



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
CIRUGIA EXPERIMENTAL

EFEECTO DE LA MEZCLA DE ÁCIDO HIALURÓNICO Y COLÁGENO
POLIVINIL PIRROLIDONA SOBRE LA EXPRESIÓN
***IN SITU* DE METALOPROTEINASAS 1 Y 9**
POSTRAQUEOPLASTIA EN PERROS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
NORMA SOLIS ALANIS

TUTOR PRINCIPAL:
JUAN RAÚL OLMOS ZÚÑIGA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MÉXICO, D.F. JUNIO 2014



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.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A mis padres, mis hermanas Laura y Claudia y mi sobrino Carlos por todo el apoyo que siempre tuve de ustedes de manera incondicional, los amo.

Este trabajo no es más que la consolidación del esfuerzo y cariño de mi familia hacia mí, que me han ayudado a concluir una etapa importante en mi formación académica.

A todo el equipo de cirugía experimental del INER en especial al M en C Raúl Olmos, Dr. Rogelio Jasso y la Dra. Claudia Hernández por haber hecho posible la realización de esta tesis, por todas las enseñanzas, por su apoyo incondicional y la amistad que me brindaron.

Gracias a mis compañeros y amigos del INER que me ayudaron en este proyecto: Istar, Enrique, Sergio, Beto, Drusso, Adrian, Axel, Melissa y Antonia.

Un agradecimiento especial a mis amigos César, Luis, Félix, Maciel, Pamela, Leslie, Adriana y Varón por su confianza y amistad, ustedes han formado parte de mi formación personal y profesional, los quiero mucho.

A mis maestros y amigos: Dr. Eduardo Téllez, Dr. Manuel Rangel, Dr. Ciriaco Tista y Dra. Hortensia Corona, por todos los conocimientos, y sobre todo por el apoyo que he recibido de su parte. Mi admiración y respeto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.....gracias por todo lo que me ha dado.

Efecto de la mezcla de Ácido Hialurónico y Colágeno Polivinilpirrolidona sobre la expresión *in situ* de metaloproteinasas 1 y 9 postraqueoplastia en perros.

RESUMEN.

Introducción. La estenosis traqueal (ET) es producto de una cicatrización patológica, en la cual se produce una prolongación y/o la exageración de la inflamación, incremento en la producción de colágena o una disminución de la degradación de esta proteína debido a la ausencia de las metaloproteinasas (MMPs). Por lo que, la aplicación de moduladores de la cicatrización (MDC) en el tejido dañado podría evitarla. El ácido hialurónico (AH) y la colágeno polivinilpirrolidona (CPVP) disminuyen y previenen la inflamación y fibrosis, pero el efecto de su mezcla aplicado después de la traqueoplastía no se ha descrito. Objetivo. El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios endoscópicos, macroscópicos, microscópicos, bioquímicos y la expresión *in situ* de las MMP-1 y MMP-9 en la cicatriz de la anastomosis traqueal tratada tópicamente con la mezcla AH-CPVP en perros. Material y métodos. Treinta perros mestizos fueron sometidos a traqueoplastía cervical y tratados con la aplicación tópica de los diferentes MDC sobre la anastomosis traqueal de la siguiente forma: Grupo I (n=6): SSF. Grupo II (n=6): AH. Grupo III (n=6): CPVP. Grupo IV (n=6): AH-CPVP y Grupo V (n=6): Mitomicina C (MC). Todos los animales fueron evaluados clínica y endoscópicamente. Cuatro semanas postcirugía fueron sometidos a eutanasia y los cambios macroscópicos, microscópicos, deposición de colágena, expresión *in situ* de MMP1 y MMP9 en la cicatriz de la anastomosis traqueal fueron evaluados. La deposición de colágena fue cuantificada con el método de Woessner; mientras que la expresión *in situ* de las MMPs se realizó con inmunohistoquímica. **Resultados.** Los estudios traqueoscópicos, macroscópicos y microscópicos en los grupos II, III y IV mostraron menor inflamación ($p < 0,001$ ANDEVA, Tukey). El grupo I mostró fibrosis severa y colágena desorganizada. La expresión de MMP1 fue severa en los grupos IV y V ($p < 0.01$ ANDEVA, Dunnet, Tukey). Todos los grupos mostraron moderada expresión de MMP9. Los grupos IV y V desarrollaron menor cantidad de colágena ($p < 0.001$ ANDEVA, Tukey). **Conclusión.** La aplicación tópica de la mezcla AH-CPVP postraqueoplastía incrementa la expresión *in situ* de MMP1 y moderada de MMP9, disminuye la reacción inflamatoria, deposición de colágena y favorece su organización en la cicatriz traqueal. **Palabras clave:** Cicatrices fibróticas, moduladores de la cicatrización, ácido hialurónico, colágena polivinilpirrolidona, deposición de colágena, expresión *in situ* de MMP1 y MMP9.

Effect of the mixture of Hyaluronic Acid and Collagen Polyvinylpyrrolidone on *in situ* expression of metalloproteinases 1 and 9 in postracheoplasty scar in dogs.

Abstract

Introduction. Tracheal stenosis (TS) is product of a pathological wound healing process, in which occurs a prolongation and/or exaggeration the inflammation, increased production of collagen or a decreased degradation of these proteins due to the absence of metalloproteinases (MMPs). Therefore, the application of wound healing modulators (WHM) in the damaged tissue could prevent it. Hyaluronic acid (HA) and collagen polyvinylpyrrolidone (CPVP) decrease and prevent inflammation and fibrosis, but the effect of their mixture applied post-tracheoplasty has not been described. **Objective.** The aim of this study was to evaluate the endoscopic, macroscopic, microscopic, biochemical and *in situ* expression of MMP1 and MMP9 changes in a tracheal anastomosis scar after the topical application of the mixture HA-CPVP in dogs. **Materials and Methods:** Thirty mongrel dogs underwent cervical tracheoplasty and were treated with the topical application of different WHM on tracheal anastomosis as follows: Group I (n=6): Control. Group II (n=6): HA. Group III (n=6): CPVP. Group IV (n=6): HA-CPVP and Group V (n=6): Mitomycin C (MC). All animals were submitted to clinical and endoscopic tracheal evaluation. Four weeks post-surgery, the macroscopic, microscopic changes, collagen deposition and expression *in situ* of MMP1 and MMP9 in tracheal healing were evaluated. The collagen deposition was quantified by the Woessner method; while the expression *in situ* of MMPs was done by immunohistochemistry. **Results.** Tracheoscopy, macroscopic and microscopic studies in groups II, III and IV showed less inflammation ($p < 0.001$ ANOVA, Tukey). Group I presented severe fibrosis and disorganized collagen. Expression of MMP1 was severe in groups IV and V ($p < 0.01$, ANOVA, Dunnett, Tukey). All groups showed moderate expression of MMP9. Groups IV and V developed a lower quantity of collagen ($p < 0.001$ ANOVA, Tukey). **Conclusion.** The topical application of a combination mixture of HA-CPVP post-tracheoplasty showed a severe expression *in situ* of MMP1 and moderate of MMP9, diminished the inflammatory reaction, collagen deposition and promotes its organization in the tracheal healing.

Keywords: Fibrotic scars, wound healing modulators, hyaluronic acid, collagen-polyvinylpyrrolidone, collagen deposition, expression *in situ* of MMP1 and MMP9.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de las metaloproteinasas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de las metaloproteinasas.

Figura 2. Estructura química de MC.

Figura 3. Estructura química de AH.

Figura 4. Muestra la técnica quirúrgica realizada en los animales sometidos a estudio.

Figura 5. Muestra la aplicación del tratamiento en un animal del grupo IV.

Figura 6. Traqueoscopia realizada al final del estudio y que muestra el estado de la cicatriz en los grupos II (AH), III (CPVP), IV (AH-CPVP) y V (MC).

Figura 7. Muestra la cicatriz macroscópica en de la porción externa de la tráquea en los grupos de Ah y CPVP, así como la interna en los de la mezcla AH-CPVP y MC.

Figura 8. Micrografías (Masson 2x). Examen histológico de un animal de cada grupo.

Figura 9. Deposición de colágena en el tejido traqueal antes y después de la traqueoplastía en todos los grupos de estudio.

Figura 10 Muestra el grado de expresión in situ de la MMP-1 al final del estudio en todos los grupos.

Figura 11. Micrografía IHC (40x) de tejido traqueal en un animal de cada grupo.

Figura 12. Se observa en grado de expresión in situ de la MMP-9 después de tratar la traqueoplastías con diferentes moduladores de la cicatrización.

Figura 13. Micrografía IHC (40x) de tejido traqueal en un animal de cada grupo.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	I
RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	III
LISTA DE CUADROS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	IV

I. ANTECEDENTES.....	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	24
III. HIPÓTESIS.....	25
IV. OBJETIVOS.....	25
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
VI. RESULTADOS.....	36
VII. DISCUSIÓN.....	46
VIII. CONCLUSIONES.....	58
IX. BIBLIOGRAFÍA	61

ANTECEDENTES

ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA TRÁQUEA

El sistema respiratorio en los mamíferos es un conjunto de órganos cuyas funciones principales son el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono (gases respiratorios) entre el organismo y el medio ambiente, permitir el equilibrio ácido base y la termorregulación. ^(1,2) Se divide en tres zonas anatómicas: conducción, transición y respiratoria. La zona conductiva incluye la cavidad nasal, faringe, laringe, tráquea, bronquios y bronquiolos, su función es filtrar partículas como bacterias y polvo que entran con el aire inspirado, calentarlo y proporcionarle humedad al mismo. La zona de transición se compone de bronquiolos respiratorios y conductos alveolares. Tanto la zona conductiva como la de transición contienen vasos sanguíneos que sirven para humidificar, filtrar y distribuir el aire rico en oxígeno a la unidad respiratoria, además de eliminar el dióxido de carbono del aire alveolar. ⁽¹⁾ La zona respiratoria es el sitio de intercambio gaseoso entre el aire alveolar y la sangre, y está formada por los alveolos, que son la unidad anatomofuncional de los pulmones y los capilares sanguíneos ^(1, 3, 4).

La tráquea tiene como función llevar el aire inspirado ya sea por la nariz o boca hacia las zonas de intercambio gaseoso. Este órgano, es un tubo semirrígido flexible que se extiende por la parte ventral del cuello (parte cervical), desde la laringe, después entra a la cavidad torácica (parte torácica), transita por el mediastino y a nivel de las vértebras torácicas IV o V se bifurca en dos bronquios principales (derecho e izquierdo). En el perro esta se

encuentra formada por 35 a 45 cartílagos traqueales incompletos dorsalmente (tiene forma de “C”). En la parte dorsal de la tráquea, se ubica la parte membranosa, en donde se sitúa el músculo traqueal. Los cartílagos traqueales se conectan entre sí por tejido conectivo fibroelástico (ligamentos anulares) ⁽¹⁾.

Arterias y venas de la tráquea

El principal flujo arterial de la tráquea cervical proviene de la tiroidea inferior y superior. La inferior se divide en tres ramas traqueo-esofágicas, de las cuales la primera irriga la tráquea cervical baja con poco aporte al esófago. La segunda y tercera aportan sangre tanto a la parte media como a la superior traqueal y esófago. Se ha descrito que de la unión de la arteria tiroidea inferior y superior se forman de tres a siete ramas arteriales principales que penetran por el surco esófago-traqueal, dividiéndose en ramas traqueales y esofágicas ⁽⁵⁾.

El drenaje venoso traqueal tiene lugar mediante pequeñas venas que surgen de la red mucosa y de la proximidad de las glándulas discurrendo en sentido anteroposterior en los espacios intercartilaginosos, donde drenan en uno o dos pequeños troncos longitudinales y estos en las venas esofágicas y tiroideas inferiores ^(2,5).

Inervación de la tráquea

La inervación está dada tanto por fibras simpáticas y parasimpáticas del sistema nervioso autónomo. Las fibras simpáticas provienen de los ganglios cervicales, y del tronco simpático, las cuales actúan inhibiendo la contracción del músculo traqueal y secreciones glandulares, mientras que las fibras parasimpáticas son ramas del nervio laríngeo recurrente, que se encargan de controlar la contracción del músculo traqueal y secreción glandular ^(2,5).

HISTOLOGIA TRAQUEAL

Histológicamente en todos los mamíferos la tráquea se compone de la parte interna a la externa por una túnica mucosa, tela submucosa, túnica fibromusculocartilaginosa y túnica adventicia (parte cervical) o serosa (parte torácica)^(6,7).

La túnica mucosa está formada por un epitelio respiratorio (tejido epitelial pseudoestratificado columnar ciliado con exocriocitos caliciformes intercalados) su función es la de actuar como barrera protectora ya que produce moco, el cual filtra y remueve (a través de los cilios) las partículas atrapadas dirigiéndolas hacia la parte craneal de la tráquea.

Como parte de la túnica mucosa, por debajo del epitelio, está la lámina propia formada por tejido conectivo laxo, principalmente a base de fibras elásticas, también posee glándulas mucosas que tienen sus conductos de salida en la luz traqueal⁽⁶⁾.

La tela submucosa está constituida por una capa de fibras elásticas.

En la túnica fibromúsculocartilaginosa se encuentran los cartílagos traqueales, ligamentos anulares y el músculo traqueal. El cartílago es de tipo hialino y está revestido por pericondrio, que se encarga de proporcionar el aporte sanguíneo y la eliminación de los restos metabólicos celulares. El pericondrio entre anillo y anillo se continúa y forma un tejido conectivo fibroso que une a los cartílagos entre sí y su función es darle estabilidad a la tráquea. Además el cartílago está compuesto por la matriz extracelular (MEC) y los condrocitos. La MEC es un gel formado por una sustancia fundamental (compuesta de macromoléculas de proteoglicanos y glicoproteínas estructurales que rellena el espacio entre las células) y fibras de tejido conjuntivo. La MEC es el principal sostén celular de

diferentes órganos y tejidos. Los condrocitos renuevan las macromoléculas de la matriz del cartílago, sintetizan colágeno principalmente de tipo II, proteoglicanos y condronectina.

En la parte cervical de la tráquea, la túnica adventicia es la cubierta externa y se encuentra formada por tejido conectivo laxo y su función es unir a la tráquea con los tejidos adyacentes^(6,7). En la parte torácica esta túnica se convierte en túnica serosa al entrar en contacto con el mediastino; la túnica serosa está formada por un mesotelio soportado por fibras de tejido colágeno laxo.

TRASTORNOS DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS CONDUCTORAS

Los trastornos de las vías aéreas conductoras son principalmente inflamatorios, infecciosos y por alteraciones anatómicas originados por la presencia de estenosis traqueal, neoplasias, traumas y malasia.⁽⁸⁾

En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER), durante el 2012 acudieron 407 pacientes a la clínica de tráquea por diversas patologías y se realizaron 260 traqueostomías con colocación y cambio de cánula, 61 dilataciones traqueales, 41 cirugías entre traqueoplastía, laringotraqueoplastía, y laringoplastía, 24 resecciones de lesión en tráquea y bronquios, 18 cierres de fístula de vía aérea. Estos procedimientos se realizan con láser, así como con la colocación de prótesis traqueales⁽⁹⁾.

ESTENOSIS TRAQUEAL

Las estenosis traqueales (ET) representan aproximadamente el 92% de las patologías traqueales de origen benigno ⁽⁸⁾ y se define como una disminución anormal en el calibre de la tráquea que provoca obstrucción de la vía aérea ^(10, 11).

Tipos de estenosis traqueales

Las estenosis traqueales pueden clasificarse de acuerdo a su localización y a su etiología.

a) Estenosis traqueales de acuerdo a su localización.

Esta clasificación está basada de acuerdo al sitio que afecta y se divide en: a) Subglótica que incluye los anillos traqueales inmediatos a la glotis, b) Cervical que involucra únicamente los anillos de la tráquea cervical y c) Torácica que afecta la tráquea torácica ⁽¹¹⁾.

