron controles negativos en todos los grupos sustituyendo el anticuerpo primario por TBST.

La cuantificación de la expresión de decorina fue realizada con el software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), desarrollado por el National Institute of Health (NIH). Para esto se adquirieron las imágenes de microscopía en formato digital, a través de un microscopio, una cámara fotográfica digital, una computadora y software necesario para capturar las imágenes. Todas las fotografías se tomaron a la vez y se adquirieron con el mismo objetivo y el mismo tiempo de exposición. De esta manera nos aseguramos que las diferencias que obtengamos son debidas a una mayor área positiva para el marcador y no a que la imagen tiene una exposición mayor.

Una vez que se tuvieron las imágenes se cuantificó el área positiva con el siguiente proceso: 1) se abrió la imagen a cuantificar. (Aunque se muestra una imagen RGB, únicamente se abrió la imagen del canal a analizar en blanco y negro (8 u 16 bits). Se separaron los canales de una imagen RGB combinada de la siguiente manera: Image > Color > Split Channels, adquiriendo y salvando cada canal por separado para su posterior análisis. 2) Image > Adjust > Threshold seleccionar "Default" y "B&W". Se ajustó el límite superior al máximo (255 en una imagen de 8 bits) y el inferior en donde se reproduzca la silueta (en negro) del área positiva de manera fiel. Se mantuvo una copia abierta de la imagen para comprobar que la silueta correspondió con el área positiva.

### ***Bioquímica.***

En la evaluación bioquímica se determinó la concentración de hidroxiprolina por gramo de tejido traqueal. La determinación se realizó por el método de Woessner (69,70) en dos muestras de la misma tráquea, la primera de ellas se tomó inmediatamente después de la traqueoplastía, mientras que la segunda muestra se tomó cuando el estudio concluyó. Las muestras se colocaron cada una dentro de un vial que se pesó previamente, inmediatamente después de colocar la muestra se obtuvo el peso “mojado” y posteriormente se mantuvo en una estufa a 80°C hasta que se pudo obtener el peso “seco” de las muestras.

Obtenido el peso “seco”, las muestras se hidrolizaron con ácido clorhídrico 6N (J.T.Baker) durante 36 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras se filtraron y se colocaron en una evaporadora hasta eliminar el exceso de ácido clorhídrico. El residuo obtenido, se llevó a pH de 7.0 y se aforo a un volumen de 10 ml con agua destilada, de esta última dilución, se tomó una alícuota de volumen variable de acuerdo con cada una de las muestras y se determinó la concentración de hidroxiprolina presente en la muestra.

Para realizar la determinación de hidroxiprolina, se preparó una curva estándar que contenía 1 mg de hidroxiprolina/1 ml de agua (SIGMA,Co), se ajustó para la preparación de los estándares de hidroxiprolina en concentraciones de 200, 400, 600, 800 y 1000 µl de hidroxiprolina y se incluyó un blanco que contenía agua destilada. Posteriormente, en todos los tubos se adicionó: 1 ml de cloramina T (SIGMA Co) 0.05M disuelta en metilcelosolve (SIGMA Co), agua y amortiguador de fosfatos pH 6.0, 1 ml de ácido perclórico 3.0N (J.T. Baker), 1 ml de solución de paradimetilaminobenzaldehído (SIGMA Co) al 20% en metilcelosolve. El ensayo se incubó durante 20 minutos a 60°C y concluido el

tiempo de incubación, se obtuvo la absorbancia de cada muestra, para esto se utilizó un espectrofotómetro (DU 640, Beckman) ajustado a una longitud de onda de 560 nm.

### **Análisis estadístico.**

El análisis estadístico de los hallazgos clínicos y endoscópicos, se llevó a cabo con la prueba de Kruskal-Wallis debido a que eran datos no paramétricos, mientras que para los hallazgos histológicos, cuantificación de la colágena y la expresión de decorina se realizó mediante las pruebas de ANDEVA y Tukey. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados como significativos.

### **RESULTADOS.**

Todos los animales sobrevivieron al procedimiento quirúrgico, así como al tiempo de estudio establecido.

#### ***Hallazgos clínicos.***

Clínicamente solo 3 (50%) animales tratados con SSF (grupo I) mostraron estridor al ladrido, sin que éste afectara su ventilación. En los otros grupos no se observó alguna diferencia clínica importante.

A la revisión de la herida quirúrgica en ningún animal se presentó sangrado postoperatorio, ni dehiscencia. En todos los grupos ésta se mostró inflamada durante la primera semana después del procedimiento quirúrgico, pero ésta se encontró bien cicatrizada a las 2 semanas postcirugía.

### ***Hallazgos traqueoscópicos.***

En todos los perros la anastomosis traqueal se observó bien cicatrizada a los 7 días postcirugía.

En todos los animales (100%) del grupo I (SSF), y V (MC), las 2 primeras semanas del estudio la mucosa traqueal se observó edematosa e hiperémica; sin embargo estos signos desaparecieron en la tercera semana postcirugía. Solo en 1 caso (16.7%) del grupo I la mucosa traqueal se mantuvo así hasta el final del estudio. En los grupos II (AH) y III (CPVP) la mucosa se observó de esta manera durante los primeros 5 días, mientras que en el grupo IV se observó así durante los primeros 3 días postcirugía, en estos animales la tráquea se mostró de apariencia normal a la segunda semana postraqueoplastía.

Tres animales (50%) del grupo I mostraron estenosis grado I de la anastomosis, 2 (33.3%) en la segunda y 1 (16.7%) en la tercera semana postcirugía, la cual permaneció hasta el final del estudio.

En el grupo II, solo un perro (16.7%) presentó estenosis grado I de acuerdo con la escala de Cotton (39), con reducción de la luz de la traqueal del 50%.

Ningún animal de los grupos III (CPVP), IV (AH-CPVP) y V (MC) desarrolló estenosis; una vez que desaparecieron el edema y la hiperemia mostraron una evolución endoscópica satisfactoria hasta el final del estudio.

Al comparar la evolución endoscópica dentro de cada grupo y entre grupos se observó que las tráqueas a las que se les aplicó SSF presentaron mayor porcentaje de estenosis e inflamación (Kruskall-Wallis  $p < 0.05$ ) (FIGURA 1).

### ***Hallazgos Macroscópicos.***

En ningún grupo se observó la presencia de dehiscencia, infección o fístulas. En todos los grupos se observó la anastomosis bien cicatrizada. En el 100% de los animales del grupo I se observó abundante tejido fibroso en la porción externa de la tráquea. Mientras que en los otros grupos de estudio se apreció desarrollo de tejido fibroso leve. Sin embargo a la palpación del sitio de la anastomosis, en los animales tratados con la mezcla (grupo IV) la consistencia de esta era muy fuerte y con pérdida de la elasticidad.

A nivel de la mucosa traqueal en todos los perros (100%) del grupo I se observó abundante tejido fibroso a diferencia de los otros grupos de estudio que fue leve. En los grupos I, II, III y IV a nivel de la anastomosis hubo desarrollo moderado de vasos de neoformación tanto sobre el cartílago como sobre la mucosa traqueal; pero en el grupo V, la presencia de estos fue leve.

### ***Hallazgos Microscópicos.***

Microscópicamente en todos los casos (100%) del grupo I se observó fibrosis severa, con nuevas fibras de colágena gruesas y desordenadas, así como moderada neovascularización. Además 2 de estos animales (33.4%) presentaron inflamación leve en la lámina propia y 4 (66.6%) severa en todas las capas de la tráquea, a base de linfocitos, con presencia de células gigantes a cuerpo extraño en la zona de las suturas (FIGURA 2). En los animales del grupo tratado con AH (grupo II), 5 perros (83.4%) mostraron moderado desarrollo de nuevas fibras de colágena densa, delgada y bien organizada, así como fibras elásticas y moderada neovascularización, también presentaron

reacción inflamatoria leve en la submucosa y lámina propia de la tráquea. El otro animal de este grupo (16.6%) presentó reacción inflamatoria intensa a base de linfocitos en todas las capas de la tráquea, con reacción granulomatosa al material de sutura y formación severa de fibras de colágena gruesas y desordenadas (FIGURA 3).

Los 6 animales (100%) del grupo III (CPVP) desarrollaron moderada cantidad de nuevas fibras de colágena gruesas, bien organizadas y moderada cantidad de vasos de neoformación. Todos (100%) los sujetos de estudio desarrollaron inflamación leve; sin embargo 2 (33.4%) de estos animales mostraron reacción inflamatoria a base de linfocitos en la lamina propia (FIGURA 4).

En todos (100%) los animales tratados con la mezcla AH-CPVP (grupo IV), se observó el desarrollo moderado de fibras de colágena delgadas, bien organizadas, así como fibras elásticas y leve neovascularización. En 5 animales (83.4%) se observó inflamación leve y en 1 (16.6%) moderada en todas las capas de la tráquea (FIGURA 5).

