



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
"ISMAEL COSÍO VILLEGAS"

**EXPRESIÓN DE FIBRONECTINA EN CICATRIZACIÓN
POS-TRAQUEOPLASTIA CON USO DE MODULADORES DE CICATRIZACIÓN**

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

PRESENTA:
DR. CARLOS DAVID BRIONES TORRES

ASESOR:
DR. GABRIEL TONA ACEDO

CO-TUTORES:
M EN C J. RAÚL OLMOS ZUÑIGA
Q.F.B. MATILDE BALTAZARES-LIPP

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA
DE CABEZA Y CUELLO:
DR. ARMANDO R. CASTORENA MALDONADO

MÉXICO, DF.

NOVIEMBRE 2016



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.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	2
1.1 Fisiología de la cascada de la cicatrización	3
1.2 Matriz Extracelular.....	7
1.3 Fibronectina.....	9
1.4 Cicatrización Patológica	11
1.5 Estenosis laringo-traqueal	12
1.6 Clasificación de estenosis traqueales	14
1.7 Tratamiento de la estenosis laringotraqueal	15
1.8 Farmacos utilizados como moduladores de la cicatrización	17
Mitomicina C.....	17
Colageno Polivinil Pirrolidona.....	17
Pirfenidona	18
2 JUSTIFICACIÓN	20
3 HIPÓTESIS	20
4 OBJETIVOS	21
5 MATERIAL Y MÉTODOS	22
5.1 Animales de experimentación	23
5.2 Grupos de estudio	24
5.3 Anestesia.....	24
5.4 Técnica quirúrgica	25
5.5 Tratamiento	26

5.6 Evaluación.....	27
6 RESULTADOS.....	31
6.1 Hallazgos macroscópicos.....	31
6.2 Hallazgos morfométricos.....	32
6.3 Hallazgos microscópicos.....	34
6.4 Hallazgos bioquímicos.....	39
6.5 Hallazgos inmunohistoquímicos.....	40
7 DISCUSIÓN.....	41
8 CONCLUSIONES.....	47
9 REFERENCIAS.....	48

RESUMEN

EXPRESIÓN DE FIBRONECTINA EN CICATRIZACIÓN POS-TRAQUEOPLASTIA CON USO DE MODULADORES DE CICATRIZACIÓN

De forma natural cuando un tejido es lesionado se inicia el proceso de cicatrización en donde el tejido dañado será reemplazado por un tejido similar al existente, esto se realiza mediante una serie de pasos complejos en donde interactúan diferentes tipos de células, factores solubles, componentes de la matriz extracelular (MEC) con predominio en la expresión de colágena, fibronectina y elastina. La cicatriz generada puede ser normal o patológica (fibrótica) de acuerdo a la eficiencia y control con el que se realicen eventos de señalizaciones celulares y producción de matriz extracelular de cada fase de la cicatrización. La estenosis traqueal es una disminución de la luz traqueal, ocasionada por fibrosis precedidas de una inflamación prolongada. Su tratamiento es con procedimientos endoscópicos y quirúrgicos, solos o en combinación con la aplicación de moduladores de la cicatrización (MDC); sin embargo, esto no ha evitado las reestenosis, lo que justifica buscar MDC que la eviten. La pirfenidona (PIRFE) y colágeno polivinil-pirrolidona (CPVP) han mostrado disminuir la fibrosis, sin embargo no existen estudios que evalúen la expresión de fibronectina asociado a esto en cicatrizaicon traqueal. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la administración de PIRFE por 4 semanas y la aplicación tópica de una dosis de CPVP y mitomicina C (MC) sobre los cambios macroscópicos, microscópicos, deposición de colágena y expresión de fibronectina en cicatrices traqueales de ratas con resección y anastomosis termino-terminal de tráquea cervical (traqueoplastía). Cuarenta ratas Wistar con traqueoplastía cervical, divididas en 4 grupos (n=10), tratadas con: Grupo I: SSF, Grupo II: 40mg/kg PIRFE, Grupo III: CPVP, Grupo IV: MC. Se valoró la cicatrización macroscópica y microscópicamente, expresión de fibronectina.

Resultados: Los animales tratados con PIRFE Y CPVP desarrollaron menores grados de estenosis, inflamación y fibrosis que los otros grupos de estudio ($p < 0.05$ Kruskal Wallis) y menor expresión de fibronectina.

Conclusión. La PIRFE Y CPVP disminuyen la inflamación, fibrosis, expresión de fibronectina y deposición de colágena en la cicatriz postraqueoplastía de ratas.