Cabe mencionar que para el estudio de su localización y extensión se han desarrollado otras escalas, las cuales han contribuido a decidir el tipo de tratamiento a utilizar y han permitido en algunos casos establecer un pronóstico. Dentro de esta escala se encuentra la clasificación de McCaffrey ⁽¹²⁾ y la de Myers-Cotton ⁽¹³⁾.

La escala de McCaffrey toma en cuenta el subsitio de lesión afectado, así como la longitud de la misma y se divide en Grado I: que es una estenosis subglótica o traqueal pura < 1cm, Grado II: estenosis subglótica >1cm, Grado III: subglótica y traqueal que no involucra la glotis y Grado IV: estenosis con extensión a glotis ⁽¹²⁾.

Por otro lado, la escala de Myers-Cotton se basa en la medición del porcentaje circunferencial de la disminución de la luz traqueal y las divide en: Grado I (disminución de la luz traqueal de 0-50%), Grado II (disminución de la luz traqueal del 51-70%), Grado III (disminución de la luz traqueal del 71-99%) y Grado IV (sin luz traqueal detectable) ⁽¹³⁾. En la clínica esta es la escala más utilizada.

b) Estenosis traqueales de acuerdo a su etiología.

La etiología de las ET en la mayoría de los casos son adquiridas y originadas por diversas condiciones clínicas. La causa principal en humanos y perros (aproximadamente 75-90% de los casos) es la intubación prolongada y la cirugía traqueal (traqueostomía y traqueoplastía) ^(10, 14-16); aunque también se ha descrito la presencia de infecciones locales, mal manejo de las secreciones de la vía aérea durante la intubación y condiciones inflamatorias crónicas, ⁽¹⁶⁻²¹⁾ que provocan lesión de la mucosa traqueal, las cuales al cicatrizar sufren una fibrosis desproporcionada en el sitio de la herida de la vía aérea ⁽²²⁾. Aunque en la literatura también se ha descrito que son 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 tejido conectivo en la MEC ^(23, 24).

Las ET, también pueden ser de origen congénito hasta el 10% de los casos y un 2-3% de origen idiopático ^(10, 14, 15).

Aunque las estenosis traqueales se han clasificado de varias formas de acuerdo a su etiología, el mecanismo fisiopatológico por el que se forma una ET después de una intubación prolongada o cirugía, se inicia con la producción

de una necrosis isquémica de la mucosa y ulceración de la misma en el sitio lesionado, lo cual se caracteriza por la aparición de una inflamación prolongada en todas las capas de la tráquea, acumulación anormal de matriz extracelular (MEC), excesiva formación de tejido fibroso desorganizado e inadecuada contracción cicatrizal que obstruye la luz traqueal ⁽²⁶⁾.

CICATRIZACIÓN

La cicatrización es un proceso que se encarga de restablecer la continuidad anatómica y funcional de un tejido mediante la reparación o regeneración del tejido dañado mediante un tejido igual al existente previo a la lesión o con una cicatriz ^(27- 29).

El proceso de cicatrización de las heridas tiene 3 fases: inflamación, proliferación y maduración, en las cuales se producen una serie de eventos interrelacionados en los que las plaquetas, células inflamatorias, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales interactúan para restaurar el tejido lesionado.

La fase inflamatoria se presenta unas cuantas horas después de haberse producido la lesión, durante la cual migran hacia el sitio dañado líquidos que contienen proteínas plasmáticas, fibrina y células inflamatorias que eliminan los restos celulares, fagocitan los microorganismos y el material extraño. Posteriormente los monocitos se convierten en macrófagos que fagocitan los residuos restantes y producen enzimas proteolíticas. Finalmente, las células basales de los bordes de la lesión migran sobre la misma incisión para cerrar la superficie de la herida. Simultáneamente, los fibroblastos localizados en el tejido conjuntivo más profundo inician la reconstrucción del tejido no epitelial.

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 ⁽³⁰⁾.

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 ^(31, 32).

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 ⁽³³⁾. 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 transformante beta (TGF- β) ⁽³⁴⁾ 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⁽³⁵⁾. Al mismo tiempo 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 retícula (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^(27, 36).

En la tráquea una cicatrización adecuada se presenta por un balance entre la deposición de colágena tipo I, II y III, así como la adecuada expresión de proteasas y la presencia de una leve respuesta inflamatoria.

Las colágenas de los tipos I, II y III son las principales fibrilares. El tipo I se encuentra en muchos tejidos conectivos, entre los que se incluyen la piel, los huesos, los tendones y los ligamentos. El tipo II es el principal tipo de colágena del cartílago hialino. El tipo III es menos abundante que los tipos I y II, pero se pueden encontrar pequeñas cantidades en los tejidos que contienen el tipo I, con excepción del hueso y el tendón, y representa aproximadamente la mitad

de la colágena total en los principales tejidos del sistema cardiovascular como las válvulas cardíacas y las principales arterias ^(20, 37).

Todas estas colágenas son similares en tamaño y se caracterizan por tener grandes dominios de triple hélice con alrededor de 1000 residuos de aminoácidos o 330 repeticiones Gly- X- Y por cadena. Además, son sintetizados como grandes precursores, que necesitan ser procesados hasta colágenas mediante la intervención de las procolágenas peptidasas. Estas colágenas se caracterizan por su capacidad para ensamblarse formando agregados supramoleculares altamente orientados con una estructura característica, la típica organización de fibras escalonadas con diámetro de entre 25 y 400 nm. En el microscopio electrónico, las fibrillas se definen por un patrón de bandas característico con una periodicidad de aproximadamente 67 nm (llamada periodo D) debido a la disposición escalonada de los monómeros de colágeno individuales.

La colágena tipo I es la más abundante y estudiada de esta familia. Constituye más del 90% de la masa orgánica del hueso y es la principal colágena de los tendones, la piel, los ligamentos, la córnea y muchos tejidos conectivos intersticiales con excepción del cartílago hialino, el cerebro y el cuerpo vítreo. La triple hélice de la colágena tipo I es un heterotrímero formado por dos cadenas idénticas $\alpha 1$ (I) y una cadena $\alpha 2$ (I). Las fibras helicoidales, *in vivo*, suelen encontrarse entremezcladas con las fibras de colágena tipo III (en la piel y las fibras reticulares) o colágena tipo V (en el hueso, los tendones y la córnea). En la mayoría de los órganos, y fundamentalmente en los tendones, la colágena tipo I proporciona rigidez a la tensión y en el hueso, es responsable

de las propiedades biomecánicas relacionadas con la resistencia a la carga y la tensión ^(44, 45).

La colágena tipo II es el componente característico y predominante del cartílago hialino. En comparación con la colágena tipo I, las cadenas de la tipo II muestran un contenido en hidroxilisina mayor, así como residuos de glucosa y galactosa que median la interacción con proteoglicanos, otro componente típico de la matriz del cartílago hialino. Forma una red de fibrillas entre las que se encuentran moléculas de proteoglicanos. Sin embargo, no es exclusivo del cartílago, donde representa un 80% de la colágena total, ya que también se encuentra en el cuerpo vítreo, el epitelio de la córnea, la notocorda, el núcleo pulposo de los discos intervertebrales y el epitelio embrionario. La triple hélice de la colágena tipo II está formada por tres cadenas $\alpha 1$ (II) formando una molécula homotrimérica de tamaño y propiedades biomecánicas similares a las de la tipo I. En el cartílago también se encuentran colágenas tipo IX y XI, los cuales se cree que actúan limitando el diámetro de las fibrillas de colágena tipo II a 15-50nm ^(46, 47).

La colágena tipo III es un homotrímero de tres cadenas $\alpha 1$ (III) y está ampliamente distribuido en todos los tejidos que contienen colágena tipo I excepto en el hueso y en los tendones. Es un componente importante de las fibras reticulares en el tejido intersticial de los pulmones, el hígado, la dermis, el bazo y los vasos sanguíneos ^(38, 20).

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 MEC, ya sea 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 metaloproteinasas (MMPs), lo cual provoca un incremento en las fibras de colágena y la desorganización de las mismas, que ocasiona defectos en la remodelación ⁽²³⁾.

El mecanismo por medio del cual se ve aumentada la cantidad de colágena, no es por aumento en el volumen total de fibroblastos, sino por las alteraciones de la matriz extracelular que a la cantidad de fibroblastos presentes en la herida, hecho que se ha documentado mediante estudios experimentales que muestran incremento en el RNAm (mensajero) encargado de la producción de dichas sustancias. Igualmente, se ha podido documentar el hecho de que en la degradación, estas proteínas de matriz están disminuidas. El RNAm, encargado de la síntesis de colagenasas, está disminuido en estos tejidos. Por lo que se presenta un déficit en la degradación de la colágena vieja que tiene como resultado que se forme una cicatriz inadecuada ^(23, 39).

MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular (MEC) es el principal sostén celular de diversos órganos y tejidos (entre ellos la tráquea) y tiene varias funciones como intervenir en la organización y orientación tisular, adhesión celular, migración, diferenciación, proliferación y apoptosis; también actúa como un filtro biofísico de protección, nutrición e invasión celular, así como en la generación de la respuesta inmune, angiogénesis, fibrosis y regeneración tisular.

La MEC está formada por varios componentes que se clasifican en tres grupos:

a) sustancia fundamental formada por proteoglicanos constituidos por una proteína central y una o varias cadenas de glucosaminoglicanos, b) proteínas estructurales (colágena y elastina) y c) proteínas de adhesión (fibronectina y laminina). Estos componentes se encuentran interconectados y con esto le confieren las propiedades estructurales a cada célula y tejidos; sin embargo (como ya se mencionó) cualquier alteración de estos componentes durante la regeneración tisular, va a producir un déficit o exceso en la producción de colágena, fibronectina y proteoglicanos o la disminución en la degradación de estas proteínas, lo cual va a provocar defectos en la remodelación por la falta de metaloproteinasas (MMPs), que se encargan de degradar las proteínas integrantes de dicha MEC en su medioambiente inmediato ⁽⁴⁰⁻⁴⁶⁾.

METALOPROTEINASAS

Las MMP, también denominadas metzinas forman una familia de al menos 28 enzimas proteolíticas ⁽⁴³⁾ y se caracterizan porque su sitio activo contiene un ión de zinc (Zn^{2+}) que requiere de calcio (Ca^{2+}) como cofactor para su activación; sin embargo cada MMP aunque posee una similitud estructural en la secuencia de aminoácidos, son controladas por un gen diferente. ^(46, 47) Estas

se sintetizan como proenzimas inactivas (zimógenos) que pueden almacenarse en los gránulos de las células inflamatorias, aunque la mayoría se secretan y se encuentran ancladas a la superficie celular o a otras proteínas de membrana o de la MEC.

Estructura

Todas las MMPs presentan una estructura común compuesta básicamente de cuatro dominios conservados: un péptido señal o predominio, situado en el extremo amino-terminal y que se elimina en el retículo endoplasmático, el cual se encarga de determinar si la proteína va a ser secretada o anclada a la membrana. Un propéptido o prodominio, de unos 80-90 aminoácidos que contienen una cisteína conservada que mantiene la enzima en estado latente. Cuando este dominio se procesa, la enzima se activa ⁽⁴⁶⁾. El dominio catalítico, de unos 160-170 aminoácidos contiene el sitio activo altamente conservado donde se encuentran las tres histidinas que se unen al zinc catalítico. En esta región se determina la especificidad hacia los diferentes sustratos, mediante conformaciones específicas y regiones localizadas fuera del sitio activo. (Figura 1) Por último, todas las MMPs, excepto MMP-7, MMP-26 y MMP-23, presentan un dominio tipo hemopexina de aproximadamente 200 residuos que conecta con el dominio catalítico a través de una región rica en prolina. El dominio hemopexina que regula la unión de la proteasa a distintos sustratos y a sus inhibidores; interviene en la unión y activación de las MMPs en la membrana celular y dirige ciertas actividades proteolíticas ^(41, 47).

También se ha descrito en algunos casos un dominio transmembrana, en el caso de las MMPs asociadas a la membrana plasmática.

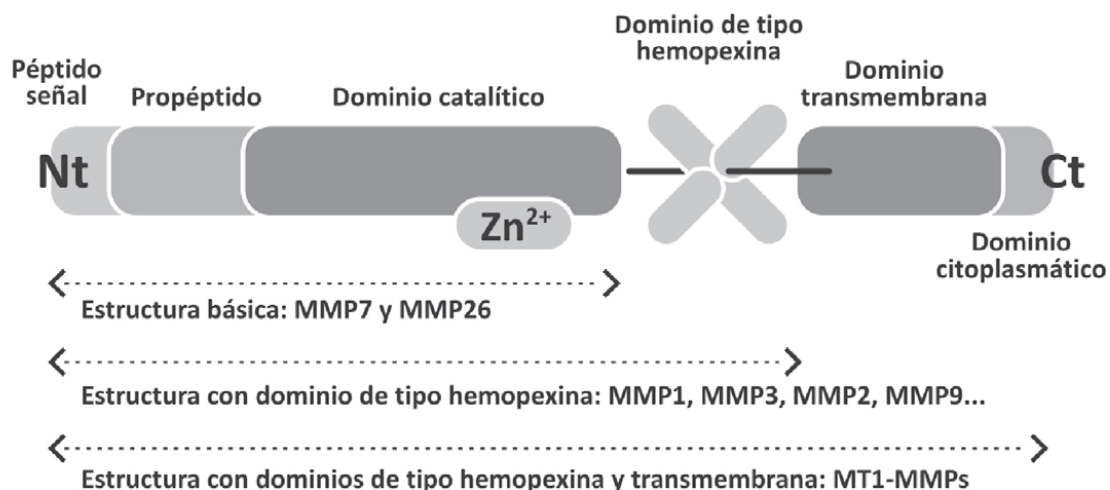


Figura 1. Estructura básica de las metaloproteinasas (Tomada Coronato et al, 2012)

Funciones de las MMPs:

Las MMPs intervienen en la mayoría de los procesos fisiológicos que requieren de remodelación de la MEC y tienen un papel muy definido en los diversos procesos celulares como la apoptosis, proliferación, migración y remodelación (43).

Las MMPs se expresan a niveles bajos en los tejidos normales, pero se sintetizan y activan rápidamente en situaciones que requieren la remodelación tisular, excepto la MMP-2, MMP-19, MMP-28 y varias MT-MMPs que se expresan en condiciones fisiológicas. La presencia de niveles altos de alguna se ha asociado a la destrucción tisular en una amplia variedad de procesos patológicos como diseminación de metástasis tumorales, artritis, formación de aneurismas, aterosclerosis, etc. (41, 47).

Debido a sus múltiples funciones fisiológicas, en las cuales las MMPs actúan como interruptor dual activando o inactivando funciones, es necesario que estas enzimas estén estrictamente reguladas en múltiples niveles, de forma

que únicamente se expresen y sean activas en el tipo celular, momento y lugar adecuados ⁽⁴⁸⁾.

Regulación de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica de las MMPs está regulada a tres niveles diferentes: transcripcional, activación de la proenzima e inhibición.

Regulación transcripcional

La expresión génica de las MMP es regulada por una variedad de citocinas tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), mediadores inflamatorios, y factores de crecimiento.

Los mecanismos de regulación transcripcional son mecanismos muy complejos. Se ha demostrado que los promotores de estas contienen elementos cis que permiten que la regulación sea llevada a cabo por diversos activadores trans, incluyendo AP-1, PEA-3, Sp-1, β -catenina/Tcf-4 y el NF-kB ⁽⁴⁹⁾.

Regulación de la activación de las proenzimas

Se ha demostrado que el paso primordial en la activación de la forma latente de las MMPs se basa en la ruptura del mecanismo de unión de bisagra que forma el zinc con la cisteína (Cys), al ser desestabilizado por la acción de las proteinasas tisulares o plasmáticas denominadas plasminas, calicreínas y catepsinas ⁽⁴³⁾.

El activador fisiológico principal de las MMPs es la vía plasmina-plasminógeno, la cual se produce por la acción de la urocinasa activadora del plasminógeno (uPA) y el activador tisular del plasminógeno unido a la fibrina (tPA), los cuales son producidos por varios tipos de células, entre ellas, las musculares lisas,

endoteliales y las implicadas en la remodelación de los tejidos y los macrófagos que expresan uPA y sus receptores ⁽⁵⁰⁾.