En el grupo V, los 6 animales (100%) presentaron cicatrización caracterizada por moderadas fibras de colágena, delgadas, bien organizadas y leve neovascularización, pero en todos los casos se observó inflamación moderada a base de linfocitos (FIGURA 6).

En todos los grupos el cartílago traqueal se observó normal a excepción de la zona en la que se llevó a cabo la anastomosis, la cual mostró degeneración del mismo. También se apreciaron zonas de pérdida del epitelio en el sitio de la anastomosis.

Al comparar el grado de fibrosis solo se observó que la desarrollada por el grupo I fue importante vs los otros grupos de estudio ( $p < 0,001$  ANDEVA, Tukey) (GRÁFICA 1).

El delgado grosor de las fibras de colágena presentado por los grupos II, IV y V fue estadísticamente significativo en comparación con los otros grupos ( $p < 0.001$  ANDEVA, Tukey) (GRÁFICA 2).

Al valorar la organización de las fibras de colágena, se observó que el grupo I fue el único que mostró desorganización de las mismas ( $p < 0.001$  ANDEVA, Tukey) (GRÁFICA 3).

Con respecto a la inflamación se observó que los animales de los grupos III y IV desarrollaron menor grado de inflamación que los otros grupos de estudio ( $p < 0.005$  ANDEVA, Tukey) (GRÁFICA 4).

Además el grupo IV (AH-CPVP) mostró leve presencia de infiltrado linfocitario y leve neovascularización en comparación con los otros grupos ( $p < 0.001$  ANDEVA, Tukey) (GRÁFICA 5).

La presencia de células gigante a cuerpo extraño mostrada por el grupo I también fue significativa en comparación con los otros grupos de estudio ( $p < 0.05$  ANDEVA, Tukey).

### ***Hallazgos inmunohistoquímicos***

Al valorar la expresión in situ de decorina en las anastomosis traqueales, se observó que los grupos III y IV mostraron mayor expresión que sus anillos controles ( $p < 0.01$  ANDEVA,  $p < 0.01$  Dunnett) y que los grupos I y V ( $p < 0.01$  ANDEVA,  $p < 0.01$  Tukey). Aunque en el grupo II hubo mayor expresión de

decorina que los anillos controles y los grupos I y V, esta no fue significativa ( $p = .987$  ANDEVA, Tukey) (GRÁFICA 6), (Figura 7 y 8).

### ***Hallazgos Bioquímicos.***

Al cuantificar bioquímicamente los mg de colágena por gr de tejido traqueal mediante el método de Woessner, se observó que en el grupo IV (AH-CPVP), así como en el V (MC) se mantuvo similar a la de los anillos controles, pero disminuyó en comparación con los otros grupos de estudio, sin embargo esta disminución solo fue significativa vs el grupo I (SSF) ( $p < 0.001$  ANDEVA,  $p < 0.01$  Tukey) (GRÁFICA 7).

## **DISCUSIÓN.**

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, la cual involucra una cascada de eventos complejos que requieren de interacciones coordinadas entre las células, factores solubles, así como los componentes de la matriz extracelular y dependiendo de la eficiencia y control con el que se realicen eventos, se producirá una cicatriz normal o patológica (2,10). Las cicatrices fibróticas son un ejemplo de cicatrices patológicas y son consecuencia de un mecanismo de reparación en el que se sustituye el tejido normal perdido con una matriz extracelular (MEC) en la que predomina la colágena y disminuye la decorina; además siempre están precedidas de una prolongación y/o exageración en la fase inflamatoria de la cicatrización (5,10,71). Las estenosis laringo-traqueales están constituidas por una fibrosis

desproporcionada que obstruye la luz traqueal e impide la circulación de aire en ambos sentidos y representan un gran reto para los cirujanos cabeza y cuello y de tórax. Para el tratamiento de éstas se han utilizado tanto procedimientos endoscópicos (ejem. dilatación con globo, permeabilización con láser) como abiertos (traqueoplastía), con la aplicación de moduladores de la cicatrización, con el propósito de manipular farmacológicamente de manera temprana la formación de la nueva MEC después de haberse tratado físicamente y disminuir la reestenosis, pero no se ha tenido el éxito deseado debido a que se ha observado que no evitan la reestenosis, retardan la cicatrización, predisponen a la acumulación aguda de moco y producen defectos en la revascularización de la mucosa; por lo que es necesario buscar otros moduladores de la cicatrización que eviten esto (35,48,72).

En el departamento de cirugía experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas se ha trabajado con el AH, así como con la CPVP y se ha observado que su aplicación tópica en varios tejidos modifica la respuesta inflamatoria aguda y crónica respectivamente (58,59) y en la tráquea disminuyen la cantidad de colágena formada por gramo de tejido postraqueoplastía (34,62); sin embargo no se ha estudiado el efecto de la mezcla AH-CPVP sobre la expresión de decorina y la producción de colágena en las cicatrices postraqueoplastía.

En este trabajo se describe el efecto de la aplicación tópica de la mezcla AH-CPVP y la MC sobre la expresión de decorina y la producción de colágena en la cicatriz postraqueoplastía en un modelo experimental canino.

Los hallazgos clínicos y endoscópicos de este estudio mostraron que en todos los casos se presentó cicatrización traqueal; sin embargo en los grupos tratados con AH, CPVP y la mezcla AH+CPVP (II, III, IV), los signos de inflamación tuvieron menor duración. Probablemente esto fue ocasionado porque el AH favorece la proliferación de células mesenquimales que producen un infiltrado inflamatorio monocelular, el cual disminuye el proceso inflamatorio agudo, local y periférico (34,43,49,50,73,74), además la tráquea se encontró bien cicatrizada porque el AH permitió la migración y proliferación celular, ya que éste permanece en el cartílago por 2-3 semanas durante la reparación de las heridas (75,76). También al ser un componente mayoritario de la MEC posee la capacidad de absorber grandes cantidades de agua en el espacio intercelular (77). Mientras que la CPVP inhibe la producción de citocinas proinflamatorias y fibrogénicas como se ha descrito en otros estudios de cicatrización traqueal y en otros tejidos (34,51,52,58,59). El retraso en la desaparición de la inflamación en el grupo V fue porque este fármaco 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, tejido de granulación y necrosis del cartílago traqueal expuesto con pérdida de soporte como lo han descrito Roh (72,78), Iñiguez (79), Lama (80), Hueman (81) y Hardillo (82) al estudiar los efectos de la MC clínica y experimentalmente. 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 (83). 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 (84).

Los hallazgos macroscópicos observados en el grupo II, coinciden con los reportados por otros autores, los cuales sugieren que el desarrollo de cicatrices menos fibróticas formadas en estos animales se produjo porque el AH es condroprotector, promueve la formación de menores cantidades de células inflamatorias, altera la formación del coágulo de fibrina y actúa directamente sobre la función de los fibroblastos, disminuyendo la producción de colágena y tejido cicatricial compacto con lo que se evita la formación de cicatrices fibróticas (34,71,85). En el grupo tratado con CPVP estos hallazgos se pudieron haber presentado porque éste fármaco tiene actividad fibrinolítica e inhibe la expresión del TGF- $\beta$ 1 (51,52,58,59). Se puede pensar que la moderada presencia de tejido fibroso y la consistencia firme del sitio de la anastomosis a la palpación externa, en el grupo tratado con la mezcla, pudiera ser ocasionado porque la mezcla de estos fármacos permite el desarrollo de colágena, pero posiblemente pudiera influir en la producción de otros componentes de la MEC como la elastina y la fibronectina, lo que ocasionaría que el tejido traqueal tratado con éstos pierda su elasticidad y sus paredes se hagan rígidas; aunque esto aún no se ha estudiado con estos fármacos, podría ser la causa de esto como lo observó Lee et al al estudiar el la pérdida de las propiedades elásticas en el ducto lacrimal con el uso de MC (86).

Probablemente la leve cantidad de vasos sanguíneos observados en la endoscopia y estudios macroscópicos del grupo V, se vio disminuido porque la estimulación de la angiogénesis durante la cicatrización de las heridas se

presenta durante las dos primeras semanas después de la cirugía (87) y la MC tiene efecto entre la 2 y 4 semanas postratamiento e inhibe la angiogénesis porque bloquea expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular como lo describió Su et al al estudiar el efecto de este fármaco en la cicatrización poslaminectomía (88). A diferencia de la moderada presencia de vasos de neoformación en los grupos II, III y IV donde éstos fármacos no inhiben la angiogénesis, favorecen la migración celular en el endotelio y además el AH mejora la microcirculación y reduce la extravasación (58,87,89-91).