Palabras clave: moduladores de cicatrizacion, pirfenidona, colágena polivinil pirrolidona, mitomicina C, estenosis laringotraqueal, fibronectina

J. Raúl Olmos-Zuñiga, Rogelio Jasso-Victoria, Matilde Baltazares-Lipp, Claudia Hernández-Jiménez ∞Miguel Gaxiola-Gaxiola, *Ivette Buendía Roldan, Mariana Silva-Martinez, Jazmin Jasso-Arenas, +C. David Briones-Torres, +G.Tona-Acedo

Departamento de Cirugía Experimental. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

∞ Departamento de Morfología. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

* Dirección de Investigación. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

° Dirección Médica. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”.

+Departamento de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

INTRODUCCION:

De forma natural cuando un tejido es lesionado se inicia el proceso de cicatrización en donde el tejido dañado será reemplazado por un tejido similar al existente, esto se realiza mediante una serie de pasos complejos en donde interactúan diferentes tipos de células, factores solubles, componentes de la matriz extracelular (MEC) con predominio en la expresión de colágena, fibronectina, elastina, factores como TGF- β 1, TGF- β 2 (profibrogenicos), TGF- β 3 (antifibrotico) y metaloproteinasas (MMPs). Dependiendo de la eficiencia y control con la que se lleven los procesos de señalización, la cicatriz generada 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. 1,2

La reparación normal de los tejidos se caracteriza 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), las cuales alteran la estructura morfológica del tejido y su función²

FISIOLOGÍA DE LA CASCADA DE CICATRIZACIÓN.

La cicatrización, es un proceso de reparación que inicia con la formación de una herida. La herida se define como una lesión del cuerpo que, de forma característica, consiste en una laceración o disrupción de una membrana mucosa o cutánea con daño al tejido subyacente. La lesión o herida puede ocurrir por cualquier tipo de fuerzas mecánicas o térmicas dañando la membrana, el tejido conectivo y los vasos sanguíneos.³

Las descripciones clásicas de la cascada de la cicatrización hablan de tres fases ante una lesión: inflamación, proliferación y maduración, en la actualidad se incluye la hemostasia como primer evento además de los 3 mencionados en las descripciones clásicas^{3,4}, cabe mencionar que estas etapas no constituyen eventos aislados, sino procesos secuenciales y simultáneos que conllevan a la reparación del tejido.³

Durante este proceso las células epiteliales, endoteliales, inflamatorias, plaquetas y fibroblastos interactúan para restaurar el tejido lesionado. Después de la fase

inflamatoria (0-5 días), se inicia la fase proliferativa cuando los fibroblastos llegan al tejido lesionado e inician la síntesis de colágena (3-14 días). En la fase de maduración (7 días-1 año) se inicia la remodelación y termina la síntesis de la colágena nueva y la formación de tejido cicatrizal. El depósito de colágeno comienza cuando los fibroblastos entran a la herida entre 48-72 h después de la lesión. La colágena de la herida alcanza su nivel máximo a las 2-3 semanas posteriores a la lesión ²

Inmediatamente posterior a la lesión sigue una hemorragia con exposición del colágeno, el endotelio y las proteínas intra y extravasculares. Este entorno sirve de estímulo para la hemostasia.³ En el momento de la generación de una herida de forma accidental o iatrogénica, se produce una lesión vascular en una escala macro y/o micro vasculares. Esta respuesta inmediata del cuerpo ocurre evitar la exanguinación y promover la hemostasia.⁵

Esto inicia con vasoconstricción del musculo liso del interior del endotelio de los vasos sanguíneos y es la primera respuesta a la lesión vascular. Este evento se refleja antes de la agregación plaquetaria y la coagulación. Es dependiente la liberación de vasoconstrictores, entre los cuales se encuentra la endotelina producido por el propio endotelio vascular y con una fuerte capacidad de vasoconstricción, otros factores que intervienen son mediadores de vasoconstricción que provienen de las catecolaminas circulantes como noradrenalina, adrenalina, así como prostaglandinas liberadas por las mismas células dañadas. La cascada de coagulación y la activación plaquetaria promueven la vasoconstricción por estímulos adicionales como la producción de tromboxano A₂, bradicinina, fibrinopeptidos y serotonina. ³

La cascada de la coagulación se compone de dos la vía extrínseca e intrínseca vías que convergen a una vía común.

La vía extrínseca de la coagulación es una vía esencial para la formación normal del trombo y comienza por la exposición del factor tisular sobre la superficie subendotelial. El factor tisular (o factor III) se une al factor VII y activa luego los factores IX y X. La vía intrínseca no es esencial para la coagulación. Como su propio nombre indica, todos los componentes de esta vía son intrínsecos al plasma circulante. El inicio de la vía intrínseca tiene lugar por la auto activación del factor XII. El factor XII, en su forma activada, estimula la activación de los factores XI, IX, VIII y X.