Regulación por inhibición

Los inhibidores naturales específicos de las MMPs son una familia de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP), que se unen a ellas de forma irreversible en una razón molar de 1:1, por lo que el nivel neto de actividad proteolítica dependerá de las concentraciones relativas de MMPs activas y sus inhibidores.

Además, los TIMP poseen diversas propiedades, como son las siguientes: actúan como moduladores de la proliferación, reguladoras del crecimiento celular, inhibidores de la angiogénesis, apoptosis, etc ^(45, 46).

Hasta el momento se han identificado cuatro inhibidores en mamíferos: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. A pesar de tener cierta similitud estructural entre ellos, existen diferencias entre la especificidad de los diversos TIMP. Así, TIMP-1 resulta particularmente importante en la regulación de la actividad de MMP-9, y TIMP-2 para el control de la actividad de MMP-2.

También se han descrito inhibidores generales de las proteinasas, como α 2-macroglobulina presente en el plasma y en los fluidos intersticiales y tienen la capacidad de inhibir a las MMPs ⁽⁴⁹⁾.

Clasificación de las MMPs

Las MMPs se clasifican de acuerdo al tipo de componente que degradan en la MEC, en: colagenasas, gelatinasas, matrilisinas, estromelisin, MMPs de tipo membrana y otras. ^(50,51)

Sin embargo, nuevos descubrimientos de estas enzimas hacen difícil su clasificación por lo que se han propuesto alternativas tales como características estructurales de los dominios, en su localización celular, en relación a su estructura primaria, entre otras. (Cuadro 1).

Subfamilia	MMP	Nombre común
Colagenasas	MMP-1	Colagenasa-1
	MMP-8	Colagenasa-2
	MMP-13	Colagenasa-3
	MMP-18	Colagenasa-4
Gelatinasas	MMP-2	Gelatinasa A
	MMP-9	Gelatinasa B
Matrilisinas	MMP-7	Matrilisina 1
	MMP-26	Matrilisina 2
Estromelisinias	MMP-3	Estromelisina 1
	MMP-10	Estromelisina 2
	MMP-11	Estromelisina 3
MMPs tipo membrana	MMP-14	MT1-MMP
	MMP-15	MT2-MMP
	MMP-16	MT3-MMP
	MMP-17	MT4-MMP
	MMP-24	MT5-MMP
	MMP-25	MT6-MMP
Otras	MMP-12	Metaloelastasa de macrófagos
	MMP-19	RASI-1
	MMP-20	Enamelisina
	MMP-21	
	MMP-22	CA-MMP
	MMP-23	
	MMP-27	Epilisina
	MMP-28	

Cuadro 1. Clasificación de las metaloproteinasas. (Tomado de Checa, 2009)

MMP-1 (Colagenasa-1)

Es la colagenasa intersticial que posee un peso molecular en su forma latente de 52 kDa y en su forma activa de 42 kDa. Es expresada en su mayor parte por fibroblastos, macrófagos y células epiteliales. Tiene como sustrato colágenas fibrilares tipo I, II, III. Las colágenas fibrilares son los componentes más abundantes de la matriz extracelular. Un aspecto importante de su metabolismo es que estas moléculas son resistentes a la degradación de la mayoría de las proteasas.

Su función principal es participar en el recambio normal del colágeno, pero su actividad se incrementa para lograr la remodelación de la matriz extracelular durante la cicatrización de las heridas.

Su actividad enzimática se desarrolla en el espacio extracelular y es más selectiva para el colágeno tipo III que para el tipo I ^(52, 53).

MMP-9 (Gelatinasa-B)

Conocida también como gelatinasa B, es capaz de degradar el colágeno tipo IV y la elastina. Su liberación se produce en forma de proenzima latente de 92 kDa, que alcanza su actividad catalítica cuando su peso molecular se reduce a 84 kDa.

La característica específica de las gelatinasas, es que poseen una región con tres dominios de fibronectina tipo II capaces de unirse a la gelatina, laminina y colágeno tipo I, II, III, IV y V. Además de otras proteínas como proteasas, inhibidores de proteasas, quimiocinas, el factor plaquetario.

La MMP-9 es producida por neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B, diversos tipos de células epiteliales incluyendo las de la vía respiratoria y el cartílago ⁽⁵⁴⁾ durante la fase aguda de la inflamación en el tejido lesionado ^(55- 59).

Desempeña un papel complejo en la cicatrización de heridas ya que interfiere en la inflamación, la remodelación de la MEC, angiogénesis y regeneración epitelial y algunos autores sugieren que esta MMP se requiere para el normal cierre de la progresión y la herida ⁽⁶⁰⁾.

En todos los casos su expresión es inducida por determinados estímulos que activan su expresión (IL-1, IL-2, ésteres de formol, lectinas, adhesión celular) o la reprimen (IL-4, IL-10, interferones).

Para la activación de MMP-9 se han propuesto varios mecanismos, muchos de los cuales implican su procesamiento en la membrana celular a través de diversas vías siendo la más común la vía plasmina-plasminógeno.

MMP-9 también es capaz de activarse de manera química, vía oxidativa (como hacen los neutrófilos), por la generación de radicales 2- y 4-hidroxiestradioles o por compuestos organomercuriales.

Los inhibidores fisiológicos α 2-macroglobulina y TIMP-1 son capaces de inhibir la actividad enzimática de MMP-9 de forma muy eficiente. Además existen otras moléculas capaces de inhibir la actividad de MMP-9, como el fragmento endostatina, procedente de la proteólisis de colágeno XVII, la trombospondina-1 o la proteína RECK. Actualmente diversos inhibidores sintéticos están siendo probados en el tratamiento de múltiples enfermedades, como el mencionado Batimastat (BB-94), o Prinomastat (AG3340), tetraciclinas, o el prodominio de MMP-3 ⁽⁴¹⁾.

Tratamiento de la estenosis traqueal

Para el manejo de las ET se han utilizado procedimientos no quirúrgicos como la realización de dilataciones con globo, permeabilización con láser y colocación de distintos tipos de férulas intratraqueales (silastic o metálicas expandibles), pero estos han sido solamente de tipo paliativo porque provocan reestenosis. ^(61,62) Actualmente el estándar de oro continúa siendo la traqueoplastia con anastomosis término-terminal; sin embargo tampoco ha sido 100% efectiva, ya que puede presentarse de un 5%-20% de reestenosis postquirúrgica ^(19, 63, 64).

El motivo del mal funcionamiento de estos tratamientos es porque también provocan daño a la mucosa, inflamación y desarrollo de tejido de granulación; por esta razón en conjunto con estos procedimientos se ha intentado la aplicación de moduladores de la cicatrización como la mitomicina C (MC), para manipular farmacológicamente la formación de la nueva MEC y evitar la reestenosis.

La mitomicina C (MC) 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 la cicatriz. (Figura 2) 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 ^(65,66). También se ha utilizado para disminuir las estenosis traqueales; sin embargo su uso en la tráquea no ha tenido el éxito deseado debido a que retarda la cicatrización, predispone a la acumulación aguda de moco, produce defectos en la revascularización de la

mucosa y no se ha observado que evite la reestenosis ^(22, 67-70), por lo que hay que buscar otros fármacos que mejoren la cicatrización traqueal y eviten la reestenosis.

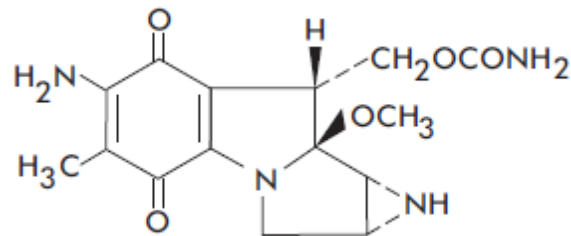


Figura 2. Estructura química de MC

Se ha demostrado en piel que el uso de moduladores de la cicatrización equilibra la actividad de las proteasas y mejora la cicatrización, por lo que se podría pensar que el uso de alguna de estas drogas en la tráquea posiblemente evite las estenosis traqueales.

En la literatura se ha descrito que el ácido hialurónico (AH) ^(71, 72) y la colágena polivinil pirrolidona (CPVP) ^(73, 74) mejoran la calidad de la cicatrices en varios tejidos.

El AH está compuesto por unidades alternantes de ácido D-glucorónico y N-acetil glucosamina. (Figura 3) Es un componente de la matriz extracelular de la herida fetal, que durante la fase temprana de curación de las heridas favorece la proliferación, regeneración y reparación tisular disminuyendo la inflamación y la fibrosis.

Estas propiedades del AH tienen implicaciones clínicas de importancia ya que ha sido posible modular la curación de las heridas mediante la aplicación de forma exógena obteniéndose buenos resultados para prevenir la formación de adherencias intrabdominales postquirúrgicas, la disminución de procesos

fibróticos en el tratamiento de la osteocondritis de rodilla, regeneración de las heridas de la mucosa nasal. También se ha observado en estudios experimentales que este medicamento evita las estenosis traqueales. (62, 72, 75, 76, 77)

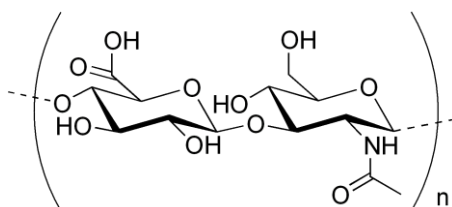


Figura 3. Estructura química del AH

La CPVP está formado por una mezcla de colágena porcina de tipo I irradiada con rayos gamma y polivinil-pirrolidona, que ha mostrado actividad fibrinolítica al inhibir la expresión de moléculas de adhesión (ELAM-1, VCAM-1) así como de citocinas proinflamatorias y fibrogénicas (IL-1 β , TNF- α , TGF-1 β y PDGF-AB).⁽⁷⁸⁾ Este fármaco se ha utilizado con éxito en dermatología y cirugía plástica para el tratamiento de las cicatrices queloides e hipertróficas, en fibrosis dérmicas y de tendones, produciendo disminución del volumen de la cicatriz. También desaparece el infiltrado inflamatorio y restablece la arquitectura dérmica normal de las cicatrices tratadas con ésta ⁽⁷³⁾.

De forma experimental se ha observado que su aplicación después de una traqueoplastía 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 ^(21, 62, 79, 80).

Además disminuyen las adherencias intrabdominales⁽⁸¹⁾ y favorece la cicatrización de la membrana timpánica ⁽⁸²⁾.

Aunque en la literatura se ha reportado que tanto el AH como la 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 de proteasas de la MEC durante la cicatrización traqueal; es por lo que en este estudio se valoró el efecto de la aplicación de estos fármacos después de realizar una resección traqueal y anastomosis termino-terminal del segmento resecado sobre la expresión in situ de la MMP-1 y MMP-9 en la cicatriz formada, ya que en piel se ha reportado que la cantidad de MMPs activas juegan un papel importante en la presentación de cicatrices patológicas (83- 85).

JUSTIFICACIÓN

La estenosis traqueal es una patología que compromete la vida de los pacientes debido a que obstruye la vía aérea. Es producto de una cicatriz fibrótica en la que se prolonga la inflamación y se incrementa la síntesis de colágena en la MEC por alteraciones en la producción metaloproteinasas; por lo que se puede pensar que el uso de moduladores de la cicatrización posttraqueoplastía podría evitar la presencia de estas. El ácido hialúronico (AH) y la colágena polivinil pirrolidona (CPVP) son moduladores de la cicatrización que en varios tejidos han mostrado que disminuyen y previenen la fibrosis; sin embargo el efecto de su combinación postcirugía traqueal sobre la expresión de las MMP-1 y MMP-9, las cuales mantienen el balance en la producción de colágena tipo I, II y III, e interfieren sobre la inflamación y la remodelación de la MEC, respectivamente, aún no se ha descrito.

HIPÓTESIS

El AH y la CPVP son fármacos que por sí solos previenen y disminuyen las fibrosis de diferentes tejidos; entonces, su combinación y aplicación en la cirugía traqueal, incrementará la expresión de MMP-1, así como la MMP-9 y, disminuirá la inflamación y la deposición de colágena en la cicatriz traqueal postraqueoplastia.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los cambios endoscópicos, macroscópicos, microscópicos, bioquímicos y la expresión *in situ* de las MMP-1 y MMP-9 en la cicatriz de la anastomosis traqueal postraqueoplastia tratada tópicamente con la mezcla AH-CPVP en perros.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los cambios traqueoscópicos después de la aplicación tópica de la mezcla de AH-CPVP en la anastomosis traqueal postraqueoplastia en perros.
- Valorar los cambios macroscópicos después de la aplicación tópica de la mezcla de AH-CPVP en la anastomosis traqueal postraqueoplastia en perros.
- Evaluar la inflamación y forma en la que se dispone la colágena microscópicamente después de la aplicación tópica de la mezcla de AH-CPVP en la anastomosis traqueal postraqueoplastia en perros.
- Determinar la cantidad de colágena por gramo de tejido postraqueoplastia después de la aplicación tópica de la mezcla de AH-CPVP en la anastomosis traqueal postraqueoplastia en perros.

- Determinar inmunohistoquímicamente la expresión *in situ* de las MMP-1 y MMP-9 postraqueoplastía después de la aplicación tópica de la mezcla de AH-CPVP en la anastomosis traqueal postraqueoplastía en perros.

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 ⁽⁸⁶⁾ y de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos ⁽⁸⁷⁾.

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 realizara 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 presentó signos clínicos de cualquier patología que no fuera provocada por el procedimiento quirúrgico, fue eliminado.

Criterios de terminación

Todo animal que mostró 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): Traqueoplastía cervical con aplicación intraluminal de solución salina fisiológica (SSF).

Grupo II (n=6): Traqueoplastía cervical tratada con aplicación intraluminal de AH.

Grupo III (n=6): Traqueoplastía cervical tratada con CPVP.

Grupo IV (n=6): Traqueoplastía cervical tratada con AH-CPVP.

Grupo V (n=6): Traqueoplastía cervical tratada con MC.

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.

Técnica quirúrgica

Los perros fueron sometidos a anestesia con acepromacina (Calmivet[®], Vetoquinol S. A. México D. F.) a dosis de 0.2 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% ⁽⁸⁸⁾ (Figura 4A).

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 (Figura 4B y C) y se le resecaron tres anillos (3^o, 4^o y 5^o anillo) (Figura 4D), se realizó la anastomosis término terminal con polidioxanona de 3 ceros (PDS, Ethicon[®], New Jersey USA) con surgete simple en la porción membranosa (Figura 4E) y puntos simples separados en la cartilaginosa (Figura 4F). Finalmente se continuó con el cierre convencional. A todos los animales se les administró antes de la cirugía y durante 5 días enrofloxacina (5 mg/Kg) (Baytril[®], Bayer, Leverkusen, Germany) intramuscular (IM), ácido tolfenámico (2 mg/Kg) (Tolfedine[®], Vetoquinol, Lure Cedex, Francia) IM y tramadol (Tradol[®], Grünenthal, D.F., México) (2mg/kg IM), como analgésico ⁽⁸⁹⁾.

Todas las cirugías fueron realizadas por el mismo equipo quirúrgico.