La presencia de moderado desarrollo de nuevas fibras de colágena bien organizadas y vasos de neoformación; mostraron que la aplicación temprana de AH en la anastomosis traqueal evita la degradación del cartílago y permite la regeneración de la arquitectura normal del tejido (92). Estos hallazgos coinciden con lo descrito por Ferguson (71), Sánchez (93) y Cowin (94,95) que han estudiado la cicatrización fetal y en adultos en diferentes tejidos y con lo observado en la tráquea (43). Los hallazgos observados en el grupo III coinciden con lo reportado por Fielder et al (96) al estudiar cicatrices fibroticas postquemaduras, confirmaron que la inhibición de las citocinas profibrogénicas como lo hace la CPVP, promueve la formación de fibras de colágena organizadas como se observa en los tejidos normales (58,90,91). Mientras que los hallazgos del grupo IV; probablemente fueron originados porque el AH disminuyó el infiltrado inflamatorio agudo y la CPVP el crónico, lo cual favoreció la producción y depósito organizado de colágena en la MEC como se ha descrito en otros tejidos (34,43,71,93-95). En el grupo tratado con MC, la presencia de fibras de colágena bien organizadas fue originada porque este fármaco en la MEC provoca apoptosis de los fibroblastos y una disminución en

la proliferación de los mismos a través de la reticulación del ADN, lo que impide la replicación de fibroblastos y células epiteliales y con esto retrasa la reepitelización y contracción. Nuestros resultados coinciden con los hallazgos histológicos descritos por Abbas et al (97) al estudiar los cambios microscópicos producidos por la MC y el fluoracil en miringotomías y con los descritos por Ozturk (98) que investigó los cambios histopatológicos producidos por la aplicación tópica de este fármaco en la mucosa mastoidea. Así mismo concuerdan con lo descrito por Reza et al y Eliashar que estudiaron los efectos de esta droga en estenosis traqueales (41,99).

Histológicamente la presencia de linfocitos fue debida a que durante el proceso de cicatrización migran a la herida después de los polimorfonucleares y macrófagos, produciendo linfocinas y factores de crecimiento que estimulan a los fibroblastos para la producción de colágena. Estos hallazgos coinciden con lo descrito por Barbul (100), Agaiby (101) y Tsirogianni (102) quienes mencionan que los linfocitos T favorecen el depósito de colágena y un incremento en la fuerza tensil de la herida. En el presente trabajo, en el grupo IV (AH-CPVP) la menor presencia de infiltrado linfocitario posiblemente pudo ser ocasionado porque el control inflamatorio que proporciona la combinación de éstos farmacos, inhibe tanto el infiltrado agudo como el crónico y por lo tanto disminuyen la quimiotaxis y estimulación de los linfocitos (37,43,71,93-95). Estos hallazgos nos podrían hacer suponer que esta mezcla tiene un efecto benéfico durante la fase de fibroplasias durante la cicatrización; aunque no se debe descartar el riesgo de disminuir la fuerza tensil de la cicatrización traqueal desencadenando una ruptura del sitio de anastomosis, la cual es una complicación no reportada en ninguno de los animales de nuestro estudio.

Las células gigantes a cuerpo extraño que se observaron en la zona de las suturas de un animal del grupo I 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 referido material dieron lugar a la formación de células gigantes a cuerpo extraño (43).

En éste trabajo en los grupos III y IV se encontró un incremento en la expresión de decorina en el sitio de la anastomosis traqueal, esto fue probablemente porque la CPVP tiene la capacidad de inhibir la producción de citocinas fibrogénicas y proinflamatorias principalmente la citocina antagónica de la decorina, TGF- $\beta$ 1 (59); con lo cual los niveles de ésta se mantuvieron elevados, regulando la organización de la colágena en la MEC influyendo sobre su cantidad formada, así como en el grosor de sus fibras (21-25). En los resultados de este estudio se observa que, por sí mismo el AH incrementa de una forma no significativa, la cantidad de decorina, pudiendo ser que la presencia del AH junto con la decorina (ambos componentes de la MEC) proporcionan un entorno extracelular que aumenta la adhesión celular, migración, proliferación y diferenciación, así como el ensamblado de la MEC. A su vez también quedando ejemplificada la importancia del AH al mezclarlo con CPVP ya que en ese grupo la expresión de decorina se mantuvo, en comparación con el resto de grupos, en los niveles más elevados.

En los grupos tratados con AH y CPVP (II,III y IV) se observó menor cantidad de fibras de colágena debido a que la decorina es un proteoglicano de adhesión presente en la matriz extracelular que cuenta en su núcleo con diversos sitios funcionales de unión entre los cuales se encuentran dos para la

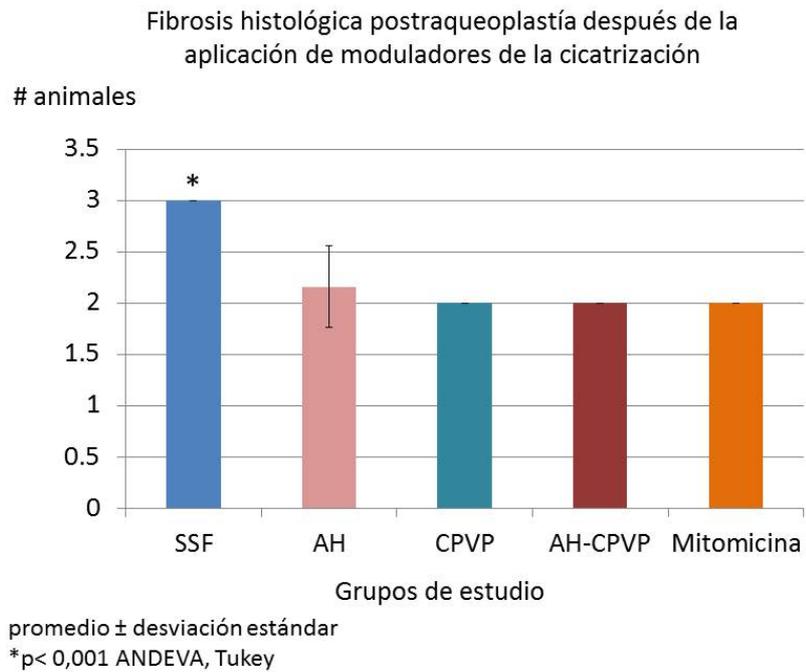
colágena (103,104); por lo que al entrar en contacto con ésta, impide que las moléculas de colágena se unan entre sí con lo que modifica la fibrillogénesis y modula su diámetro y organización fibrilar (105-107). Por otro lado la formación de vasos sanguíneos en estos grupos probablemente fue originada porque la decorina interviene en las interacciones endoteliales célula-matriz y en conjunto con factores de crecimiento como el VEGF que controlan la angiogénesis (96).

La evaluación bioquímica mostró que la mezcla AH-CPVP y la mitomicina C disminuyen de manera importante la cantidad de colágena desarrollada por gr de tejido traqueal en comparación con el grupo tratado con SSF, esto puede explicarse porque el tratamiento con el AH y la CPVP disminuye la inflamación e incrementa la producción de decorina posiblemente influyendo en el porcentaje de formación, organización y grosor de la colágena formada en la MEC (13,21-25), mientras que la MC provoca apoptosis de los fibroblastos e inhibe su replicación, proliferación y actividad (35,53,54,63,64). Estos hallazgos coinciden con lo descrito por los hallazgos observados por Reza (41), Eliashar (99), Doolin (108), Senders (109) y McCurdy (110) quienes estudiaron los efectos de diferentes fármacos sobre la cicatrización traqueal.

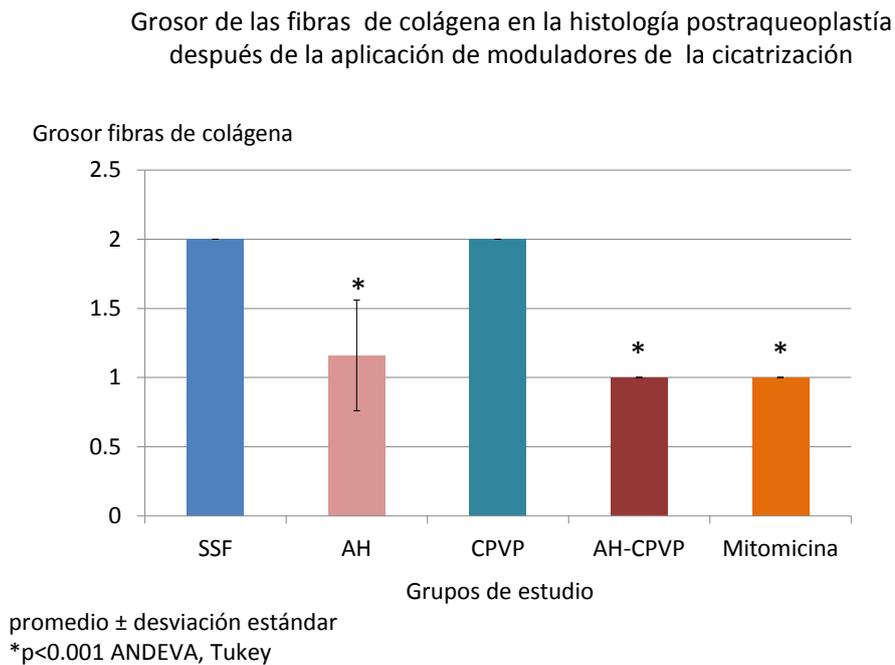
## **CONCLUSIONES.**

De acuerdo con lo descrito en el presente trabajo, se puede concluir que la aplicación tópica de CPVP, así como de la mezcla AH-CPVP en la anastomosis de traqueoplastías, incrementa la expresión in situ de decorina, lo cual pudiera formar parte del mecanismo de acción a través de lo cual reducen la cantidad de colágena formada postraqueoplastía, favorecen la organización de las de las mismas, disminuyen el infiltrado inflamatorio y evitan la formación de una estenosis traqueal.