Ambas vías convergen en la activación del factor X y la producción de trombina. La trombina cumple dos funciones esenciales en la formación del coágulo: cataliza la conversión del fibrinógeno en fibrina e inicia la activación plaquetaria ³

El factor esencial en la fijación de las plaquetas es el de von Willebrand, una glucoproteína de alto peso molecular relacionada a la familia de las integrinas. La trombina y el colágeno extravascular también contribuyen a la agregación y a la activación de las plaquetas incluidas en el coágulo. A partir de sus gránulos, las plaquetas activadas liberan lisosomas y cuerpos densos de proteínas tales como la trombospondina, la fibronectina, el factor plaquetario ⁴, proteasas y metabolitos del ácido araquidónico.⁶

Además de garantizar la hemostasia, el coágulo inicial sirve de matriz provisional que permite la migración de células inflamatorias y epiteliales, gracias a la presencia de fibronectina, trombina y trombospondina. Además, dentro de la red de fibrina-

fibronectina existe una reserva de otros numerosos factores de crecimiento que se liberan en la herida. Entre estas citocinas, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y el factor de crecimiento transformante α y β (TGF α y β) son los responsables de la migración y la activación de los polimorfonucleares neutrófilos y de los macrófagos. Éstas son las células que van a luchar contra la infección y a limpiar la herida por medio de enzimas y de la producción de radicales libres de oxígeno. En esta fase, las plaquetas y los macrófagos son las fuentes principales de citocinas y de factores quimiotácticos.⁶

Posterior al periodo de vasoconstricción rápida y formación de coagulo de fibrina-fibronectina inicia un periodo de vasodilatación que permite la migración de células inflamatorias a la herida⁶. Este periodo se caracteriza en en el sitio de la lesión se observan los signos clínicos de eritema, calor, edema y dolor.

Los episodios inflamatorios de cicatrización de la herida están dominados secuencialmente por dos poblaciones leucocitarias: los neutrófilos y los macrófagos.³

Los neutrófilos llegan al sitio de la herida e inician con la fagocitosis para eliminar los cuerpos extraños, bacterias y tejido dañado². Tanto neutrófilos como macrófagos asumen la función crítica de desbridamiento de la herida, pero los macrófagos también fomentan el reclutamiento y la activación de células necesarias para las etapas posteriores de la cicatrización.³

En esta fase, también se estimula la mitogénesis de los fibroblastos y su cambio a miofibroblastos productores de matriz extracelular para asegurar una rápida deposición de nuevo tejido conectivo en el sitio de la lesión. ^{2, 7}

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 MEC⁸. 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 reticulado de la colágena es la que le da fuerza y estabilidad con el tiempo) y se inicia la maduración de la cicatriz.⁹

MATRIZ EXTRACELULAR

Los tejidos de un organismo multicelular contienen dos principales componentes, las propias células y el material que se encuentra entre las células y se le denomina matriz extracelular (MEC)¹⁰, la cual se estima que compone el 20% de nuestra masa corporal total y algunos autores lo consideran el órgano más grande del cuerpo¹¹.

La MEC representa una red tridimensional constituida por colágena, proteoglicanos, laminina, así como tenasina, entre otros^{4,12} y engloba todos los órganos, tejidos y células del organismo. Así mismo, constituye un filtro biofísico de protección, nutrición e inervación celular y el medio para la respuesta inmune, angiogénesis, fibrosis y regeneración tisular¹³.

En los tejidos humanos la MEC se encuentra como membrana basal y la matriz estromal. Las membranas basales son finas capas conformadas en su mayoría por

colágena tipo IV₁₀, la cual tiene una consistencia parecida a un gel ^{10, 11}. La membrana basal es el asentamiento de las células epiteliales y separa eficazmente el epitelio subyacente del resto de tejidos. Durante el periodo embrionario, la membrana basal toma mayor importancia, ya que estas crecen rápidamente conduciendo el patrón de crecimiento y desarrollo normal de cada órgano; mientras que en los tejidos adultos ni la expansión, ni la degradación de la membrana basal es significativa en condiciones de normalidad.¹¹