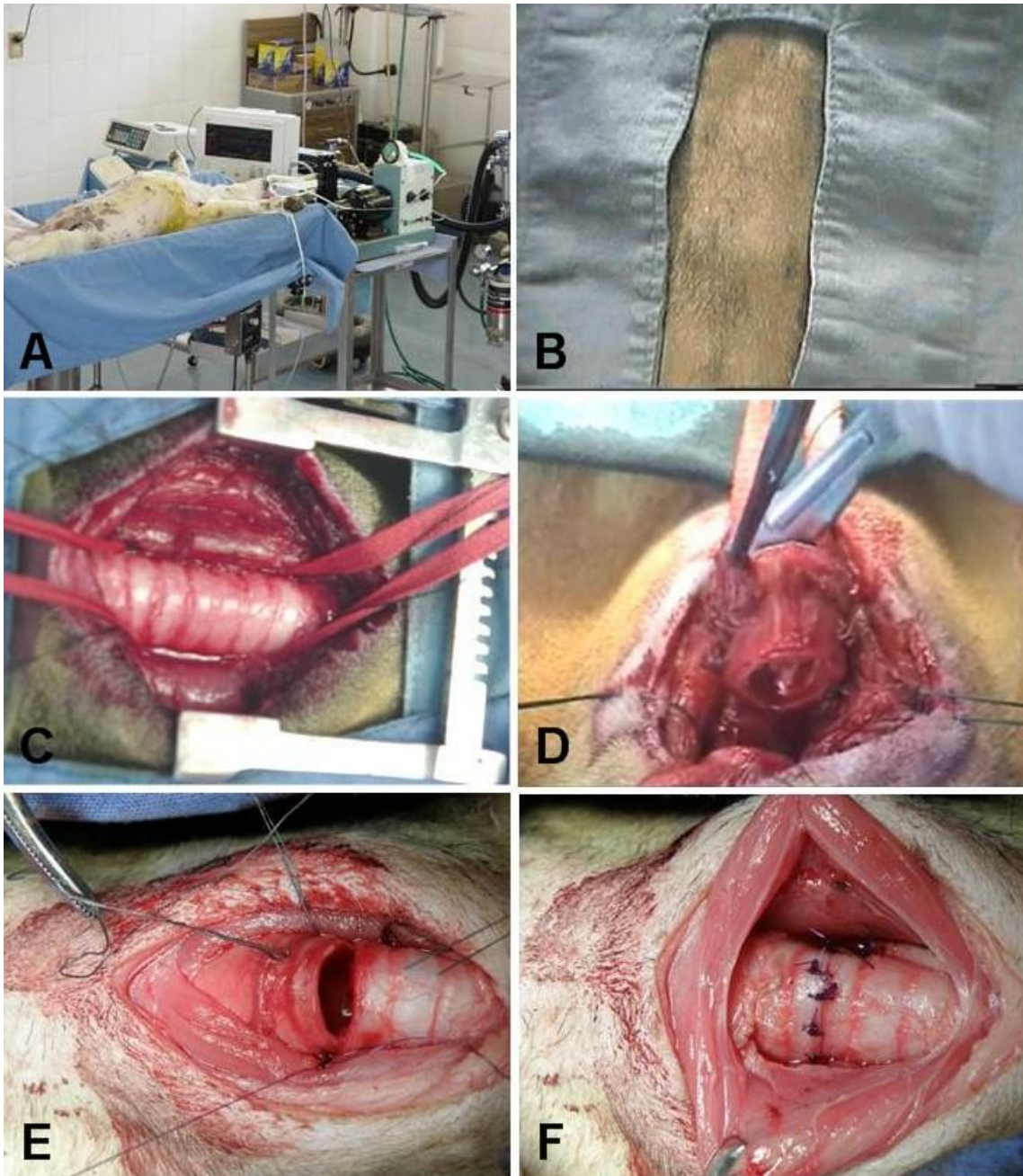


Figura 4. Fotografías que muestran la técnica quirúrgica realizada en los animales sometidos a estudio. A) animal conectado al equipo de anestesia inhalada. B) delimitación de la zona quirúrgica. C) disección de la circunferencia de la tráquea. D) resección de anillos traqueales. E) sutura de la porción membranosa de la tráquea. F) Fin de la traqueoplastía.

Tratamiento

Para la aplicación del tratamiento en los grupos I, II, III y IV, los animales se sometieron a anestesia general y mediante traqueoscopia se aplicó el tratamiento en el sitio de la anastomosis (Figura 5). En el grupo I se instilaron 3 mililitros de solución fisiológica. En el grupo II 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) ⁽⁶²⁾. 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 SS ⁽²¹⁾. En el grupo IV la 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 ^(67, 90).



Figura 5. Muestra la aplicación del tratamiento en un animal del grupo IV.

Evaluación

Clinica

Los animales se estudiaron por 4 semanas y 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.

Endoscópica

En todos los animales se llevó a cabo evaluación endoscópica de la tráquea (traqueoscópica) antes de la cirugía, cada tercer día durante las 2 primeras semanas poscirugía y cada semana el tiempo restante del estudio. En esta se evaluó el estado de la anastomosis, inflamación y la presencia de fístulas o estenosis. Cuando esta última se presentó, el grado fue evaluado de acuerdo a

la escala descrita por Cotton ⁽¹³⁾, la cual se basa en la severidad de esta: Grado 1 = 0 – 50 % estenosis, Grado 2 = 51 – 70 %. Grado 3 = 71 - 99 % y Grado 4 = Luz no detectable.

Macroscópica

Al concluir el estudio todos los animales fueron sometidos a eutanasia con sobredosis de pentobarbital sódico (Anestosal[®], Pfizer S.A. de C.V. Guadalajara, México) ⁽⁹¹⁾ y se evaluó macroscópicamente el tipo de cicatriz intraluminal y extraluminal formada en la anastomosis, presencia de dehiscencia, infección y la formación de fístulas. Posteriormente se retiró el segmento anastomosado y una porción de la parte membranosa 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 MMP-1 y MMP-9.

Microscópica

Para la evaluación microscópica se tomaron muestras del sitio de la anastomosis, las cuales se fijaron en formaldehído al 10% y a las 24 horas se incluyeron en parafina, se les realizaron cortes de 4 μ , se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson; se 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 llevó a cabo en toda la circunferencia de la muestra mediante una escala semicuantitativa descrita por Veiga ⁽⁹²⁾, 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 la MMPs 1 y 9 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 μ , se montaron en laminillas silanizadas, se desparafinaron durante 20 minutos a 80°C, se deshidrataron en xilol por 5 minutos y 1 en alcohol, 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 al aire ambiente 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 por 10 min, se lavó 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-MMP1 abcam ab38929, Anti-MMP9 abcam ab38898, diluidos en buffer (suero bloqueador) respectivamente, 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 biotilado 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 valoración de la expresión de MMps se realizó evaluando el grado de intensidad y proporción de la marca de toda la circunferencia de la muestra mediante una escala semicuantitativa en la que a cada parámetro evaluado se le asignó un porcentaje de acuerdo a la severidad de los cambios histológicos (ausente 0-10%, leve 11-25%, moderado 26-50% y severo 51-100%). La evaluación microscópica fue realizada en forma ciega por dos observadores, quienes revisaron 2 veces las laminillas.

Bioquímica

Para la evaluación bioquímica se tomó una muestra durante la cirugía (muestra control) y la otra al final del estudio. En esta se determinó la concentración de hidroxiprolina por gramo de tejido traqueal, mediante el método de Woessner.^(93,94) 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) por 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 aforó 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 μ l 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 paradimetilaminobenzaldehido (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 se realizó mediante las pruebas de ANDEVA, Dunnet y Tukey. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

RESULTADOS

Todos los animales sobrevivieron al procedimiento quirúrgico y al tiempo de estudio establecido.

Hallazgos clínicos

En el grupo I, 3 (50%) animales presentaron estridor al ladrido a la segunda semana postcirugía, sin que éste afectara su ventilación. En los otros grupos no presentaron diferencias clínicas importantes.

Hallazgos traqueoscópicos

Traqueoscópicamente todas las anastomosis cicatrizaron al concluir la primera semana postcirugía (Figura 6). Sin embargo; todos los animales tratados con SS (grupo I) y V (grupo V), la mucosa traqueal se observó edematosa e hiperémica durante las 2 primeras semanas del estudio, pero esto desapareció en la tercera semana, con excepción de 1 perro del grupo I en el que la mucosa traqueal se mantuvo así hasta el final del estudio. En los grupos II y III la mucosa se observó de esta manera los primeros 5 días y durante los primeros 3 días en el grupo IV, en todos los perros de estos 3 grupos la tráquea se observó de apariencia normal a la segunda semana postraqueoplastía. Tres de los animales tratados con SS (grupo I) desarrollaron estenosis grado I, 2 de ellos en la segunda postcirugía y el restante en la tercera, las cuales permanecieron hasta el final del estudio. En el grupo II, solo en 1 perro se observó estenosis grado I. En los grupos III, IV y V, ningún animal presentó estenosis. Al comparar entre grupos, el grado de estenosis e inflamación mostrada por el grupo I fue superior a la de los otros grupos de estudio (Kruskall-Wallis $p < 0.05$) (Figura 6).

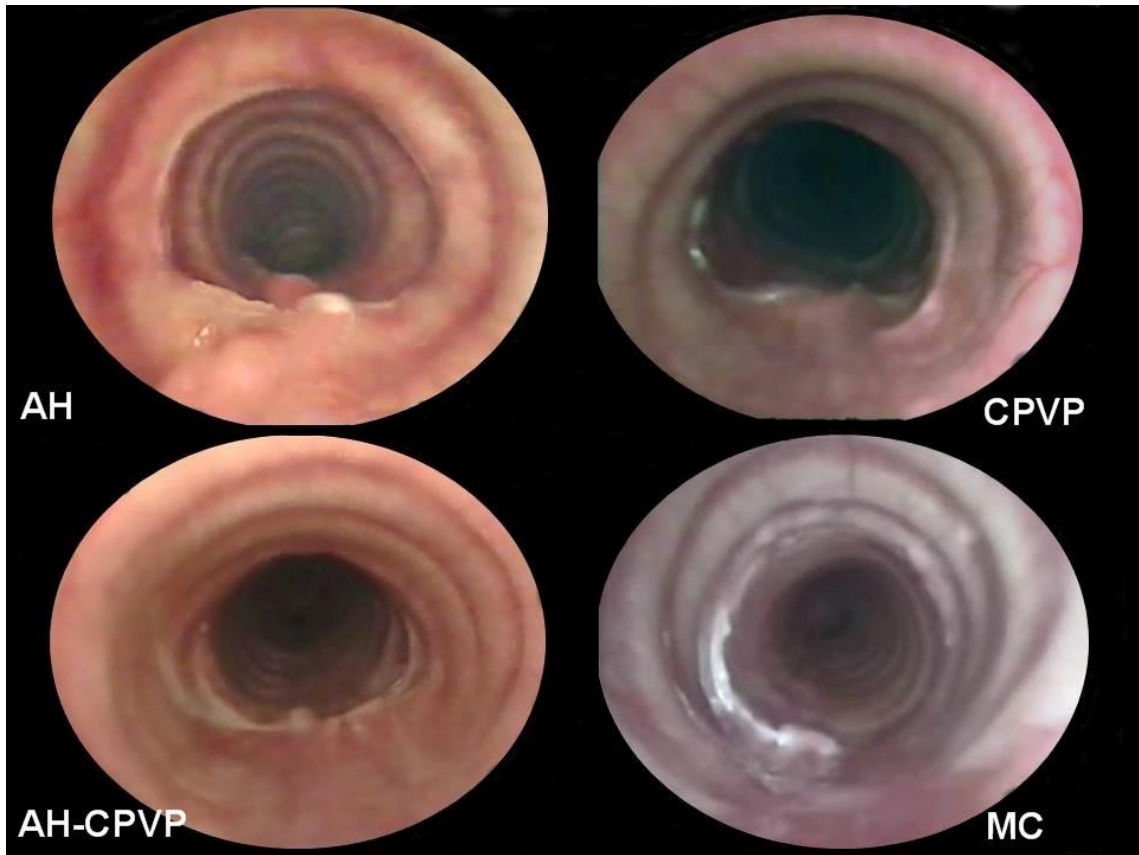


Figura 6. Traqueoscopia realizada al final del estudio que muestra el estado de la cicatriz en los grupos II (AH), III (CPVP), IV (AH-CPVP) y V (MC).

Hallazgos Macroscópicos

Durante todo el estudio, ningún perro presentó dehiscencia, infección o fístulas. En todos los casos, al final del estudio la anastomosis se observó bien cicatrizada. Todos los animales del grupo I desarrollaron abundante tejido fibroso tanto en la mucosa como en la porción externa de la tráquea en el sitio de la anastomosis y asimismo desarrollaron adherencias con los músculos cervicales. En los otros 4 grupos, la mucosa se observó con fibrosis leve y con vasos de neoformación con excepción del grupo V (MC) que no mostró esta

neovascularización; así mismo la porción externa de estas anastomosis desarrollo fibrosis leve. Cabe mencionar que a la palpación en el sitio de la anastomosis traqueal en los perros tratados con la mezcla (grupo IV), esta mostró consistencia firme y pérdida de la elasticidad (Fig. 7).

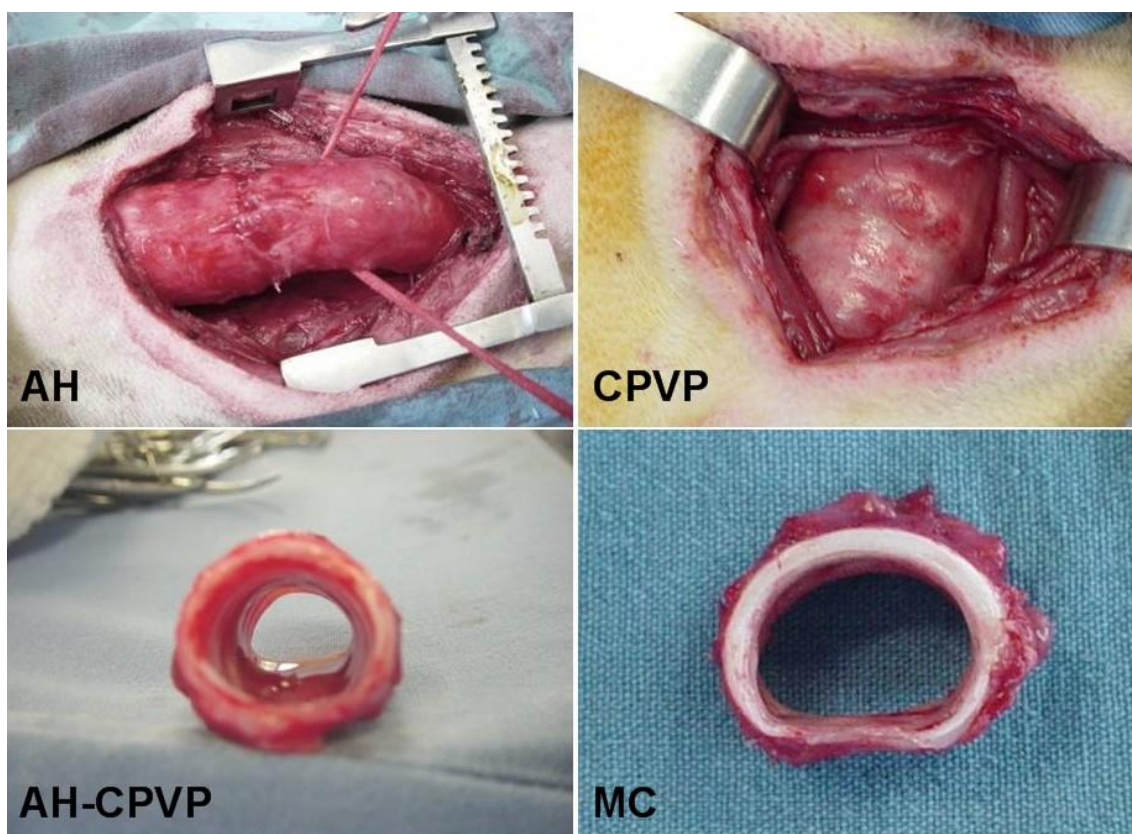


Figura 7. Muestra la cicatriz macroscópica en la porción externa de la tráquea en los grupos de Ah y CPVP, así como la interna en los de la mezcla AH-CPVP y MC.

Hallazgos Microscópicos

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.

En todos los animales del grupo I, la microscopía de luz reveló la presencia de fibrosis severa, con neoformación de fibras de colágena gruesas y desordenadas, así como moderada neovascularización. También 2 animales desarrollaron inflamación leve a base de linfocitos en la lámina propia, y en 4 animales la inflamación fue severa en todas las capas de la tráquea. Además estos 4 perros mostraron presencia de células gigantes a cuerpo extraño en la zona de las suturas.