## ANEXOS.

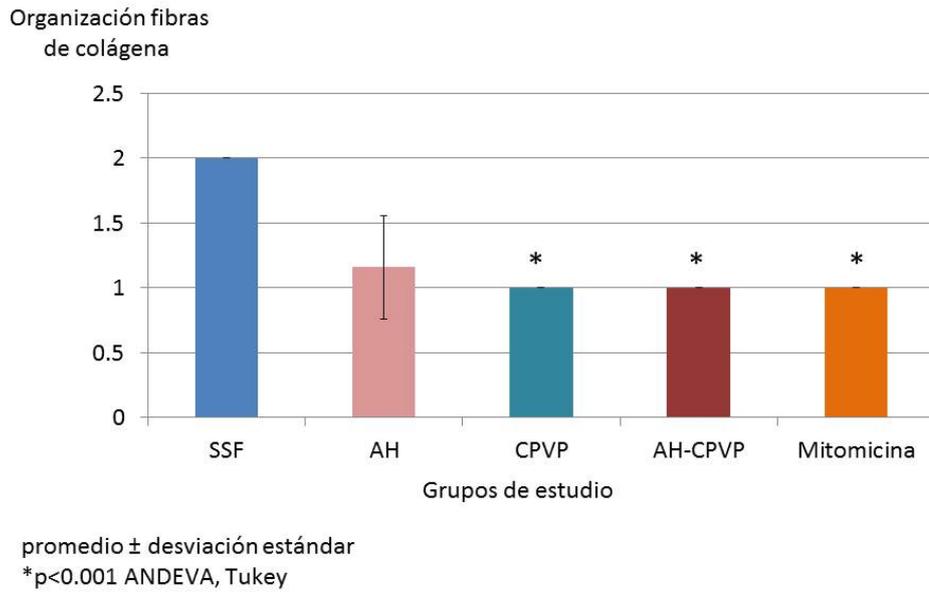


**Gráfica 1.** Muestra la el grado de fibrosis observada en cada grupo al final del estudio.



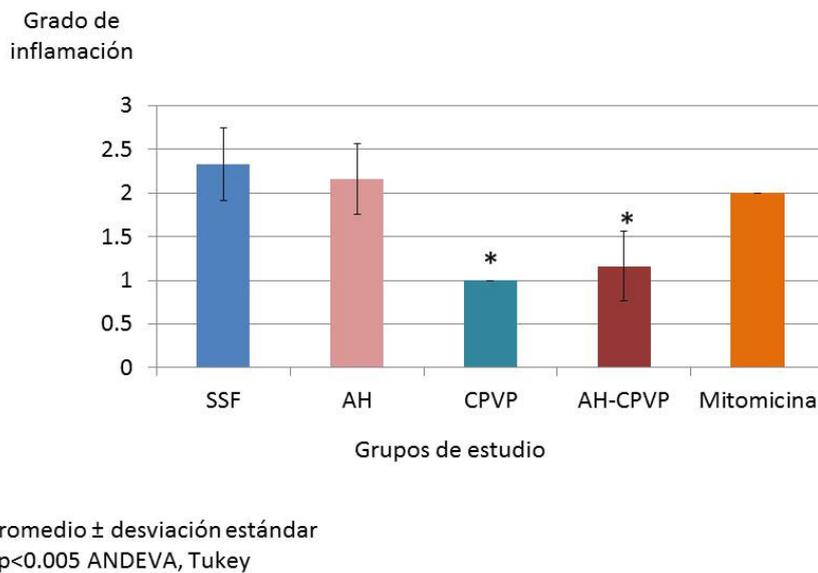
**Gráfica 2.** Muestra el mayor grosor microscópico de las fibras de colágena mostrado por los grupos tratados con I y III postraqueoplastía.

Organización histológica de las fibras de colágena postraqueoplastía después de la aplicación de moduladores de la cicatrización



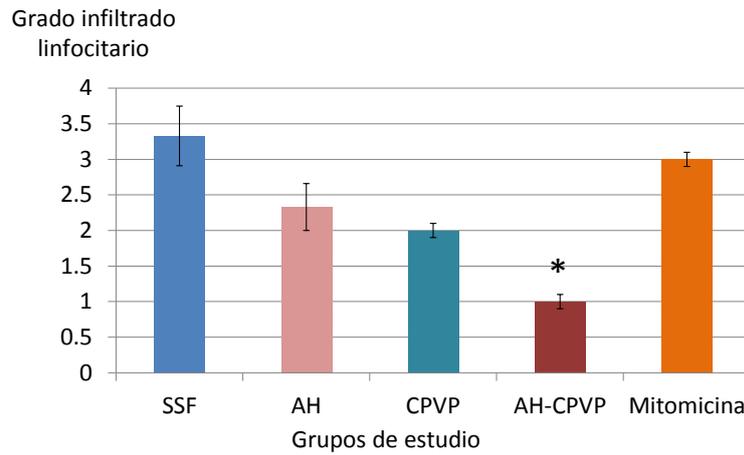
**Gráfica 3.** Se observa la mejor organización de las fibras de colágena postraqueoplastía en los grupos III, IV y V durante el estudio histológico.

Grado de inflamación histológica postraqueoplastía después de la aplicación de moduladores de la cicatrización



**Gráfica 4.** Se observa el menor grado de inflamación desarrollada por los grupos III y IV postraqueoplastía.

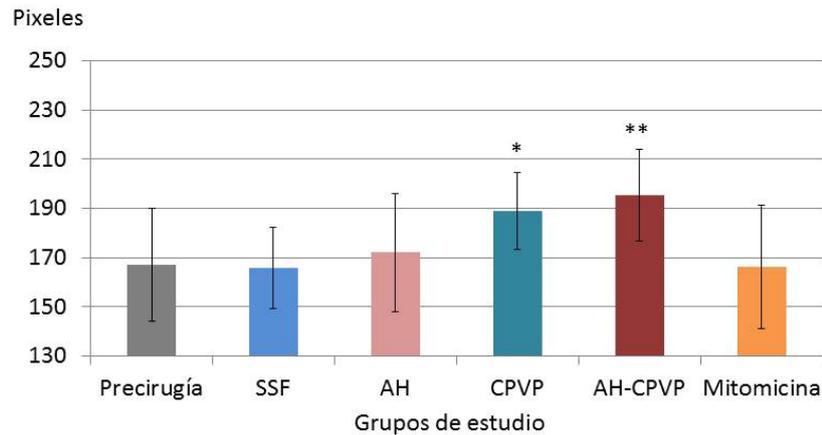
Grado de infiltrado linfocitario postraqueoplastía después de la aplicación de moduladores de la cicatrización



promedio ± desviación estándar  
\*p<0.001 ANDEVA, Tukey

**Gráfica 5.** Muestra la infiltración linfocitaria desarrollada por todos los grupos de estudio postraqueoplastía.

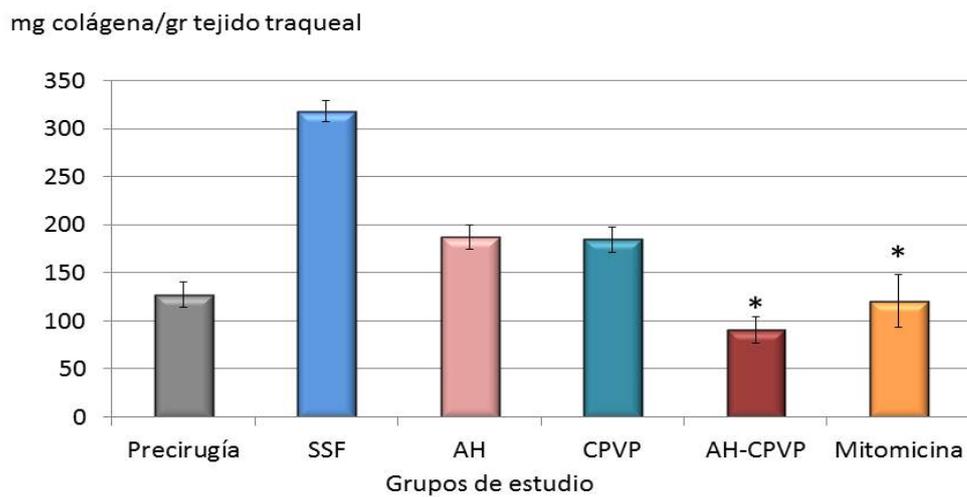
Expresión in situ de decorina postraqueoplastía después de la aplicación de moduladores de la cicatrización



promedio ± desviación estándar  
\*p< 0.01 ANDEVA, Dunnett, Tukey  
\*\*p< 0.001 ANDEVA, Dunnett, Tukey