La matriz estromal se asocia con los tejidos conectivos, habitualmente es fibrosa¹³ y está compuesta por las colágenas tipo I, III y V¹¹, que forman una red fibrilar en la cual se contienen glicoproteínas como fibronectina, vitronectina, tenascinas, y proteoglicanos del tipo condroitin sulfato y dermatan sulfato. Pero, sobre todo, el líquido intersticial que contiene hormonas, neurotransmisores, citocinas, sales minerales y muchas otras sustancias prestas para ser utilizadas.⁹

Además de las moléculas que conforman la MEC existen células de soporte, las más importantes son los fibroblastos/fibroцитos, condroblastos/condrocitos, osteoblastos/osteocitos, miofibroblastos y adipocitos.¹¹

La relación de volumen de tejido ocupado por MEC a la ocupada por las células varía de menos de 1:10 (por ejemplo, en los músculos) a más de 10: 1 (por ejemplo, en los tendones, cartílago y hueso).¹⁰

Las funciones principales de la MEC son para llenar el espacio entre las células, para proporcionar una barrera que aísla los tejidos entre sí, a proporcionar señales de navegación para las células migratorias, para proporcionar señales que alteran el comportamiento celular y para secuestrar biológicamente compuestos activos,

tales como factores de crecimiento, hormonas y citocinas así como eliminar desechos del metabolismo celular como CO₂.¹¹

El componente principal de la MEC es la colágena y constituyen una larga familia compuesta por 28 miembros que en total representa aproximadamente el 30% de masa corporal.^{10, 14}

La familia de las colágenas es, posiblemente el grupo de proteínas dominantes de la MEC. Todas se basan en una estructura denominada triple hélice, una apretada hélice diestra de tres cadenas de colágena individuales, cada cadena individual tiene la estructura de hélice con viraje a la izquierda. Debido a la forma que la triple hélice se enrolla, cada tercio de aminoácidos se enfrenta hacia el centro de la hélice, donde hay muy poco espacio. Sólo el aminoácido más pequeño, glicina, puede encajar en esta ubicación, aproximadamente una quinta parte del resto de aminoácidos son prolina e hidroxiprolina los cuales brindan la posibilidad de generar puentes de hidrogeno que estabilizan la estructura helicoidal de la colágena.¹⁰

En el humano aproximadamente el 90% de las colágenas corresponde a los tipos I, II y III y pueden contener una mezcla con otras colágenas para formar colágena fibrilar, así como la colágena tipo IV que en su composición es más un gel que una estructura fibrilar y corresponde como se mencionó anteriormente al principal componente de la membrana basal.^{10,11}

FIBRONECTINA

Las fibronectinas son una familia de proteínas producidas por un “empalme” o “ensamblado” (splicing) alternativo del gen FN1 encontrado en 2q34 .¹⁰

La fibronectina es una glicoproteína constituida por una molécula asimétrica formada de dos subunidades similares de 220 a 250 kDa¹⁵, unidas por puentes disulfuro cerca de su región carboxi-terminal. Se encuentra en forma soluble o plasmática principalmente como un dímero y en forma insoluble o celular formando multímeros de alto peso molecular mantenidos por enlaces covalentes, los cuales son organizados en el componente fibrilar en la MEC¹⁶ mediante enlaces disulfido. Cada molécula de fibronectina contiene sitios de unión para una variedad de otras moléculas como heparan sulfato, integrinas, colágena y fibrina entre otras^{10,15}

Todas las moléculas de fibronectina tienen los mismos dominios básicos funcionales.^{4,12,15} y a pesar de estar codificadas por un único gen, la secuencia se subdivide en 50 exones. El gen FN está compuesto por 3 tipos generales de unidades o módulos repetitivos y homólogos denominados tipo I, II y III.¹⁵ En el gen cada módulo de la unidad homóloga I o II se codifica por un exón separado al contrario del tipo III que requiere la contribución de 2 exones^{4,15}. Cada uno de estos módulos tiene afinidad por moléculas diferentes, por ejemplo el tipo I tiene sitio de unión para fibrina, el tipo II se une solo a colágena y el tipo III relacionado a integrinas se une a las células^{4,12}.