Los animales del grupo tratado con AH (grupo II), 5 perros (83.4%) presentaron neoformación moderada de fibras de colágena densa, delgada y bien organizada, fibras elásticas y moderada neovascularización, con inflamación leve en la submucosa y lámina propia de la tráquea; mientras que el animal restante de este grupo presentó infiltrado linfocitario severo en todas las capas de la tráquea, con reacción granulomatosa al material de sutura y formación severa de nuevas fibras de colágena gruesas y desordenadas (Figura 8 A).

Los 6 animales del grupo III (CPVP) desarrollaron moderada neoformación de fibras de colágena gruesas, bien organizadas y moderada neovascularización, con inflamación leve; sin embargo 2 de estos animales mostraron reacción inflamatoria a base de linfocitos en la lámina propia (Figura 8 B).

Todos los animales tratados con la mezcla AH-CPVP, presentaron neoformación moderada de fibras de colágena delgadas, bien organizadas, así como fibras elásticas y leve neovascularización. En 5 animales se observó inflamación leve y en 1 (16.6%) la inflamación fue moderada en todas las capas de la tráquea (Figura 8 C).

En el grupo V, los 6 animales desarrollaron en su cicatriz moderada neoformación de fibras de colágena, delgadas, bien organizadas; así como leve neovascularización y en todos los casos se observó inflamación moderada a base de linfocitos (Figura 8 D).

Al comparar el grado de fibrosis solo se observó que aquella desarrollada por el grupo I fue importante en comparación con los otros grupos de estudio ($p < 0,001$ ANDEVA, Tukey).

Al comparar el espesor delgado 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)

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).

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

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

Al comparar entre grupos la menor neovascularización presentada por el grupo V fue significativo en comparación con los otros grupos de estudio ($p < 0.001$ ANDEVA, Tukey).

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

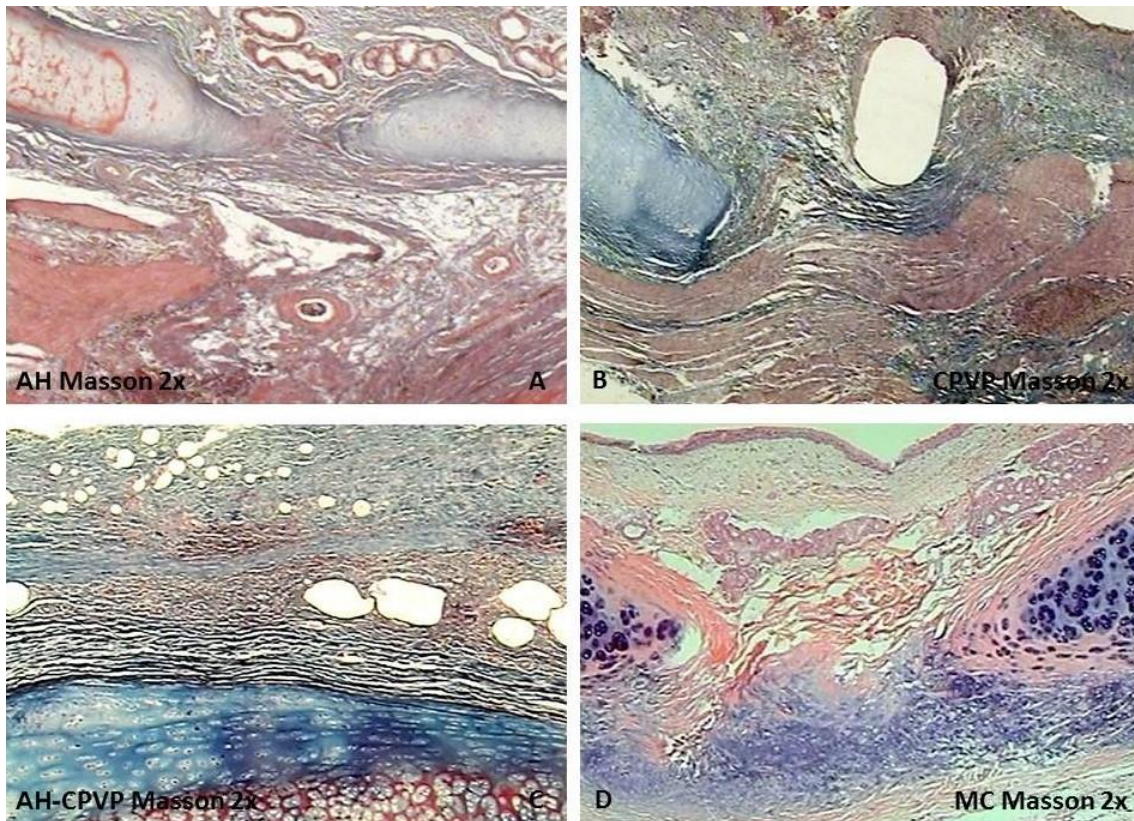
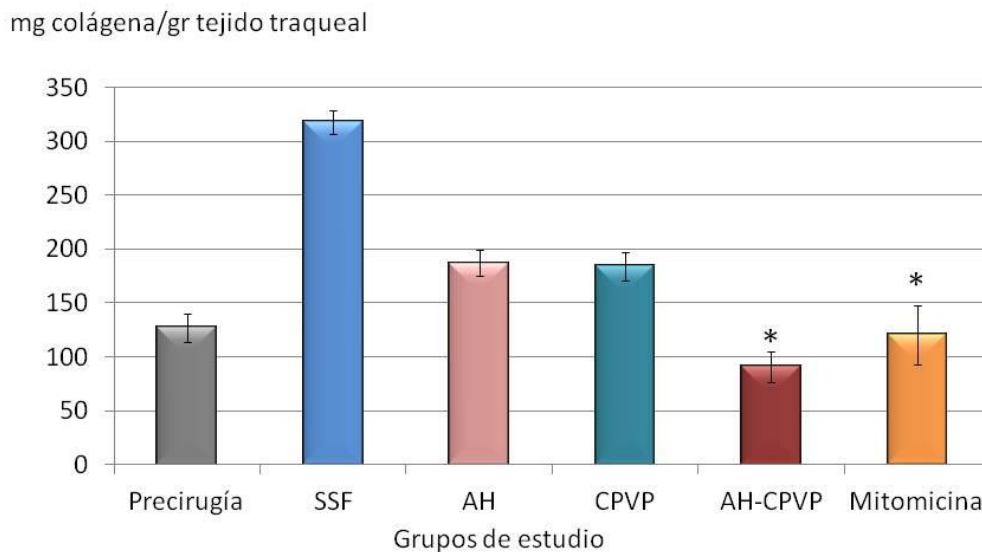


Figura 8. Micrografías (Masson 2x). Examen histológico de un animal de cada grupo, que muestran la tráquea cicatrizada caracterizada por fibras de colágena bien organizadas, leve a moderado infiltrado inflamatorio y vasos de neoformación. (A) grupo II, (B) grupo III, (C) grupo IV y (D) grupo V.

Hallazgos Bioquímicos

Bioquímicamente, la cuantificación de la colágena por el método de Woessner mostró que los animales de los grupos IV y V desarrollaron una cantidad similar de mg de colágena por gr de tejido traqueal que los anillos controles, pero menor que la de los grupos I, II y III. Sin embargo esta menor formación de colágena solo fue significativa en comparación con el grupo I ($p < 0.001$ ANDEVA, $p < 0.01$ Tukey) (Figura 9).

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



$\bar{X} \pm EE$

* $p < 0.01$ ANDEVA, Dunnett, Tukey

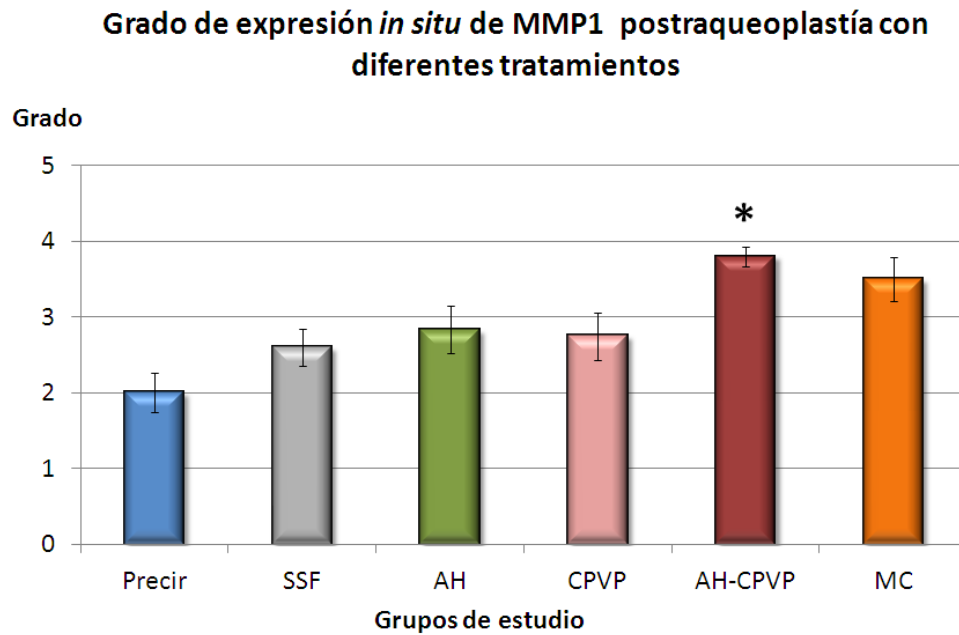
Figura 9. Deposición de colágena en el tejido traqueal antes y después de la traqueoplastía en todos los grupos de estudio.

Hallazgos inmunohistoquímicos

En todos los grupos se observó incremento la expresión *in situ* de MMP1 después de tratamiento en comparación con los anillos precirugía.

Los 6 animales de los grupos I, II y III expresaron de forma moderada (50-75% de la anastomosis traqueal) MMP1, con intensidad de expresión también moderada; mientras que en todos los animales de los IV y V la expresión fue severa (76-100% de la traqueoplastía), pero de intensidad moderada. Al comparar el grado de expresión mostrado por los grupos IV y V fue significativa en comparación con los anillos controles ($p = 0.01$ ANDEVA, Dunnett) y solo la

mostrada por el grupo IV fue significativa en comparación con los grupos I, II, y III ($p= 0.01$ ANDEVA, Tukey). Al valorar la intensidad de expresión no fue significativa ($p= 0.08$ ANDEVA). (Figuras 10 y 11).



$\bar{X} \pm EE$

* $p = 0.01$ ANDEVA, Dunnett, Tukey

Figura 10 Muestra el grado de expresión *in situ* de la MMP 1 al final del estudio en todos los grupos.

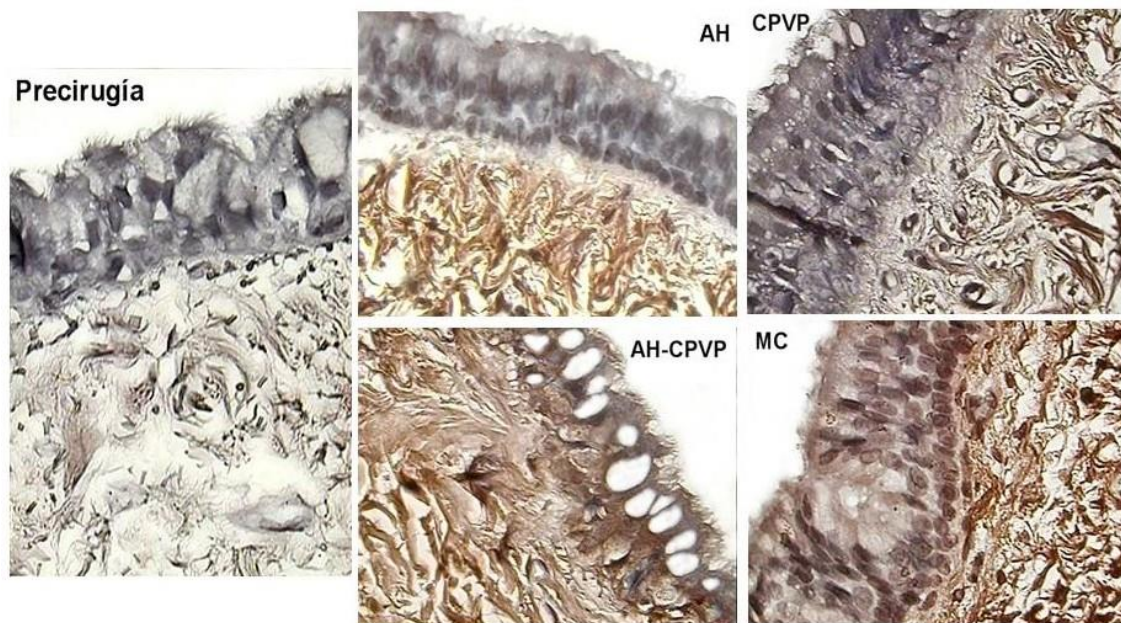
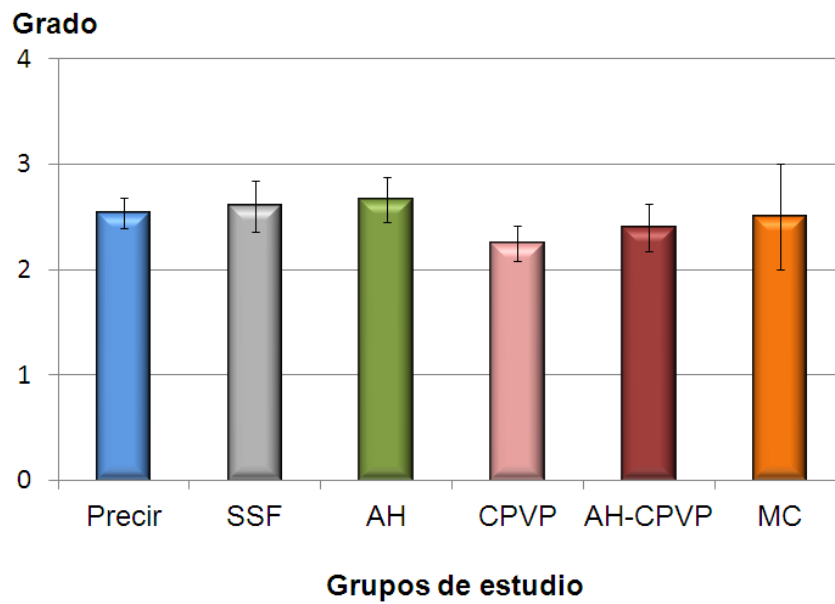


Figura 11. Micrografía IHC (40x) de tejido traqueal en un animal de cada grupo. Muestra la expresión *in situ* de MMP-1 en los grupos de AH y CPVP en el inmunomarcaje (marrón) moderada. Mientras que el inmunomarcaje marrón muestra la expresión severa de MMP-1 en los animales tratados con la mezcla de AH-CPVP y MC.

En todos los grupos, el grado de expresión *in situ* y de intensidad de la MMP9 fue moderada (26-50% del tejido anastomosado) ($p > 0.05$ ANDEVA) (Figuras 12 y 13).

Grado de expresión *in situ* de MMP9 postraqueoplastia con diferentes tratamientos



$\bar{X} \pm EE$
 $p = 0.815$ ANDEVA

Figura 12. Se observa en grado de expresión *in situ* de la MMP-9 después de tratar la traqueoplastias con diferentes moduladores de la cicatrización.