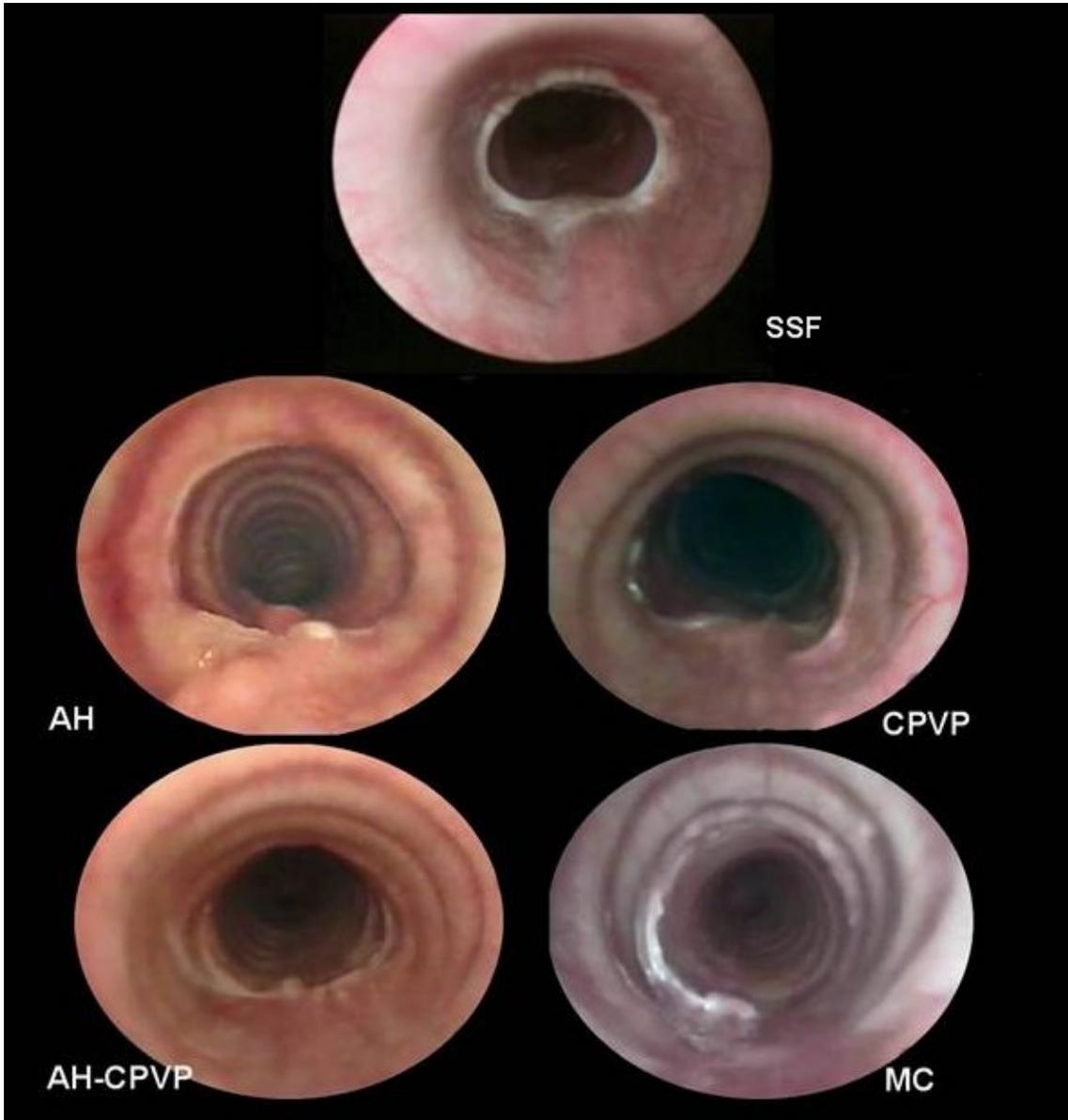
**Gráfica 6.** Muestra la expresión de decorina in situ al final del estudio en la cicatriz traqueal postraqueoplastía en todos los grupos.

Colágena por gramo de tejido traqueal postraqueoplastia después de la aplicación de moduladores de la cicatrización

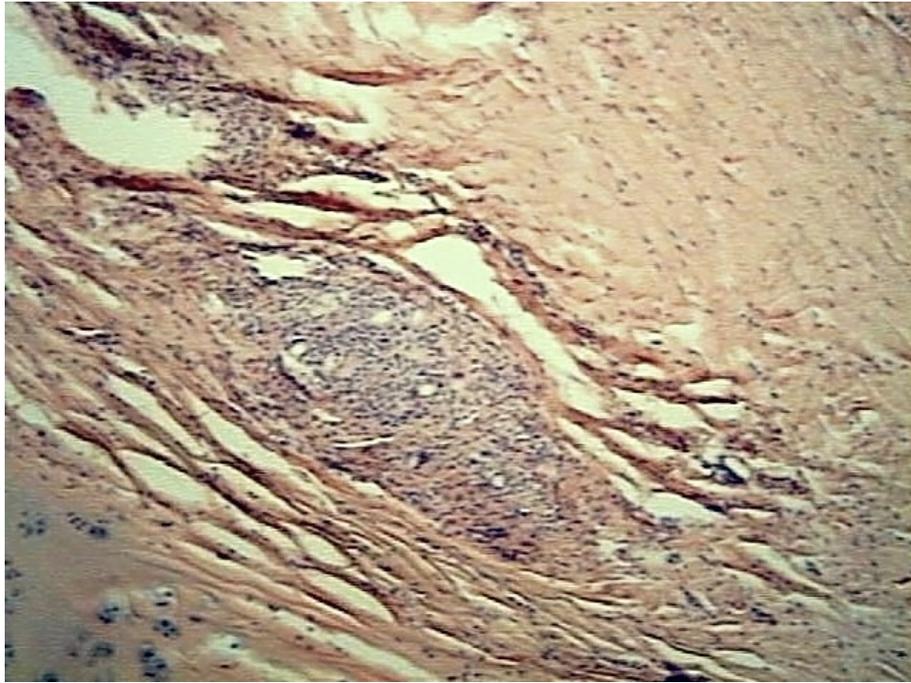


promedio  $\pm$  desviación estándar  
\* $p < 0.01$  ANDEVA, Dunnett, Tukey

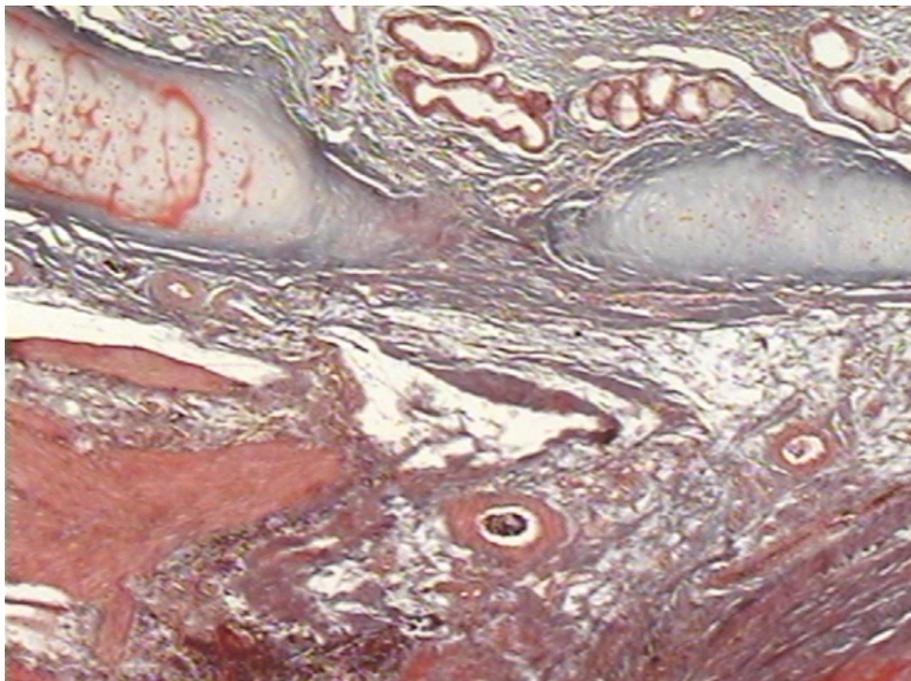
**Gráfica 7.** Muestra la cantidad de colágena formada en la cicatriz traqueal postraqueoplastia en todos los grupos de estudio.