Se ha sugerido que la fibronectina está relacionada a la interacción y mantenimiento directo de la colágena in vivo¹⁵. Como se había mencionado las moléculas de fibronectina son el producto de un solo gen, la proteína resultante puede existir en múltiples formas que surgen de splicing alternativo de un único pre mRNA que pueden generar hasta 20 variantes de fibronectina en el humano^{4,15}

Existen 2 formas de fibronectina: la soluble o plasmática que es producida por los hepatocitos y secretada al plasma⁴ de hecho es un constituyente del plasma de

manera normal en razón 300um/ml la cual circula de manera inactiva¹⁵ y la fibronectina celular o insoluble producida por diferentes células como fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos.⁴ Además puede tener a más de una docena de miembros de la familia de las integrinas como ligandos siendo el ligando clásico $\alpha 5\beta 1$.^{15,17}

Durante la hemostasia la fibronectina soluble es de mayor importancia en la formación del complejo fibrina-fibronectina, así como con la unión a las plaquetas y la activación de varias de sus funciones como la adhesión, migración y agregación para la formación adecuada de la cubierta de fibrina, más tarde en la cicatrización vuelve a tener un papel importante sin embargo en este caso, la fibronectina celular es depositada por las células endoteliales y fibroblastos en la herida para diversas funciones entre las cuales destaca la opsonización de detritus de la herida y es capaz de activar a los macrófagos para su degradación así como la formación de tejido de granulación y la estimulación de la migración celular sobre la herida y está implicada en la deposición de colágena y contracción de la herida.^{4,12}

CICATRIZACIÓN PATOLÓGICA

La formación de cicatrices patológicas siempre está precedida de una prolongación o exageración de la fase inflamatoria de la cicatrización o una alteración durante la contracción o remodelación. Se cree que esto se debe a la expresión anormal de citocinas que pueden modificar diferentes procesos celulares incluyendo la proliferación celular, migración, apoptosis y remodelamiento de la MEC.⁷ Un ejemplo de esto son las cicatrices fibróticas (hipertróficas), en las cuales en la fase inflamatoria se presenta un incremento en la síntesis de citocinas fibrogénicas que

promueven un aumento en la producción de tejido conectivo en la MEC. Este incremento en la MEC puede ser originado por una producción excesiva de colágena, fibronectina y otros proteoglicanos o a la disminución en la degradación de estas proteínas generalmente por la falta de colagenasas (MMP1) durante la contracción, lo que promueve un aumento importante en las fibras de colágena y su desorganización provocando un defecto en la remodelación ^{1,18,19,20}. En la tráquea, cuando se produce una cicatriz fibrótica se produce estenosis y la consecuente obstrucción al flujo de aire ²¹

ESTENOSIS LARINGOTRAQUEAL

La tráquea es un órgano tubular de forma circular que se encuentra sostenida por anillos cartilaginosos que tienen forma de herradura y que se conectan por detrás mediante una membrana elástica, posee una porción cervical y otra intra-torácica divididas por la porción superior del manubrio del esternón. Su función es llevar el aire inspirado ya sea por la nariz o boca hacia las zonas de intercambio gaseoso ²

La tráquea al igual que otros tejidos del cuerpo, no está exenta de sufrir lesiones que tienen que repararse mediante cicatrización, pero cuando se presenta una cicatrización patológica se puede ocasionar una estenosis laringo-traqueal.

Las estenosis laringotraqueales (ELT) se pueden definir como una fibrosis desproporcionada de la luz laringotraqueal que impide el flujo de aire y generalmente son ocasionadas por la presencia de una prolongación de la fase inflamatoria de la cicatrización, ausencia de metaloproteinasas, excesiva producción de colágena y cambios en la expresión de fibronectina ^{1,22}

Las ETL son comunes después de una intubación orotraqueal prolongada, postquirúrgica, traqueotomía, infección o inflamación crónica; son consecuencia de una cicatrización patológica en la que se presenta una fibrosis desproporcionada de la mucosa de la luz traqueal que limita el paso de aire en dirección céfalo-caudal y viceversa. Esto representa un problema clínico grave que compromete la vida de los pacientes. Es una enfermedad incapacitante y potencialmente mortal que consiste en una disminución progresiva y permanente del calibre de la luz laringotraqueal. Este estrechamiento parcial o completo de la vía aérea superior, produce dificultad para respirar, afecta a la fonación, e incluso compromete el proceso deglutivo. La frecuencia es difícil de apreciar, pero según diferentes estudios podría oscilar entre el 5-20% de los pacientes intubados o traqueostomizados. ²³

Existen múltiples patologías que afectan la tráquea y que pueden condicionar un proceso inflamatorio que lleve a la formación de una cicatriz y que de manera secundaria afecte la luz traqueal.