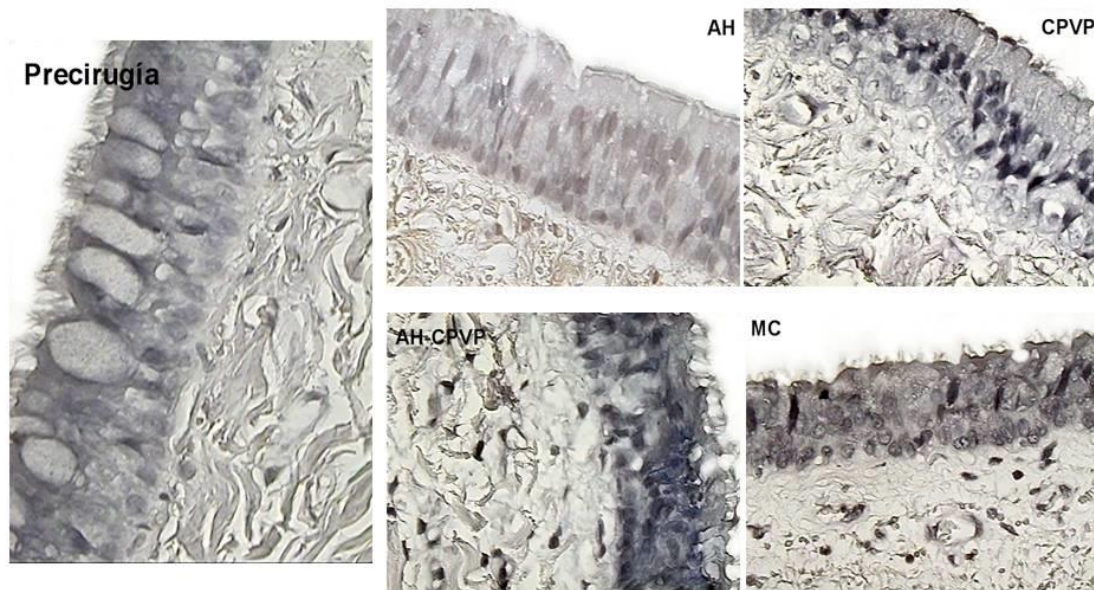


Figura 13. Micrografía IHC (40x) de tejido traqueal en un animal de cada grupo, en la que se observa la leve expresión *in situ* de MMP-9 con inmunomarcaje marrón en todos los grupos de estudio.

DISCUSIÓN

La ET es una patología provocada por una fibrosis desproporcionada que obstruye la luz traqueal e impide la circulación de aire en ambos sentidos, generalmente se forma después de una intubación prolongada o cirugía, que durante su cicatrización presenta una remodelación inadecuada por una exageración en el tiempo de su proceso inflamatorio, expresión inapropiada de quimiocinas y moléculas de adhesión, así como a la expresión y regulación descoordinada de varias metaloproteinasas (MMPs) como la MMP-1 y la MMP-9 que juegan un papel importante en la presentación de procesos fibróticos debido a que mantienen el balance en la producción de colágena tipo I, II y III,

e interfieren sobre la inflamación y la remodelación de la MEC (respectivamente) ^(41, 50, 95, 96, 97)

El tratamiento de las ET se lleva a cabo con procedimientos endoscópicos y quirúrgicos combinado con la aplicación de moduladores de la cicatrización, con el propósito de manipular farmacológicamente de manera temprana la formación de la nueva MEC, para evitar la reestenosis después de haberse tratado físicamente; 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. ⁽²¹⁾

El AH y la CPVP son moduladores de la cicatrización que cuando son utilizados tópicamente en trastornos fibróticos locales modifican la respuesta inflamatoria aguda y crónica. ^(78, 82, 98) Estos fármacos, en tráquea han demostrado que disminuyen la cantidad de colágena por gramo de tejido traqueal postraqueoplastía; ^(31, 62) no obstante, no se ha reportado su efecto y el de su mezcla sobre la expresión de las MMP-1, MMP-9 y deposición de colágena en las cicatrices postraqueoplastía.

En este trabajo se observó por endoscopia que la menor inflamación mostrada en la primera semana postcirugía en los animales tratados con AH, CPVP y la mezcla AH+CPVP (II, III, IV), probablemente fue ocasionada porque el AH favorece la proliferación de células que producen un infiltrado inflamatorio mononuclear, que disminuye el proceso inflamatorio agudo, local y periférico. ^(21, 62, 71, 72, 99, 100) Además porque la CPVP inhibe la producción de citocinas proinflamatorias y fibrogénicas como se ha descrito en otros estudios de cicatrización traqueal ⁽²¹⁾ y en otros tejidos realizados por Rodríguez ⁽⁷³⁾ Suárez

(101) Krötzsch (78) Cervantes (81) y Furuzawa. (102) Por otro lado, en los perros tratados con SSF y MC, se encontró la mucosa edematizada por dos semanas, debido a que este fármaco no tiene efecto antiinflamatorio. (103) Nuestras observaciones coinciden con las reportadas por otros autores (22, 104, 105), que han realizado estudios clínicos y experimentales sobre la aplicación de la MC y han descrito que este fármaco produce inhibición de la revascularización, irritación del sitio lesionado, acumulación de *dehritus* fibrinoides, tejido de granulación y necrosis del cartílago traqueal expuesto, así como pérdida del soporte traqueal.

La presencia macroscópica de cicatrices menos fibróticas en los grupos II, III, IV y V fue ocasionada porque el AH promueve la formación de menor cantidad de células y bloquea directamente la función de los fibroblastos, disminuyendo la producción de colágena y con esto evita la formación de cicatrices fibróticas. (21, 24, 106, 107) Mientras que la CPVP tiene actividad fibrinolítica e inhibe la expresión del TGF- β 1. (73, 78, 81,101) En el grupo IV se presentó porque probablemente se hizo sinergia entre ambos fármacos y uno bloqueó la respuesta inflamatoria aguda y el otro la crónica; sin embargo podría proponerse la hipótesis de que la consistencia firme del sitio de la anastomosis a la palpación externa mostrada por estos animales fue provocada porque la mezcla de estos fármacos permite el desarrollo de colágena, pero posiblemente influye en la expresión de algunas MMPs que interfieren en la producción de otros componentes de la MEC como la elastina y la fibronectina, lo cual ocasiona 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 este hallazgo como lo observó Lee et al quien

estudio la pérdida de las propiedades elásticas en el conducto nasolagrimal con el uso de MC.⁽¹⁰⁸⁾ Los animales tratados con MC mostraron menos fibrosis debido a que este fármaco provoca apoptosis de los fibroblastos y una disminución en la proliferación de los mismos, así como la producción de colágena.^(103, 109, 110)

Microscópicamente, el grupo IV (AH-CPVP) mostró leve infiltrado linfocitario, probablemente por el control inflamatorio que proporciona la combinación de éstos fármacos, e inhibe tanto el infiltrado agudo como el crónico y por lo tanto disminuyen la quimiotaxis y estimulación de los linfocitos, ya que es conocido que durante el proceso de cicatrización los linfocitos producen linfocinas y factores de crecimiento que estimulan a los fibroblastos a la producción de colágena.^(24, 62, 111, 112, 113) Estos hallazgos nos podrían hacer suponer que esta mezcla tiene un efecto benéfico durante la fase de fibroplasias durante la cicatrización.

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 donde el material de sutura utilizado durante la anastomosis traqueal provocó la fusión de los macrófagos y al digerirlo dieron lugar a la formación de las células gigantes.⁽⁶²⁾

En los grupos tratados con AH, CPVP y de la mezcla (II, III y IV) se desarrollaron fibras de colágena bien organizadas debido a que estos fármacos ordenan y adelgazan las fibras de colágena restableciendo la arquitectura normal del tejido traqueal porque durante el proceso de cicatrización disminuyen la inflamación y la producción de colágena. En tanto que la MC, no se sabe exactamente el mecanismo por el cual disminuye la fibrosis aunque

algunos autores mencionan que la actividad antifibroblástica se debe a la disminución de la actividad de los fibroblastos mediada por apoptosis. Además se sugiere que puede tener un efecto similar a la de los agentes alquilosantes, ya que produce uniones cruzadas de DNA e inhibe la síntesis de RNA, de colágena y de linfocitos que pueden producir factores inflamatorios tales como interleucinas, factores transformadores del crecimiento, tromboxanos y MMP, entre otros. ^(114, 115)

Por otro lado la formación de vasos sanguíneos en estos grupos probablemente fue originada porque las MMPs intervienen en las interacciones endoteliales célula-matriz y en conjunto con factores de crecimiento como el VEGF que controlan la angiogénesis.

La evaluación bioquímica mostró que tanto la CPVP, la mezcla AH-CPVP y la MC 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 estos fármacos disminuye la inflamación, formación de fibras de colágena y estimulan la producción de MMPs, lo cual posiblemente influyó sobre la cantidad de esta en la MEC y en la cicatriz traqueal ^(116, 117, 118, 119, 120)

En todos los grupos se observó leve expresión *in situ* de MMP-1 en los anillos precirugía porque al igual que diversas MMPs, en condiciones normales su expresión es muy baja en muchas células.^(40, 50) Esta colagenasa también se expresó *in situ* en todos los grupos posterior al tratamiento, probablemente porque esta MMP es expresada por los fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales vasculares ⁽¹²¹⁾ después de ser estimuladas por los componentes del infiltrado inflamatorio (neutrófilos, células B, y otros) durante la

remodelación fisiológica y patológica de los tejidos ^(49,50,95) principalmente durante la fase postaguda de la cicatrización⁽¹²²⁾ con el fin de permitir la migración y proliferación celular, por la unión a la integrina $\alpha 2\beta 1$ y la colágena tipo I. ^(50, 123) Además en la fase de remodelación de los tejidos la MMP-1 participa en la inversión de la relación colágeno tipo I/III por la degradación de la colágena y la eliminación del tejido de granulación. ⁽¹²²⁾

La moderada expresión *in situ* de MMP-1 en el grupo tratado con AH, fue ocasionada porque este fármaco ejerce un efecto sobre la fase temprana de la inflamación ya que inhibe la proliferación, migración y fagocitosis leucocitaria y altera la expresión de la IL-1 y TGF- β , que son citocinas que inducen la expresión y la activación de la MMP-1, además incrementa la expresión del inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1) y estimula la síntesis de ácido hialurónico endógeno e inhibe la prostaglandina E2 (PGE2) como lo describieron varios autores que estudiaron el papel de AH en la osteoartritis ^(124, 125,126) y varios tejidos. ⁽¹²⁷⁾ También la expresión moderada de MMP-1 en este grupo de estudio probablemente fue ocasionada porque el AH que bloquea directamente la función de los fibroblastos ^(21,23, 107) y reduce la actividad del TGF β 1 al disminuir las vías de señalización de TGF- β 1 a sus receptores como lo describió Chen y Thibeault ⁽¹²⁸⁾ al estudiar la respuesta de los fibroblastos al TGF β 1 en hidrogeles de ácido hialurónico. Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio no coinciden con los encontrados por Monfort *et al*⁽¹²⁹⁾ quienes evaluaron la síntesis de MMP-1 en condrocitos incubados en presencia de IL-1 y observaron que la IL-1 no afecta la expresión de la proteasa.

La moderada expresión *in situ* de MMP-1 en el grupo tratado con CPVP fue ocasionada porque este biofármaco disminuye la actividad colagenolítica debido a que altera el proceso inflamatorio crónico con lo que disminuye la expresión IL-1 β , TNF α , TGF β 1 que son citocinas que inducen la expresión y la activación de la MMP-1, además incrementa la expresión del inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1), disminuye la acumulación de fibras de colágena tipo I e induce la recuperación de colágeno tipo III en niveles similares a los detectados en el tejido normal, lo cual contribuye a reestablecer la arquitectura normal del tejido ya que también modula el cambio de colágena tipo III a I, como lo describió Furuzawa *et al* ⁽¹³⁰⁾ al estudiar el efecto de la aplicación intramuscular de esta droga en pacientes con artritis reumatoide y observó que la CPVP reestablece la arquitectura del tejido similar a la observada en la membrana sinovial normal. En la literatura no existen otros estudios que corroboren esto; sin embargo, nuestros resultados se correlacionan con lo observado por este autor ya que en las anastomosis traqueales tratadas con este biofármaco, se observó menor inflamación traqueoscópica, macroscópica, microscópica y moderada neoformación de colágena.

Por otro lado la severa expresión de MMP-1 en los animales tratados con la mezcla, quizá fue originada porque ambos fármacos modulan el proceso inflamatorio, lo cual disminuye la producción del TGF β 1, lo que favorece la producción de colágena tipo III, la expresión y la activación de la MMP-1, como lo observaron Chen y Thibeault ⁽¹²⁸⁾ y Furuzawa *et al* ⁽¹³⁰⁾ al estudiar la expresión de esta MMP en hidrogeles y en pacientes con artritis reumatoide, respectivamente.

La leve presencia de infiltrado inflamatorio en los grupos II, III y IV, fue ocasionado por que la MMP-1 degrada los quimioatrayentes de las células inmunes (incluyendo los monocitos) como lo describió Rahmani *et al* ⁽¹³¹⁾ al estudiar el efecto de la aplicación tópica de factores antifibrogénicos y anti-inflamatorios en un modelo de cicatrización de oreja en conejos y McQuibban *et al*, ⁽¹³²⁾ que estudiaron el efecto de la descomposición de las proteínas quimiotácticas de los monocitos por las MMPs y observó que esto disminuye la inflamación.

En la literatura se ha descrito que la MC al utilizarse tópicamente postcirugía, se une y forma enlaces cruzados con la guanidina del ADN de los fibroblastos y con esto evita la proliferación fibrosblástica y reduce la síntesis de colágena. ^(133, 134, 135) También se ha reportado que los fibroblastos expresan receptores para varias citocinas como el TGFβ1, que interviene en su reclutamiento, activación y proliferación durante la lesión, contracción del lecho de la herida, síntesis de la MEC, inhibición de las MMPs e incremento en los TIMPs, por lo que una excesiva producción de éste puede desarrollar una fibrosis. ^(23, 136,128) En la actualidad, no existen reportes acerca de los efectos de la MC sobre la expresión de la MMP-1 en la cicatrización de las heridas, pero con base en lo descrito se puede plantear la hipótesis que esta droga al alterar el ADN de los fibroblastos afecta la expresión de los receptores del TGFβ1 y esto provoca que se incremente la expresión de la MMP-1 como lo observamos en nuestro estudio después de tratar las anastomosis traqueales con esta droga.

La expresión *in situ* de la MMP-9 en todos los grupos de estudio fue ocasionada porque esta participa en varios de los procesos que ocurren durante la cicatrización de heridas, como la inflamación, remodelación de la

MEC, angiogénesis y la regeneración epitelial. ^(55, 56, 57, 58, 59) Durante la inflamación modulan la afluencia de leucocitos, ya sea a través de la regulación de la función de barrera, la actividad de citocinas y quimiocinas, o la degradación de las mismas. ^(137, 138) En la remodelación la MMP-9 acelera la fragmentación de todos los tipos de colágena desnaturalizada y los componentes de la membrana basal nativa. ^(139, 140) También participa en la migración y proliferación de las células del epitelio respiratorio que favorecen la reepitelialización (en el caso de la tráquea y bronquios) al facilitar el ensamble de los componentes de las uniones de contacto célula-célula y célula-matriz dentro del epitelio, como lo han reportado varios autores que han estudiado la regeneración epitelial en varios tejidos ^(50,54,95,138,140,141). En la angiogénesis la MMP-9 activa a las citocinas angiogénicas como TNF- α y VEGF, o mediante la generación de péptidos anti-angiogénicos de otras proteínas (endostatina de colágena XVIII) ^(142,143). También se ha reportado que la MMP-9 es esencial para la movilización de VEGF a partir de la matriz extracelular ⁽¹⁴⁴⁾. Nuestros hallazgos no coinciden con lo descrito por Mohan et al ⁽¹⁴⁰⁾ ya que en este estudio se observó la expresión de MMP-9 en los anillos traqueales precirugía y cuando estudiaron los efectos de esta metaloproteinasa en la regeneración epitelial mencionan que en la tráquea sana no hay expresión de MMP-9. En nuestro estudio, en todos los casos se observó una cicatrización normal de la herida quirúrgica a las 4 semanas y la presencia de esta MMP posiblemente se presentó porque aún había reacción inflamatoria y estos hallazgos no concuerdan con lo descrito por Mackelfresh et al ⁽¹⁴⁵⁾ Kumar *et al* ⁽¹⁴⁶⁾ y Pierce⁽¹⁴⁷⁾ quienes estudiaron la fisiopatología de las heridas crónicas y mencionan que las heridas con cicatrización normal presentan un pico de

expresión de MMP-9 en las primeras 24 horas después de la lesión y su nivel empieza a disminuir a las 48 horas de producirse el daño. Sin embargo, si concuerdan con lo observado por Mohan *et al*⁽¹⁴⁰⁾ quienes estudiaron el efecto de la MMP-9 sobre la regeneración epitelial y observaron una vez que en la herida se completó la migración y proliferación epitelial, la expresión de esta gelatinasa se mantiene por varias semanas.