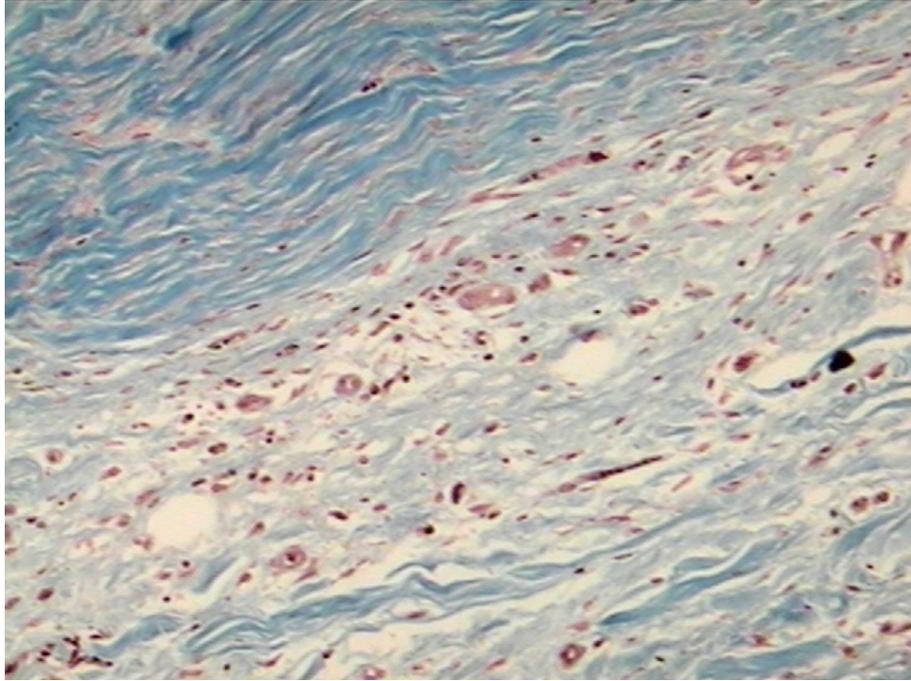
**Figura 1.** Traqueoscopia realizada 4 semanas postcirugía en todos los grupos de estudio.



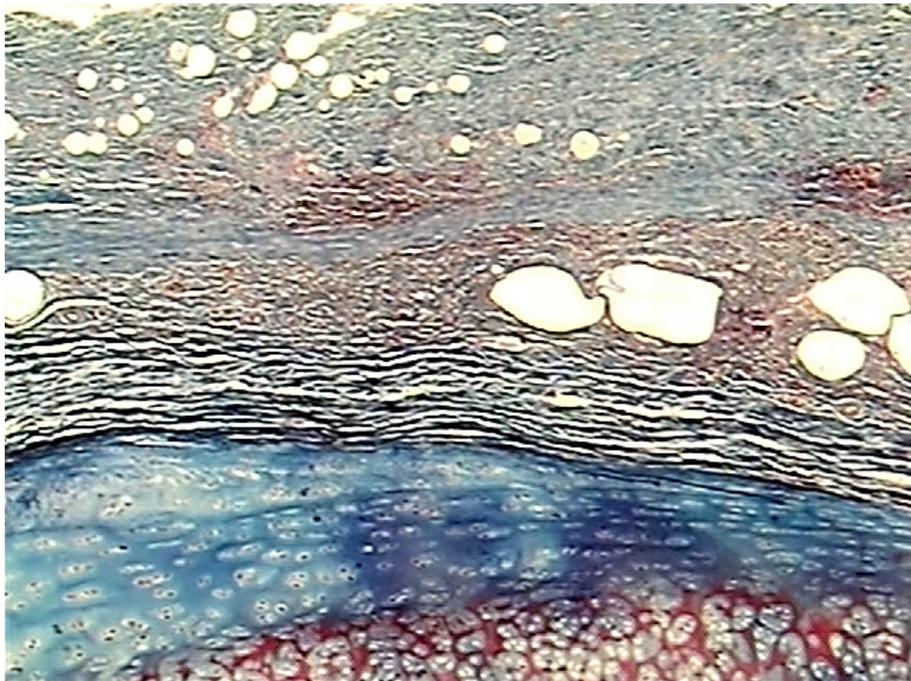
**Figura 2.** Fotomicrografía que muestra el granuloma formado en un animal del grupo de SSF (grupo I), abundante colágena e infiltrado inflamatorio. H-E 10x



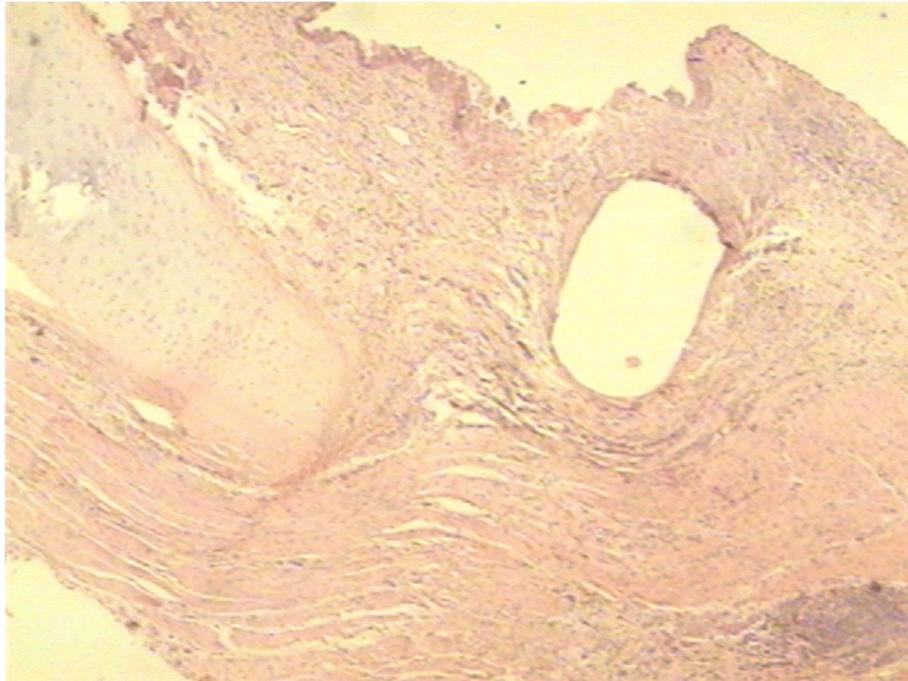
**Figura 3.** Fotomicrografía en la que se observan fibras de colágena densa, delgada y bien organizada entre el cartílago traqueal seccionado en un animal del grupo tratado con AH (grupo II). Masson 2.5x.



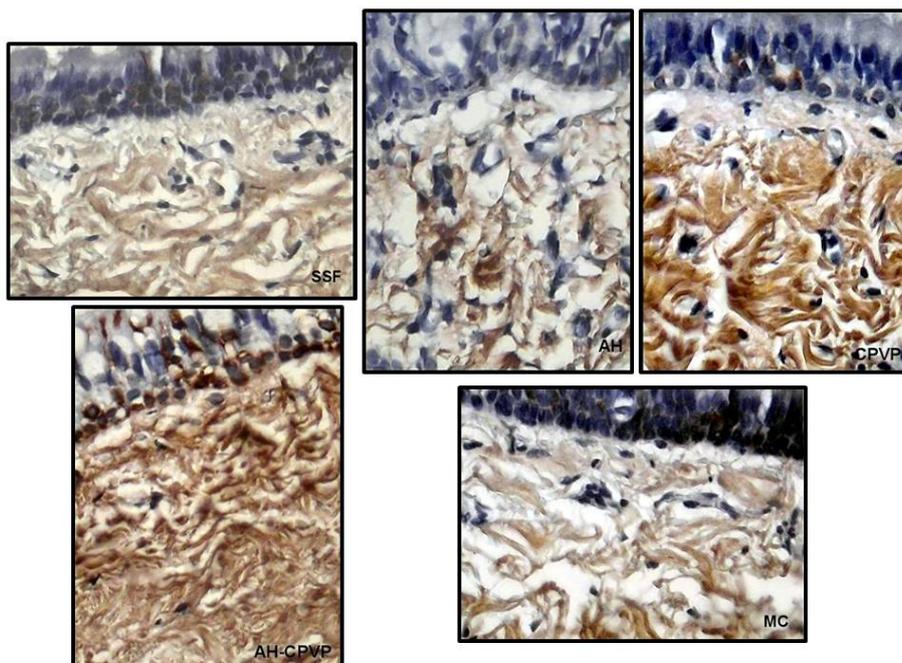
**Figura 4.** Fotomicrografía que muestra moderada cantidad de fibras de colágena bien organizada y vasos de neoformación en un animal del grupo de CPVP (grupo III). Masson 40x.



**Figura 5.** Fotomicrografía en la que se observa moderada cantidad de fibras de colágena delgadas, bien organizadas y fibras elásticas alrededor del cartílago traqueal en un perro tratado con la mezcla AH-CPVP (grupo IV). Masson 2.5X



**Figura 6.** Fotomicrografía en la que se muestran las fibras de colágena bien organizada entre el cartílago traqueal, moderado infiltrado inflamatorio en un animal del grupo tratado con MC. H-E 2x.



**Figura 7.** Micrografías de IHQ de tejido traqueal 40x, en la que se observa la expresión de decorina en color ocre tenue en los grupos de SSF, AH y MC, y fuerte en los animales tratados con CPVP y la mezcla AH-CPVP.