Existen al menos 2 grandes grupos en los que se puede dividir la estenosis laringotraqueal, estas son congénitas y adquiridas, siendo las adquiridas las más frecuentes y de las cuales existen diversas etiologías. Las ocasionadas por trauma son las más frecuentes e incluyen la trauma laringotraqueal interno, intubación orotraqueal prolongada, traqueostomía y procedimientos quirúrgicos; trauma laringotraqueal externo tanto como penetrante, radioterapia, quemadura endotraqueal (térmica o química); otras causas de estenosis laringotraqueal menos frecuentes son la idiopática por enfermedades inflamatorias crónicas, neoplasias, enfermedades autoinmunes (como la granulomatosis con poliangeitis, policondritis recidivante, sarcoidosis,), infecciones granulomatosas como la tuberculosis,

neoplasias benignas como papilomatosis, condromas, neoplasias de glándulas salivales, neoplasias neurales y neoplasias malignas como el carcinoma de células escamosas, neoplasias de glándulas salivales, sarcomas y linfoma. ²⁴

Existen además estenosis limitadas a la laringe (glóticas y/o subglóticas), combinadas con afección tanto laríngea como traqueal, traqueales cervicales puras, traqueales intratorácicas y traqueo-bronquiales. ²⁴

Los tipos de estenosis traqueal se pueden categorizar como cicatriz membranosa, colapso de pared anterior o estenosis completa. ²⁴

El mecanismo fisiopatológico por el que se forma una estenosis traqueal en una intubación prolongada la cual es la causa más frecuente obedece una serie de pasos secuenciales los cuales inician con una necrosis isquémica de la mucosa debido a la presión por el globo de la cánula endotraqueal. Posteriormente la mucosa se ulcera y en presencia de bacterias la infección produce una pericondritis y una condritis con reabsorción cartilaginosa. Una vez iniciado el proceso de cicatrización inicia la formación submucosa de tejido fibroso así como la contracción cicatrizal.²

CLASIFICACIÓN DE ESTENOSIS TRAQUEALES

Existen varias clasificaciones para este padecimiento, los dos mas comúnmente usados son el de Cotton en el que se catalogan en base al porcentaje de obstrucción de la luz traqueal y el de McCaffrey quien los describe además dependiendo de los sitios afectados de la vía aérea. De estos el primero en ser descrito fue el de Cotton en el cual se describen 4 grados. Esta clasificación corresponde a la disminución en porcentaje de la luz transversa (plano axial) de la vía aérea, el grado I corresponde

a una obstrucción del 0% a 50%, el grado II de 51 a 70%, el grado III de 71 a 99% y el grado IV 100% (sin lumen detectable).²⁵

Fue diseñada originalmente para valorar pronóstico para la decanulación en estenosis laringo-traqueal en población pediátrica sin embargo, tiene la desventaja de no contemplar la longitud de la estenosis ni los subsitios afectados lo cual tiene implicaciones en el tratamiento y pronóstico, para lo cual, McCaffrey desarrollo una clasificación que contempla esta información. Existen 4 grados en la clasificación de McCaffrey. Grado I: lesiones confinadas a la subglotis o tráquea menores de 1 cm de longitud, grado 2: estenosis subglótica mayor de 1cm confinada a cricoides y con extensión a glotis o tráquea, grado 3: estenosis que se extienden a la tráquea superior pero no involucran la glotis y el grado 4: lesiones que involucran glotis con fijación o parálisis de una o ambas cuerdas vocales.²⁶

TRATAMIENTO DE LA ESTENOSIS LARINGO-TRAQUEAL

Cuando se presenta una estenosis traqueal completa la resección segmental y anastomosis primaria proveen los mejores resultados.^{23,24} En el caso de que la estenosis sea laringo traqueal involucrando la subglotis y anillos traqueales procedimiento se reseca además de la pared anterior, la pared membranosa posterior, el arco cricoideo anterior y la lámina cricoidea posterior, el arco cricoideo anterior y la lámina cricoidea posterior se resecan por debajo de la articulación crico-tiroidea. Se realiza anastomosis con sutura submucosa alrededor de la tráquea y de manera extra-luminal, se requiere en ocasiones tanto en la estenosis traqueal como laringotraqueal de maniobras de liberación laríngea y traqueal para disminuir tensión en el sitio de anastomosis lo cual se ha asociado a reestenosis²⁷. El cuello

se puede fijar con una sutura que va de el mentón al esternón para disminuir la tensión en el sitio anastomosado²⁷. Este tipo de procedimiento es el preferido cuando se tiene estenosis laringotraqueal y la glotis es normal ya que el éxito de este procedimiento en series extensas es de mas de 90%.²⁴

Como se comentó previamente el tratamiento ideal para las estenosis traqueales clasificadas como Cotton III y IV o McCafrey III y IV es la resección y anastomosis termino-terminal del segmento afectado; sin embargo cuando son clasificadas como Cotton I y II o McCafrey I y II se pueden realizar procedimientos endoscópicos menos invasivos como las dilataciones con globo, colocación de férulas intratraqueales y la permeabilización con láser.²³