La expresión *in situ* de MMP-9 en el grupo tratado con AH, fue similar a la de los anillos precirugía posiblemente porque el AH inhibe la síntesis y la actividad de células y mediadores proinflamatorios como neutrófilos y citocinas que estimulan la expresión de esta MMP con lo que evita la degradación del cartílago y podría estimular su regeneración como lo observó Moreland⁽¹⁴⁸⁾ al estudiar los mecanismos de acción de la aplicación tópica de AH para el tratamiento de oteoartritis. Los resultados de este estudio también concuerdan con lo observado por Betegón⁽¹⁴⁹⁾ quien estudio la prevención de la fibrosis epidural en conejos mediante la utilización de diferentes tipos de AH aplicado tópicamente y notó que los niveles de la MMP-9 y la fibrosis disminuyeron después del tratamiento con esta droga. Nuestros hallazgos también coinciden con los reportados por Allison⁽¹⁵⁰⁾ quien evaluó el efecto del AH sobre los eventos fibroproliferativos en un modelo *in vitro* de matriz celular de vejiga y observó que esta droga disminuyo la actividad de la MMP-9 secretada por las células de la vejiga. Al correlacionar todos los hallazgos de este estudio, la disminución del proceso inflamatorio agudo, local y periférico, presencia de neovascularización, menor cantidad de colágena formada por gramo de tejido y la organización de las fibras de colágena similar a la normal, nos hace pensar que el AH al reducir la cantidad de neutrófilos modula la expresión de la MMP-

9, como lo han descrito otros autores que han estudiado el papel de las MMPs en algunas patologías y durante la cicatrización^(56,151).

La expresión leve de MMP-9 (similar a la de los anillos precirugía) en el grupo tratado con CPVP posiblemente fue ocasionada porque este fármaco tiene propiedades antiinflamatorias y antifibróticas, ya que durante la fase aguda de la inflamación impide la infiltración de neutrófilos, expresión de TNF α y la acumulación de componentes de matriz extracelular; mientras que en las fases crónicas revierte la infiltración neutrofílica y la deposición de matriz extracelular⁽¹⁵²⁾. Nuestros hallazgos coinciden con lo descrito por Moreno *et al*⁽¹⁵³⁾, quienes en un modelo de asma en cobayos, observaron que la administración de CPVP durante la fase aguda, impide la infiltración de neutrófilos y de TNF α . Bazan *et al*⁽¹⁵²⁾ quienes al estudiar el efecto de la CPVP en un modelo de asma crónico en cobayos, observaron que la aplicación de este fármaco en las fases crónicas de la inflamación revierte el desarrollo de infiltración neutrofílica, la deposición de matriz extracelular y la hiperreactividad de las vías respiratorias. En otro estudio en el que se utilizó la CPVP en traqueoplastias en perros, se observó que el fármaco reduce el infiltrado inflamatorio de PMN, el grado de fibrosis y estenosis traqueal, además favorece la formación de nuevos vasos sanguíneos⁽²¹⁾. Por otra parte, cuando esta droga se ha utilizado para el empaquetamiento del oído medio disminuye el infiltrado inflamatorio a base neutrófilos y la fibrosis^(82,82,98), Furuzawa *et al*⁽¹³⁰⁾ estudió el efecto de la administración intramuscular de este fármaco en pacientes con artritis reumatoide y observaron que el tratamiento con esta droga disminuye la inflamación e histológicamente reestablece la arquitectura del tejido similar a la observada en la membrana sinovial normal. Además incrementa la cantidad de

colágeno de tipo III y la producción del TIMP-1, el cual en conjunto con la α 2-macroglobulina son capaces de inhibir la actividad enzimática de MMP-9 (41,139,154). En resumen y con base en lo anterior se puede decir que la aplicación tópica de CPVP en las anastomosis traqueal disminuye el infiltrado inflamatorio a base de neutrófilos y modula la expresión de la MMP-9, por lo que la cicatriz traqueal presenta menor cantidad de fibras de colágena y las organiza de forma similar a las del tejido normal con lo que mejora la cicatrización traqueal y evita la estenosis.

La expresión leve de MMP-9 postratamiento con la mezcla fue producida porque posiblemente ambos fármacos hacen sinergia, ya que el AH disminuye el infiltrado inflamatorio agudo principalmente a los neutrófilos y las citocinas que estimula la expresión de esta MMP (56,148-151) mientras que la CPVP en la fase aguda de la inflamación impide la infiltración de neutrófilos (21,82,84,98) expresión de TNF α y la acumulación de componentes de matriz extracelular; mientras que en las fases crónicas revierte la infiltración neutrofílica y la deposición de matriz extracelular (153,152).

En la revisión de la literatura solo encontramos un trabajo que describe el efecto de la MC sobre la expresión de MMPs. En este trabajo se estudió el efecto de la aplicación de *in vitro* sobre los fibroblastos de Tenon (principal tipo de células que contribuyen a la respuesta fibrótica en la cirugía de filtración de glaucoma) de una proteína ácida rica en cisteína en comparación con la MC y los autores observaron que la MC tiene efectos proinflamatorios y provoca incrementos en la expresión de las MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9 (155). Estos hallazgos no coinciden con lo observado en nuestro estudio, debido a que nosotros encontramos en los anillos traqueales tratados una expresión de

MMP-9 similar a la de los anillos sanos. Sin embargo esto pudo ser originado porque esta MMP se expresa en la fase aguda de la inflamación ^(137,138).

Una de las limitaciones de este estudio fue que la determinación de los niveles de MMP-9 se llevó a cabo al final del estudio y no durante los primeros días postcirugía que de acuerdo a la literatura es el momento en el que se desarrolla la reacción inflamatoria y en los que se presenta la modificación máxima de la MEC y posteriormente conforme pasa el tiempo esta reacción inflamatoria y cicatricial se estabiliza ⁽¹⁵⁶⁾ por lo que se tendría que hacer la evaluación de la expresión de la MMP-9 durante la primera semana postraqueoplastía.

CONCLUSIONES

Las anastomosis traqueales que no reciben tratamiento postraqueoplastía mantienen una reacción inflamatoria crónica, desarrollan mayor cantidad de colágena, fibrosis macroscópica y microscópica severa, expresan moderada cantidad de MMP-1 y MMP-9 en la cicatriz traqueal.

La aplicación tópica de AH, CPVP, la mezcla AH-CPVP o MC en el sitio de la anastomosis de la traqueoplastía permite la adecuada cicatrización de la misma a los 7 días postcirugía y evitan las estenosis traqueales; sin embargo las tratadas con MC presentan mayor inflamación y edema en la anastomosis y anillos adyacentes.

El tratamiento tópico sobre la anastomosis traqueal con cualquiera de los moduladores de la cicatrización utilizados en este estudio favorece el desarrollo de una fibrosis moderada en la cicatriz postraqueoplastía.

La aplicación tópica de AH, AH-CPVP o MC postraqueoplastía colabora el desarrollo de fibras delgadas de colágena en la anastomosis cicatrizada; mientras que la CPVP favorece el desarrollo de fibras gruesas.

La aplicación tópica de AH, CPVP, la mezcla AH-CPVP o MC en el sitio de la anastomosis de la traqueoplastía organiza adecuadamente las fibras de colágena de neoformación.

La aplicación tópica de CPVP o de la mezcla AH-CPVP postraqueoplastía favorece la presencia de menor infiltrado inflamatorio en la cicatriz traqueal.

El tratamiento tópico con de AH, CPVP o la mezcla AH-CPVP de las anastomosis traqueales favorece la neovascularización moderada; mientras que la MC promueve la leve formación de nuevos vasos sanguíneos.

La aplicación tópica de la mezcla AH-CPVP o MC en la anastomosis de traqueales, reduce la cantidad de colágena formada en la cicatriz postraqueoplastía.

Las anastomosis traqueales tratadas tópicamente con AH o CPVP predisponen a la moderada expresión *in situ* de MMP-1; mientras que la mezcla AH-CPVP o MC favorece la expresión severa de la misma.

El tratamiento tópico de la anastomosis traqueal con AH, CPVP, la mezcla AH-CPVP o MC predispone a la expresión moderada de MMP9 en la cicatriz traqueal postraqueoplastía.

La aplicación tópica de la mezcla AH-CPVP postraqueoplastía incrementa la expresión *in situ* de MMP-1 y moderada de MMP-9, disminuye la reacción

inflamatoria, deposición de colágena y favorece su organización en la cicatriz traqueal. Sin embargo solo la mezcla disminuye el infiltrado inflamatorio y favorece la neovascularización, pero produce endurecimiento de la anastomosis y disminuye la elasticidad traqueal (lo cual puede ser importante en los pacientes con traqueomalacia).

Por otro lado, aunque la MC incrementa la expresión *in situ* de MMP-1 y moderada de MMP-9, disminuye la deposición de colágena y favorece su organización en la cicatriz traqueal, no disminuye la reacción inflamatoria.

Cabe mencionar que se requieren más estudios en los que se evalué la presencia de los factores de crecimiento, TIMPS y se evalué la MMP-9 en los primeros días postcirugía, además de explorar la presencia de otras MMP en estudios agudos y crónicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schmidt RF. Human Physiology. Springer Verlag. 2 ed. 1990.
2. Evans HE, Lahunta A. Miller's Anatomy of the Dog. Elsevier. 4th ed. USA. 2013.
3. Cunningham J, Bradley GK. Fisiología Veterinaria. Elsevier. 4ta ed. España. 2009.
4. Alquicira JC, Aldama A, Anzaldúa SR, Arreola JL, Basurto R, Bouda J. Fisiología Veterinaria e introducción a la fisiología de los procesos productivos. UNAM. FMVZ. México D.F. 2010.
5. Cerezal LJ. Valoración histopatológica de la aplicación de sustancias sellantes en lesiones traqueales. Estudio Experimental. Universidad de Valladolid. Facultad de Medicina. Departamento de Cirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología y Fisioterapia. Tesis Doctoral. España. Valladolid. 2009.
6. Ondarza M. Histología Básica. Manual Moderno. México. 2007.
7. Dellman HD. Histología Veterinaria. Sistema Respiratorio. Acribia. España. 1993.
8. Tojo T, Niwaya K, Sawabata N, Nezu K, Kawachi K and Kitamura S. Tracheal allogenic immunoresponse is reduced by cryopreservation canine experiment. Transplant Proc. 1996; 28: 1814-1815.
9. Dirección General. Informe Iner. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. Informe de labores 2012 de la dirección general del INER. 2012. Pág. 82.

10. Grillo HC, Mark EJ, Mathisen DJ, Wain JC. Idiopathic laryngotracheal stenosis and its management. *Ann Thorac Surg* 1993;56:80-87.
11. Zaldívar JA, Santiago JE, Mora R, Torres NA, Careaga G. Manejo quirúrgico de la estenosis traqueal en pediatría. Experiencia de 2001 a 2011. *Neumol Cir Tórax*. 2011;70(4):243–6
12. McCaffrey TV. Management of laryngotracheal stenosis on the basis of site and severity. *Otolaryngol Head Neck surg*, 1993; 109:468-473.
13. Cotton RT. Management of subglottic stenosis. *Otolaryngol Clin North Am*. 2000; 33: 111-130.
14. Papla B, Dyduch G, Frasik W, Olechnowicz H. Post-intubation tracheal stenosis--morphological-clinical investigations. *Pol J Pathol*. 2003; 54:261–6.
15. Liberman M, Mathisen DJ. Tailored cricoplasty: an improved modification for reconstruction in subglottic tracheal stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;137:573-578.
16. Rocabado JL, Roldant R, Derosas C, Zuleta R, Hurtado G. Manejo de la estenosis traqueal. *Rev. Chilena de Cirugía*. 2007; 59:408-416.
17. Cabezalí D. Anton J. López M. Tejedor R. Cuadros J. Gómez A. Estenosis traqueal adquirida: estrategia diagnóstica y terapéutica. *Cir. Pediatr*. 2007; 20:19-24
18. Jorda C, Peñalver JC, Escriva J, Cerón J, Padilla J. Dilatación traqueal Neumatica en el tratamiento de la estenosis traqueal idiopática. *Arch Bronconeumol*. 2007; 43:692-694.
19. Grillo HC. Development of tracheal surgery: A historical review. Part 2: Treatment of tracheal diseases. *Ann Thorac Surg*. 2003;75: 1039–1047.

20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Salem C, Vidal A, Mariangel P, Concha M. Cicatrices hipertróficas y queloides. *Cuad. Cir.* 2002; 16: 77-86.
24. 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.
25. Eser I, Sarper A, Ayten Tracheal stenosis after tracheostomy or intubation: review with special regard to cause and management. *Tex Heart Inst J.* 2005; 32: 154-158.
26. Weymuller EA. Laryngeal injury from prolonged endotracheal intubation. *Laryngoscope* 1988; 98 Suppl 45, Part 2: 1-15.
27. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience.* 2004; 9: 283-289..

28. 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.
29. Bielsa I. Proceso de cicatrización de las heridas. *Piel*. 2006;21:207-212
30. 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
31. Rahban, SR, Garner WL. Fibroproliferative scars. *Clin Plast Surg*. 2003; 30: 77-89.
32. Hernandez CA, Milena A. Enfoque y manejo de cicatrices hipertróficas y queloides. *Rev Asoc Colomb Dermatol*. 2011;19: 218-228
33. Clark RA. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 936: 355-367.
34. Kim WJ, Gittes G K, Longaker MT. Signal transduction in wound pharmacology. *Arch Pharm Res*. 1998; 21: 487-495),
35. Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int*. 1992; 41: 557-559.
36. 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.
37. Silver FH, Glasgold AI. Cartilage wound Healing. An overview. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 1995;28: 847-864.

38. Silver FH, Moss CS. Biology of facial implant materials. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. 1994; 2: 241.
39. Brody GS, Peng STJ, Landel RF. The etiology of hypertrophic scar contracture: another view. *Plast Reconstr Surg*. 1981; 67:673-84.
40. Senties MD, Gálvez FJ, Meza E, Armendáriz J. Fibrosis Hepática. El papel de las metaloproteinasas de TGF- β . *Gac. Med. Méx.* 2005; 141:315-322.
41. Redondo J. Regulación y función de la metaloproteinasas de matriz (MMP-9) en la leucemia linfocítica crónica-B y su papel en la patogénesis de la enfermedad. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Biología Celular. Tesis Doctoral. España. Madrid. 2010.
42. Montaner J. El papel de las metaloproteinasas de matriz en la fase aguda del ictus isquémico. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Medicina. Tesis Doctoral. España. Barcelona. 2001.
43. Bohórquez JC. Metaloproteinasas de matriz: su implicación en las enfermedades vasculares periféricas. *Angiología*. 2006; 58:269-277.
44. Cascales M, Álvarez JA. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 2010; 76:58-84.
45. Thienu H, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & Development* 2000; 14:2123-2133.
46. Subbaram S, Carrico P, Melendez JA. Redox-control of matrix metalloproteinase-1: A critical link between free radicals, matrix

- remodeling and degenerative disease. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2010; 174:299-306.
47. Kendra J, Werb Z, Kheradmand F. Matrix Metalloproteinases in lung: multiple, multifaceted and multifaceted. *Physiol.Rev.* 2007; 87:69-98.
48. Aumailley M. Gayraud B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J. Mol. Med.* 1998; 76:253-265.
49. Checa M, Ruiz V, Montaña M, Velázquez-Cruz R, Selman M, Pardo A. MMP-1 polymorphisms and the risk of idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Genet.* 2008; 124: 465-472
50. Herrera I. Papel de la MMP-1 en la migración de células epitelio alveolares. Tesis de Maestría. México, D.F. Facultad de Ciencias, UNAM. 2007.
51. Johansson N, Ahonen M, Kaˆhaˆri VM. Matrix metalloproteinases in tumor invasi3n. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010;57: 5–15.
52. Scharffetter K, Wlascheck M, Hogg A, Bolsen K, Schothorst G, Plewig G. UVA irradiation induce collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Arch Dermatol Res* 1991;283:509-11.
53. Koivukangas M, Kallionen H. Autio-Harminen, Oikarinen A. UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo. *Acta Derm Venereol* 1994;74:279-82.