Grupo	Sin Filtro	Con Filtro
PreQx		 Count: 76767    Min: 201 Mean: 209.956    Max: 218 StdDev: 5.174    Mode: 212 (5383)
SSF		 Count: 71256    Min: 49 Mean: 162.588    Max: 197 StdDev: 23.415    Mode: 187 (2994)
AH		 Count: 95190    Min: 200 Mean: 214.549    Max: 225 StdDev: 6.972    Mode: 225 (6394)
CPVP		 Count: 189399    Min: 150 Mean: 183.831    Max: 211 StdDev: 15.909    Mode: 186 (5255)
AH-CPVP		 Count: 201703    Min: 149 Mean: 184.641    Max: 220 StdDev: 18.705    Mode: 180 (4679)
MC		 Count: 65841    Min: 188 Mean: 196.102    Max: 203 StdDev: 4.681    Mode: 203 (5216)

**Figura 8.** Expresión de Decorina por grupo de estudio con y sin filtro rojo.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

- 1.- Ten Koppel PG. Wound healing, distortion, and generation of cartilage. Thesis. Rotterdam: Erasmus University; 2005.
- 2.- Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*. 2004; 9: 283-289.
- 3.- Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Pecoraro RE, Rodeheaver G, et al. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing, *Arch Dermatol*. 1994; 130: 489-493.
- 4.- 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.
- 5.- Rahban, SR, Garner WL. Fibroproliferative scars. *Clin Plast Surg*. 2003; 30: 77-89.
- 6.- Clark RA. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 936: 355-367.
- 7.- Kim WJ, Gittes G K, Longaker MT. Signal transduction in wound pharmacology. *Arch Pharm Res*. 1998; 21: 487-495.
- 8.- Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int*. 1992; 41: 557-559.
- 9.- 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.

- 10.- Salem C, Vidal A, Mariangel P, Concha M. Cicatrices hipertróficas y queloides. Cuad. Cir. 2002; 16: 77-86.
- 11.- 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.
- 12.- Hinderer S. Engineering of fibrillar decorin matrices for a tissue-engineered trachea. Biomaterials. 2012; 33: 5259-5266.
- 13.- Schaefer L, Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. Cell Tissue Res 2010; 339: 237-246.
- 14.- Aumailley M, Gayraud B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. J. Mol. Med. 1998; 76: 253-265.
- 15.- Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. Phys Ther. 1999; 79: 308-319.
- 16.- Scott JE. Elasticity in extracellular matrix 'shape modules' of tendón, cartilage, etc. A sliding proteoglycan-filament model. J Physiol. 2003; 553: 335-343.
- 17.- Grisanti S, Szurman P, Warga M, Kaczmarek R, Ziemssen F, Tatar O. et al. Decorin modulates wound healing in experimental glaucoma filtration surgery: A pilot study. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005; 46: 191-196.
- 18.- Oba-Shinjo, SM, Berto AGA, Passerotti CC, Barbosa CD, Sampaio LO. Decorin is one of the proteoglycans expressed in Walker 256 rat mammary carcinoma. Braz J Med Biol Res. 2003; 36: 1079-1089.

- 19.- Fukushima K, Badlani N, Usas A, Riano F, Fu F, Huard J. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *Am J Sports Med.* 2001; 29: 394-402.
- 20.- Sayani K, Dodd CM, Nedelec B, Shen YJ, Ghahary A, Tredget EE, et al. Delayed appearance of decorin in healing burn scars. *Histopathology.* 2000; 36, 262-272.
- 21.- Krishna P, Rosen CA, Branski RC. Primed fibroblasts and exogenous decorin: potential treatments for subacute vocal fold scar. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006; 135: 937-945.
- 22.- Hansen JK, Thibeault SL. Current Understanding and Review of the Literature: Vocal Fold Scarring. *J. Voice.* 2006; 20: 110-120.
- 23.- Thibeault SL, Bless DM, Gray SD. Interstitial protein alterations in rabbit vocal fold with scar. *J Voice.* 2003; 17: 377-383.
- 24.- Pawlak AS, Hammond T, Hammond E, Gray SD. Immunocytochemical study of proteoglycans in vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1996; 105: 6-11.
- 25.- Ohno T, Hirano S, Rousseau B. Extracellular matrix gene expression during wound healing of the injured rat vocal fold. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009; 140: 757-761.
- 26.- Gray SD, Titze IR, Chan R. Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics. *Laryngoscope.* 1999; 109: 845-854.
- 27.- Hernández C. Efecto del ácido hialurónico y colágeno polivinil pirrolidona sobre la cicatrización traqueal en un modelo experimental canino. Tesis de Maestría en Ciencias. México D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM 2005.

- 28.- Detamore MS, Athanasiou KA. Structure and function of the temporomandibular joint disc: implications for tissue engineering. *J Oral and Maxillofacial Surg.* 2003; 61: 494-506.
- 29.- Wemer RD, Detamore M, Weatherly RA. Immunohistochemical characterization of the rabbit tracheal cartilages. *J Biomed Sci Eng.* 2010; 3: 1006-1012.
- 30.- Verwoerd HL, Ten Koppel PG, Van Osch G, Meeuwis CA, Verwoerd CD. Wound healing of cartilage structures in the head and neck region. *Int J Pediatr Otorhi.* 1998; 43: 241-251.
- 31.- Silver FH, Glasgold AI. Cartilage wound healing; an overview, *Otolaryngol. Clin. North Am.* 1995; 28: 847-864.
- 32.- Grillo HC. Development of tracheal surgery: A historical review. Part 2: Treatment of tracheal diseases. *Ann Thorac Surg.* 2003;75: 1039–1047.
- 33.- Iñiguez MA. Tipificación de la colágena producida en la cicatrización traqueal postraqueoplastía después de la aplicación de diferentes moduladores de la cicatrización en la anastomosis traqueal. Estudio experimental. Tesis de Especialidad en Cirugía Cardiorácica. México D.F. Facultad de Medicina. UNAM 2011.
- 34.- 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.
- 35.- Rahbar R, Shapshay SM, Healy GB. Mitomycin: Effects on laryngeal and tracheal stenosis, benefits and complications. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2001; 110:1-6.

- 36.- Soda MA, Delgado A, Morales J. Manejo quirúrgico de las estenosis traqueales. *Gaceta Médica de México*. 1994; 130: 386-389.
- 37.- Weymuller EA. Laryngeal injury from prolonged endotracheal intubation. *Laryngoscope* 1988; 98 Suppl 45, Part 2: 1-15.
- 38.- Sarper A, Ayten A, Eser I. Tracheal stenosis after tracheostomy or intubation: review with special regard to cause and management. *Tex Heart Inst J*. 2005; 32: 154-158.
- 39.- Cotton RT. Management of subglottic stenosis. *Otolaryngol Clin North Am*. 2000; 33: 111-130.
- 40.- McCaffrey TV. Management of laryngotracheal stenosis on the basis of site and severity. *Otolaryngol Head Neck surg*, 1993; 109:468-473.
- 41.- . Reza R, Stanley MS, Gerald BH. Mitomycin: Effects on Laryngeal and Tracheal Stenosis, Benefits and Complications. *Ann Otol Laryngol*. 2001; 110: 1-6.
- 42.- Roediger FC, Orloff LA, Courey MS. Adult subglottic stenosis: management with laser incisions and mitomycin-C. *Laryngoscope*. 2008; 118: 1542-1546.
- 43.- Olmos-Zuñiga JR, Santos A, Jasso R, Sotres A, Gaxiola M, Mora-Fol R, Franco A, Santillan P. Efecto del ácido hialurónico sobre la cicatrización traqueal en un modelo experimental canino. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2004; 55: 81-87.
- 44.- Lorenz R. Adult laryngotracheal stenosis: etiology and surgical management. *Current opinion in otolaryngology and head and neck surgery*. 2003; 11: 467-472.

- 45.- Hashemzadeh S. Surgical treatment of postintubation tracheal stenosis: Iranian experience of effect of previous tracheostomy. *Inter J Gen Med.* 2012; 5: 93-98.
- 46.- Correa AJ, Reinish L, Sanders DL, Huang S. Inhibition of subglottic stenosis with mitomycin c in the canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol.*1999; 108: 1053-60.
- 47.- Krotz-Gomez E., Reyes Marquez R., Díaz L. TGF-B and PDGF-AB expression in fibroblast derived from normal skin, hypertrophic/keloid scar and hypertrophic/keloid scar treated with fiboquel. *Wound Rep Reg.* 1996; 4: A160.
- 48.- Livingstone GL, Schild JA. Lathirogenic agents as therapy for subglottic stenosis a pilot study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1987; 97:446-451.
- 49.- Neel HB III, Harner SG. Fetal wound healing. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1994;110: 547-549.
- 50.- Reijnen MM, Bleichrodt RP, Van Goor H. Pathophysiology of intraabdominal adhesions and abscess formation, and the effect of hyaluronan. *Br J Surg.* 2003; 90: 533-541.
- 51.- Rodríguez R, Furuzawa J, Corchado A, Krötzsch F. Collagen-polyvinylpyrrolidone promotes human wound healing through cytokine down modulation. *Wound Rep Reg.* 2001; 9: 166.
- 52.- 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.
- 53.- Smith ME, Elstad M. Mitomycin C and the endoscopic treatment of laryngotracheal stenosis: are two applications better than one?. *Laryngoscope.* 2009; 119: 272-283.