Cualquier tratamiento quirúrgico puede ser utilizado solo o en combinación con diferentes fármacos (mitomicina C, antiinflamatorios, 5 fluorouracil, triamcinolona, β -aminopropionitrilo) con el fin de modular la cicatrización, Sin embargo, ninguna de estas opciones terapéuticas ofrece un resultado adecuado del 100% y todas ellas pueden provocar daño adicional a la mucosa aérea desencadenando la aparición de re-estenosis, por el desarrollo de un tejido de neoformación de carácter fibrótico cicatricial^{23, 25, 28-33} o porque tienen que aplicarse por vía orotraqueal en diferentes ocasiones³⁴; por lo que hay que buscar nuevos moduladores de la cicatrización.

FARMACOS UTILIZADOS COMO MODULADORES DE LA CICATRIZACION TRAQUEAL.

MITOMICINA C

La MC es el fármaco más utilizado como modulador de la cicatrización traqueal, es un antibiótico antineoplásico producido por el *Streptomyces caespitosus*, el cual inhibe la proliferación y actividad de los fibroblastos con lo que se evita la formación de una cicatriz fibrótica. Este fármaco ha mostrado buenos resultados cuando se usa como un tratamiento adyuvante después de la realización de gran número de procedimientos oftálmicos para disminuir la recurrencia del pterigión, prevención de estenosis en cirugía de glaucoma, fibrosis del nervio óptico ^{35, 36}; sin embargo, ha mostrado resultados contradictorios cuando se ha utilizado para la disminución de las estenosis laringotraqueales tanto en forma experimental como clínica. ^{29, 30, 31, 37,}

38

COLAGENA POLIVINIL PIRROLIDONA

La colágena polivinil pirrolidona (CPVP) en esponja o solución es un fármaco preparado con colágena obtenida de piel porcina, combinada con polivinilpirrolidona que potencia su efecto. Se le han dado diversos efectos terapéuticos en pérdidas cutáneas, úlceras, áreas donadoras de injertos, heridas accidentales, quemaduras de segundo y tercer grados, en fibrosis localizada, entre otras³⁹, debido a que participa en la eliminación del exceso de colágena depositada y en la remodelación del tejido conectivo relacionado. Su metabolismo es el mismo que el de la colágena

endógena, degradándose en la MEC principalmente por medio de colagenasas intersticiales; los péptidos de degradación se metabolizan por enzimas gelatinasas y posteriormente por otras enzimas inespecíficas, dando como subproductos aminoácidos libres y oligopeptidos, en 95% se excreta por orina en menos de 24hrs.³⁹

In vitro, actúa en los fibroblastos y macrófagos modulando el metabolismo de la colágena. In vivo actúa modulando el proceso inflamatorio crónico de la fibrosis al disminuir factores proinflamatorios como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el TGF- β 1, el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleucina β 1 (IL- β 1), así como las moléculas de adhesión celular que favorecen la diapédesis leucocitaria, como las moléculas de adhesión de los leucocitos al endotelio (ELAM-1) y la molécula de adhesión vascular (VCAM-1), esto favorece el recambio de los componentes de la MEC y la consecuente eliminación del exceso de proteínas fibrosas. ³⁹ Este fármaco se ha utilizado en varios tejidos incluyendo piel, uretra y experimentalmente en la tráquea con buenos resultados para disminuir la cantidad de colágena formada por gramo de tejido, fibrosis e inflamación ^{34,40}.

PIRFENIDONA

La pirfenidona (5-metil-1-fenil-2- [1H] -piridona) es un compuesto novedoso con actividad antiinflamatoria, antioxidante y efectos antifibróticos,^{34,41,42} que fue desarrollado inicialmente como un agente antihelmíntico y antipirético.⁴² Modelos animales experimentales de fibrosis pulmonar han demostrado que la pirfenidona

ejerce sus efectos mediante la reducción de los niveles de citocinas inflamatorias, tales como factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), proteína quimioatrayente de monocitos 1, interleucina-1 β , e interleucina-6, por la regulación negativa de transcripción de factores de crecimiento profibróticos, incluyendo (TGF- β), y mediante la reducción de peroxidación de lípidos y estrés oxidativo. Estudios clínicos y experimentales de fibrosis pulmonar, renal y hepática han demostrado la efectividad de la pirfenidona al aumentar la sobrevida y la función de estos tejidos, 42-45.