54. Sigurdson L, Sen T, Hall III L, Rubenfeld A, Hard R, Gardella J, Bright F, Hicks WL. Possible Impedance of Luminal Reepithelialization by Tracheal Cartilage Metalloproteinases. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003; 129:197-200.
55. Kyriakides TR, Wulsin D, Skokos EA, Fleckman P, Pirrone A, Shipley JM, Senior RM, Bornstein P. Mice that lack matrix metalloproteinase-9 display delayed wound healing associated with delayed reepithelization and disordered collagen fibrillogenesis. *Matrix Biology*, 2009; 28: 65-73.
56. Colnot C, Thompson Z, Miclau T, Werb Z, Helms JA. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development.* 2003; 130: 4123-4133.
57. Eming SA, Krieg T, Davidson JM, Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007; 127: 514-525.
58. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2000; 5: 40-46.
59. Lisa J McCawley and Lynn M Matrisian. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!. *Current Opinion in Cell Biology* 2001, 13:534–540.
60. Simonetti O, Lucarini G, Cirioni O, Zizzi A, Orlando F, Provinciali M, Di Primio M, Giacometti A, Offidani A. Delayed wound healing in aged skin rat models after dermal injury is associated with an increased MMP-9, K6 and CD44 expression. *Burns.* 2009; 39: 776-787.
61. Roediger FC, Orloff LA, Courey MS. Adult subglottic stenosis: management with laser incisions and mitomycin-C. *Laryngoscope.* 2008; 118: 1542-1546.

62. 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.
63. Lorenz R. Adult laryngotracheal stenosis: etiology and surgical management. *Current opinion in otolaryngology and head and neck surgery.* 2003; 11: 467-472.
64. Hashemzadeh S. Surgical treatment of postintubation tracheal stenosis: Iranian experience of effect of previous tracheostomy. *Inter J Gen Med.* 2012; 5: 93-98.
65. Palmer S. Mitomycin as adjunct chemotherapy with trabeculectomy. *Ophthalmol.* 1991; 98: 317-321.
66. 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.
67. Rahbar R, Shapshay SM, Healy GB. Mitomycin: Effects on laryngeal and tracheal stenosis, benefits and complications. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2001; 110:1-6.
68. Smith ME, Elstad M. Mitomycin C and the endoscopic treatment of laryngotracheal stenosis: are two applications better than one?. *Laryngoscope.* 2009; 119: 272-283.

69. 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.
70. Livingstone GL, Schild JA. Lathirogenic agents as therapy for subglottic stenosis a pilot study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1987; 97:446-451.
71. Neel HB III, Harner SG. Fetal wound healing. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1994;110: 547-549.
72. 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.
73. Rodríguez R, Furuzawa J, Corchado A, Krötzsch F. Collagen-polyvinylpyrrolidone promotes human wound healing through cytokine down modulation. *Wound Rep Reg.* 2001; 9: 166.
74. Furuzawa GJ, Marquez R, Quiroz E, Citokine expresión is down regulated by collagen-polivinylpirrolidone in hyperthrophic scars. *J Invest Dermatol.* 1998; 111: 828-834.
75. Wen DY. Intra-articular Hyaluronic Acid Injection for Knee Osteoarthritis. *Am Fam Physician.* 2000; 62: 565-570.
76. 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.
77. 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.

78. Kröttsch 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.
79. 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
80. 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.
81. Cervantes C, Olaya E, Testas M, García N, Coste G, Arrellin G, Luna A, Kröttsch F. Collagen-PVP, a collagen síntesis modulator, decreases intraperitoneal adhesions. *J Surg Research.* 2003; 110: 207-210.
82. 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
83. Ladwig GP, Robson MC, Liu R, et al. Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 2002; 10(1): 26-37.

84. Rayment EA, Upton Z., Shooter GK. Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer. *Br J Dermatol* 2008; 158(5): 951-61.
85. Liu Y, Min D, Bolton T, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 2009; 32(1): 117-19.
86. 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.
87. 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.
88. Short CE, Bufalari A. Propofol anesthesia. In Matthews N. *The veterinary clinics of North America. Small Animal Practice. Clinical Anaesthesia.* 1999; 747-778.
89. Alvarez I. Anestesia y analgesia en el perro y gato. Dpto. Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria Universidad Complutense.
90. Jong-Lyel R, Dong-Hyun K, Ki Sang R, Myung-Whun S, Kwang-Hyun K C-IP. Benefits and risks of mitomycin use in the traumatized tracheal mucosa. *Otolaryngol Neck Surg.* 2007;136:459–63.

91. 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.
92. 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.
93. 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.
94. Ruiz L3pez VM. Efecto de los Inmunosupresores en la Cicatrizaci3n Bronquial en un Modelo de Autotrasplante Pulmonar. Tesis Licenciatura en Biolog3a. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Aut3noma de M3xico. M3xico, DF. 1996.
95. Pardo A, Selman M. MMP-1: the elder of the family. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37:283-288.
96. Cabrera MS. Papel de la Gelatinasa B (MMP9) en el desarrollo de fibrosis pulmonar. Universidad Nacional Aut3noma de M3xico, Facultad de Ciencias. Tesis Doctoral. M3xico, D.F. 2007.
97. Checa MA. Variaciones gen3ticas en el promotor de MMP-1 y su relaci3n con la fibrosis pulmonar idiop3tica. Universidad Nacional Aut3noma de M3xico, Facultad de Medicina. Tesis Doctoral. M3xico, D.F. 2009.

98. Hernández Claudia. Efecto del ácido hialurónico (AH) y colágeno polivinil pirrolidona (CPVP) sobre la cicatrización traqueal en un modelo experimental canino. Tesis de Maestría. FMVZ. UNAM. 2005.
99. 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.
100. Mast BA, Diegelmann RF, Krummel TM, Cohen IK. Scarless wound healing in the mammalian fetus. *Surg Gynecol Obstet.* 1992; 174: 441-451.
101. 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.),
102. 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.
103. Eliashar R, Eliashar I, Esclamado R, Gramlich T, Strome M. Can Topical Mitomycin Prevent Laryngotracheal Stenosis? *Laryngoscope.* 1999; 109:1594-1600.
104. 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.

105. Hueman EM, Simpson CB. Airway complications from topical mitomycin C. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 133:831-835,
106. González AI. Efecto de la aplicación de la mezcla de Ácido Hialurónico y Colágeno Polivinilpirrolidona y de la Mitomicina C sobre la expresión de decorina en la cicatriz postraqueoplastia en un modelo experimental canino. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina. Tesis Especialidad. México, D.F. 2013
107. 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: 121.
108. 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.
109. 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.
110. Reza R. Stanley MS, Gerald GH. Mitomycin: Effects on Laryngeal and Tracheal Stenosis, Benefits and Complications *Ann Otol Laryngol.* 2001; 110:1-6.
111. Sánchez CJ Cicatrización en el neonato con labio y paladar hendidos. *Cir Plast* 2006; 16:24-27.
112. 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

113. Cowin A J, 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.
114. Wong T, Sethi C, Daniels JT, Limb GA, Murphy G, Khaw PT. Matrix metalloproteinases in disease and repair processes in the anterior segment. *Surv Ophthalmol* 2002; 47: 239-256.
115. Dushku N, Molykutty KJ, Schultz GS, Reid TW. Pterygia pathogenesis: corneal invasion by matrix metalloproteinase expressing altered limbal epithelial basal cells. *Arch Ophthalmol* 2001; 119: 695-706.
116. Thibeault SL, Bless DM, Gray SD. Interstitial protein alterations in rabbit vocal fold with scar. *J Voice.* 2003; 17: 377-383.
117. 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.
118. 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
119. Hansen JK, Thibeault SL. Current Understanding and Review of the Literature: Vocal Fold Scarring. *J. Voice.* 2006; 20: 110-120.
120. Pawlak AS, Hammond T, Hammond E, Gray SD. Immunocytochemical study of proteoglycans in vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1996; 105: 6-11.

121. Avalos J. Efecto de la aplicación tópica de roxitromicina y propilenglicol en el cierre de úlceras crónicas de pie diabético. Tesis Doctoral Facultad de Medicina. Universidad de Colima. 2010.
122. Donahue T, Hiatt JR, Busuttil RW. Collagenase and surgical disease. *Hernia*. 2006; 10:478-485.
123. Torra i Bou JE, Paggi B. La colagenasa y el tejido desvitalizado en el contexto de la preparación del lecho de la herida. *Rev ROL Enf*. 2013; 36: 109-114.
124. Huskisson EC, Donnelly SM. Editorial: Hyaluronic acid in osteoarthritis. *European Journal of Rheumatology and Inflammation* 1995; 15: 1-2.
125. Abatangelo G, O'Reagan M. Hyaluronan: biological role and function in articular joints. *European Journal of Rheumatology and Inflammation*, 1995; 15: 9-16.
126. Maneiro E, De Andrés MC, Fernández-Sueiro JL, Galdo F, Blanco FJ. The biological action of hyaluronan on human osteoarthritic articular chondrocytes: The importance of molecular weight. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2004; 22: 307-12.
127. Robert L, Robert AM, Renard G. Biological effects of hyaluronan in connective tissues, eye, skin, venous wall. Role in aging. *Pathologie Biologie* 58 (2010) 187–198.
128. Chen X, Thibeault SL. Response of fibroblasts to transforming growth factor- β 1 on two-dimensional and in three-dimensional hyaluronan hydrogels. *Tissue engineering: Part A*. 2012; 18: 2528-2538.

129. Monfort J, Nacher M, Montell E, Tomàs E, Vergés J y Benito P. Efecto de condroitín sulfato y ácido hialurónico (500-730 kDa) sobre la síntesis de estromelisina (MMP-3) y MMP-1 en cultivo de condrocitos humanos. *Reumatol Clin.* 2005; 1:150-4.
130. Furuzawa-Carballeda J, Fenutria-Ausmequet R, Gil-Espinosa V, Lozano-Soto F, Teliz-Meneses MA, Romero-Trejo C, Alcocer-Varela J. Polymerized-type I collagen for the treatment of patients with rheumatoid arthritis. Effect of intramuscular administration in a double blind placebo-controlled clinical trial. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2006; 24: 514-520.
131. Rahmani-Neishaboor E, Meng-kay F, Jalili R, Kilani RT, Ghahary A. Improvement of hypertrophic scarring by using topical anti-fibrogenic/anti-inflammatory factors in a rabbit ear model. *Wound Rep Reg.* 2010; 18: 401-408.
132. McQuibban GA, Gong JH, Wong JR, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 2002; 100: 1160–1167.
133. Kurt G, Aytar M, Doğulu F, Cemil B, Erdem O, MDb, Baykaner MK, Çeviker N. A comparison of the local effectiveness of mitomycin C, aprotinin, and Adcon-L in experimental peridural fibrosis. *Surgical Neurology.* 2008; 70: 608-613.
134. Lama PJ, Fechtner RD. Antifibrotics and wound healing in glaucoma surgery. *Surv Ophthalmol.* 2003; 48:314-346.

135. Stewart CE, Kim JY. Application of mitomycin-C for head and neck keloids. *Otolaryngol Head and Neck Surg.* 2006; 135: 946-950.
136. Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *International Review of Cytology*, 2007; 257: 143-179.
137. Manicone AM, McGuire JK. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2008; 19: 34-41.
138. Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2008; 40: 1334-1347.
139. Blaha K, Borsky J, Kasparova M, Steklacova A, Zajickova V, Pechova M, Matejova R, Kotaska K, Dostalova T. Concentrations of MMP-9 and TIMP-1 in lip tissue and their impact on cleft lip surgery healing. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2013; 157:363-366.
140. Mohan R, Chintala SK, Jung JC, Villar WV, McCabe F, Russo LA, Lee Y, McCarthy BE, Wollenberg KR, Jester JV, Wang M, Welgus HG, Shipley JM, Senior RM, Fini ME. Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration. *J Biol Chem.* 2002; 277:2065- 2072.
141. Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J.* 1995; 309: 299-306.

142. Vera L, Martins V, Maley M, O'Toole EA. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell Tissue Res.* 2013; 351: 255-268
143. Heljasvaara R, Nyberg P, Luostarinen J, Parikka M, Heikkila P et al. Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteases. *Exp Cell Res.* 2005; 307: 292-304.).
144. Larocca N, Moreno D, Garmendia J, De Sanctis JB. Niveles séricos de metaloproteínasa 9 (MMP-9) y del inhibidor tisular de MMP tipo 1 (TIMP-1) en pacientes venezolanos con asma o con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). *RFM Caracas.* 2010; 33.
145. Mackelfresh, J, Soon S, Arbiser J. Pathophysiology of chronic nonhealing wounds. *J Burn care Rehabilitation.* 2005; 26:306-319.
146. Kumar S, Wong PF, Leaper DJ. What is New in Wound Healing? *Turk J Med Sci.* 2004; 34: 147-160.)
147. Pierce GF. Inflammation in nonhealing diabetic wounds. *AJP.* 2001; 159: 399-403.
148. Moreland LW. Intra-Articular Hyaluronan (Hyaluronic Acid) and Hylans for the Treatment of Osteoarthritis: Mechanisms of Action. *Arthritis Research & Therapy.* 2003; 5: 54-67.
149. Betegón CJ. Prevención de la fibrosis epidural en conejos mediante la utilización de distintos tipos de ácido hialurónico. Tesis de Doctorado. León, España. Facultad de Medicina, Universidad de León. 2009.

150. Allison L. Brown AL, Ringuette MJ, Prestwich GD, Bagli DJ, Woodhouse KA. Effects of hyaluronan and SPARC on fibroproliferative events assessed in an in vitro bladder acellular matrix model. *Biomaterials*. 2006; 27: 3825-3835.
151. Maud M. Gueders , Jean-Michel Foidart , Agnes Noel , Didier D. Cataldo. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: Potential implications in asthma and other lung diseases. *European Journal of Pharmacology*. 2006; 533: 133-144.
152. Bazán-Perkins B, Campos MG, Sánchez-Guerrero E. Polymerized Type I Collagen Reverts Airway Hyperresponsiveness and Fibrosis in a Guinea Pig Asthma Model In Khatami M. *Inflammatory Diseases - Immunopathology, Clinical and Pharmacological Bases*. InTech 2012.
153. Moreno-Alvarez P, Sanchez-Guerrero E, Martinez-Cordero E, Hernandez-Pando R, Campos MG, Cetina L, Bazan-Perkins B. Aerosolized polymerized type I collagen reduces airway inflammation and remodelling in a guinea pig model of allergic asthma. *Lung*, 2010; 188; 97-105.
154. Mook O R, Frederiks WM, Van Noorden, C. J. The rol of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochem Biophys Acta* 2004; 1705: 69-89.
155. Seet LF, Su R, Toh LZ, Wong TT. In vitro analyses of the anti-fibrotic effect of SPARC silencing in human Tenon's fibroblasts: comparisons with mitomycin C. *J. Cell. Mol. Med*. 2012; 16: 1245-1259.

156. Shih HN, Fang JF, Chen JH, Yang CL, Chen YH, Sung TH, Chen YH, Sung TH, Shih LY. Reduction in experimental peridural adhesion with the use of a crosslinked hyaluronate/collagen membrane. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004; 3:547-553.