- 54.- Simpson CB, James JC. The efficacy of mitomycin-C in the treatment of laryngotracheal stenosis. *Laryngoscope*. 2006; 116: 1923-1925.
- 55.- Wen DY. Intra-articular Hyaluronic Acid Injection for Knee Osteoarthritis. *Am Fam Physician*. 2000; 62: 565-570.
- 56.- Soldati D, Rahm F, Pasche P. Mucosal wound healing after nasal surgery. A controlled clinical trial on the efficacy of hyaluronic acid containing cream. *Drugs Exp Clin Res*. 1999; 25: 253-261.
- 57.- Sawada T, Hasegawa K, Tsukada K, Kawakami S. Adhesion preventive effect of hyaluronic acid after intraperitoneal surgery in mice. *Human Reproduction*. 1999; 14: 1470-1472.
- 58.- Krötzsch E, Díaz de León E, Furuzawa GJ, Marquez R, Quiroz E, Citokine expresión is down regulated by collagen-polivinylpirrolidone in hypertrophic scars. *J Invest Dermatol*. 1998; 111: 828-834.
- 59.- Cervantes C, Olaya E, Testas M, García N, Coste G, Arrellin G, Luna A, Krötzsch F. Collagen-PVP, a collagen síntesis modulator, decreases intraperitoneal adhesions. *J Surg Research*. 2003; 110: 207-210.
- 60.- 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.
- 61.- Santillán Artolózaga Alberto. Efecto de diferentes moduladores cicatrizales en la traqueoplastía. Tesis Especialidad de Otorrinolaringología, Cirugía de Cabeza y Cuello. México D.F. Facultad de Medicina. UNAM, 2006.
- 62.- Olmos-Zúñiga JR, González R, Gaxiola M, Jasso R, Sotres A, Santibáñez JA, Soda A. Empaquetamiento del oído medio con esponja de colágena

polivinil pirrolidona. Estudio experimental en cobayos. Rev Invest Clin. 2009; 61: 497-504.

63.- Palmer S. Mitomycin as adjunct chemotherapy with trabeculectomy. Ophthalmol. 1991; 98: 317-321.

64.- 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.

65.- 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.

66.- 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.

67.- 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.

68.- Veiga A, Rendal M, Matheu G, Andi6n C. S6nchez J, Segura R, et al. Cambios histopatol6gicos en arterias humanas sometidas a procesos de isquemia fr6a y criopreservaci6n. Angiolog6a. 2004; 56: 97-105.

- 69.- Woessner JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys*. 1961; 93:440–447.
- 70.- Ruiz López VM. Efecto de los Inmunosupresores en la Cicatrización Bronquial en un Modelo de Autotrasplante Pulmonar. Tesis Licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF. 1996.
- 71.- Ferguson MW, O’Kane S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Phil Trans R Soc Lond B*. 2004; 359: 839-850.
- 72.- 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.
- 73.- Longaker MT, Whitby DJ, Adzick NS, et al. Studies in fetal wound healing, VI. Second and early third trimester fetal wounds demonstrate rapid collagen deposition without scar formation. *J Pediatr Surg*. 1990; 25: 63-69.
- 74.- Mast BA, Diegelmann RF, Krummel TM, Cohen IK. Scarless wound healing in the mammalian fetus. *Surg Gynecol Obstet*. 1992; 174: 441-451.
- 75.- Ward PD, Thibeault SL, Gray SD. Hyaluronic Acid: Its Role in Voice. *Journal of Voice*, 2002; 16: 303-309.
- 76.- Li L, Qian Y, Jiang Ca, Lv Y, Liu W, Zhong L, Cai K, Li S. The use of hyaluronan to regulate protein adsorption and cell infiltration in nanofibrous scaffolds. *Biomaterials*. 2012; 33: 3428-3445.

- 77.- Nagorski C, Opalensky D, Bettelheim F. A study of collagen-hyaluronan interaction through swelling in polyacrylamide gels. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1995; 89: 179.
- 78.- 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.
- 79.- Iñiguez R, San Martin 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.
- 80.- Lama PJ, Fechtner RD. Antifibrotics and wound healing in glaucoma surgery. *Surv Ophthalmol.* 2003; 48:314-346.
- 81.- Hueman EM, Simpson CB. Airway complications from topical mitomycin C. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 133:831-835.
- 82.- Hardillo J, Vanclooster C. An investigation of airway wound healing using a novel in vivo model. *Laryngoscope.* 2001; 111:1174-1182.
- 83.- Roh JL, Lee YW, Park CI. Can mitomycin C really prevent airway stenosis? *Laryngoscope.* 2006; 116: 440-445.
- 84.- Shu-Wen C. Early corneal edema following topical application of mitomycin-C. *J Cataract Refract Surg* 2004; 30: 1742-1750.
- 85.- LoSavio PS, Walner DL, Williams JM, Kaiser KA, Mark V, Caldarelli DD. The Effect of Hyaluronic Acid on Tracheal Wound Healing. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 131: P121.

- 86.- Lee JK, Lee MY, Kim MK, Moona NJ. Effect of mitomycin C on the tensile properties of the upper lacrimal canaliculi in a rabbit model. *Experimental Eye Research*. 2012; 102: 38-43.
- 87.- Brown NJ, Smythe, EA, Cross SS, Reed MW. Angiogenesis induction and regression in human surgical wounds. *Wound Repair Regen*. 2002; 10:245-251.
- 88.- 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.
- 89.- King SR, Hickerson WL, Proctor KG. Beneficial actions of exogenous hyaluronic acid on wound healing. *Surgery* 1991; 109:76-84.
- 90.- Furuzawa J, González I, Corchado A, Arrellin G, Kröttsch E. La colágena-polivinilpirrolidona administrada localmente previene la formación de adherencias peritoneales en un modelo murino. *Rev Esp Med Quir*. 2001; 6: 11-16.
- 91.- 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.
- 92.- Moreland LW. Intra-articular hyaluronan (Hyaluronic Acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: Mechanisms of action. *Arthritis Research Therapy*. 2003; 5: 54-67.
- 93.- Sánchez CJ Cicatrización en el neonato con labio y paladar hendidos. *Cir Plast* 2006; 16:24-27.

- 94.- Cowin A J, Brosnan M P, Holmes TM, Ferguson MW J. Endogenous inflammatory response to dermal wound healing in the fetal and adult mouse. *Dev. Dynamics*. 1998; 212:385-393.
- 95.- Cowin A J, Holmes TM, Brosnan P, Ferguson M W J. Expression of TGF- $\beta$  and its receptors in murine fetal and adult dermal wounds. *Eur. J. Dermatol.* 2001; 11: 424-431.
- 96.- Fiedler LR, Eble JA. Decorin regulates endothelial cell-matrix interactions during angiogenesis. *Cell Adhesion and Migration*. 2009; 3: 3-6.
- 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. *Amer J Otolaryngol.* 2008; 29: 300-304.
- 99.- Eliashar R, Eliachar I, Esclamado R, Gramlich T and Strome M. Can Topical Mitomicyn Prevent Laryngotracheal Stenosis?. *Laryngoscope.* 1999; 109: 1594-1600.
- 100.- Barbul A, Breslin RJ, Woodyard JP, Wasserkrug HL, Efron G. The effect of in vivo T helper and T suppressor lymphocyte depletion on wound healing. *Ann Surg.* 1989; 209: 479-483.
- 101.- Agaiby AD, Dyson M. Immuno-inflammatory cell dynamics during cutaneous wound healing. *J Anat.* 1999; 195: 531-542.

- 102.- Tsirogianni AK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. Wound healing: Immunological aspects. *Injury, Int J Care Injured*. 2006; 37S: S5-S12.
- 103.- Scott JE. Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen. *Biochemistry*. 1996; 35; 87-95.
- 104.- Weber IT, Harrison RW, Lozzo RV. Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem*. 1996; 271: 317-367.
- 105.- Vogel KG, Trotter JA. The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. *Coll Relat Res*. 1987; 7:105-114.
- 106.- Douglas T, Heinemann S, Bierbaum S, Scharnweber D, Worch, H. Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan. *Biomacromolecules*. 2006; 7: 2388-2393.
- 107.- Reed CC, lozzo RV. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj J*. 2002; 19: 249-255.
- 108.- Doolin EJ, Tsuno K, Strande LF, Santos MC. Pharmacologic inhibition of collagen in an experimental model of subglottic stenosis. *Ann Rhinol Laryngol*. 1998; 107: 275-279.
- 109.- Senders CW. Use of mitomycin C in the pediatric airway. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004; 12: 473-475.
- 110.- McCurdy E, Blake S. Airway complications from topical mitomycin C. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005; 133: 831-835.