Este es un fármaco altamente soluble en medios acuosos y atraviesa las membranas celulares sin requerir un receptor, su administración oral permite una absorción gastrointestinal, lo que permite su distribución en la mayoría de los tejidos e incluso atraviesa la barrera hemato-encefálica. Alcanza su concentración máxima en sangre después de 1 a 2 horas tras la ingesta y es excretada en la orina 42. Este fármaco en estudios experimentales de cicatrización traqueal ha mostrado que disminuye la expresión de TGF- β 1, deposición de colágena y la inflamación⁴⁶, pero su efecto sobre la expresión de la fibronectina aún no ha sido estudiado.

JUSTIFICACION

Se estima que entre un 5 a 20% de los pacientes intubados o traqueostomizados presenta estenosis laringotraqueal⁴⁷, el INERICV es un centro de referencia para el tratamiento de esta patología, sin embargo, este tipo de lesiones cursa con una respuesta inflamatoria intensa tanto por la lesión inicial de la vía aérea como por el tratamiento quirurgico posterior, esto provoca la formación excesiva de fibrosis e inclina la balanza para la formación de una cicatriz fibrótica. En la literatura se ha reportado clínica y experimentalmente el uso de técnicas endoscópicas y abiertas (resección y anastomosis termino terminal del segmento afectado) combinado con la aplicación de medicamentos como MC y CPVP para modular la cicatrización, pero no han tenido el éxito deseado ya que la primera no evita la reestenosis y la segunda tiene que aplicarse varias veces por vía intratraqueal; por lo que hay que buscar nuevos moduladores de la cicatrización. La PIRFE es un fármaco antiinflamatorio y antifibrótico que ha sido útil en la fibrosis pulmonar, renal y hepática. Por esta razón, en este estudio se propone estudiar el efecto de la PIRFE sobre la expresión de fibronectina y cantidad de colágena formada en la cicatriz traqueal, después de realizar una anastomosis termino-terminal de tráquea cervical de rata.

HIPÓTESIS

La pirfenidona, es un fármaco que modifica la expresion de fibronectina, respuesta inflamatoria, y deposición de colágena durante la cicatrización de los tejidos, por lo que la aplicación de esta posterior a una resección y anastomosis termino-terminal

de tráquea cervical, mejorara la cicatrización traqueal y evitara reestenosis postquirúrgica.

OBJETIVOS

OBJETIVO:

Determinar los cambios macroscópicos, microscópicos, expresión de fibronectina y deposición de colágena en la cicatriz traqueal de ratas con resección y anastomosis termino-terminal de tráquea cervical tratadas con PIRFE, CPVP y MC.

Objetivos específicos:

- Valorar el efecto de la aplicación de diferentes moduladores de la cicatrización sobre los cambios macroscópicos que se producen en la cicatriz traqueal de ratas con anastomosis termino terminal cervical
- Evaluar el efecto de la aplicación de diferentes moduladores de la cicatrización sobre los cambios microscópicos que se producen en la cicatriz traqueal de ratas con anastomosis termino terminal cervical
- Determinar el efecto de la aplicación de diferentes moduladores de la cicatrización sobre los cambios en la expresión inumohistoquímica de fibronectina que se producen en la cicatriz traqueal de ratas con anastomosis termino terminal cervical

- Cuantificar bioquímicamente la deposición de colágena en la cicatriz traqueal de ratas con resección y anastomosis termino terminal, tratadas con PIRFE, CPVP y MC.

MATERIAL Y MÉTODOS

El financiamiento de este estudio fue otorgado por el INERICV y participaron los investigadores y técnicos del Departamento de Investigación en Cirugía Experimental del INERICV, quienes proporcionaran el quirófano, monitores de signos vitales, microscopios (*OMP 19-FC Carl Zeiss, Faserbeleuchtung, West Germany*) para la realización del procedimiento quirúrgico, instrumental de microcirugía, fármacos y materiales necesarios para llevar a cabo los estudios. Además, participaron el Médico Veterinario y Zootecnista, así como los técnicos de Bioterio del mismo instituto quienes proporcionaran los animales de esta investigación. También intervinieron el personal del Departamento de Investigación en Morfología del INERICV, quienes procesaron las muestras de los tejidos sometidos a estudio.

Animales de experimentación.

Se utilizaron 40 ratas Wistar, clínicamente sanas sin importar sexo o edad, con un peso aproximado de 250 a 350 gramos, las cuales fueron manejadas de acuerdo a las especificaciones técnicas para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana y la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* de los Estados Unidos ^{48,49}.

Criterios de inclusión

Se incluyeron ratas Wistar clínicamente sanas, sin antecedentes de alguna enfermedad respiratoria durante su estancia en el bioterio del INERICV ni previo al procedimiento quirúrgico.

Criterios de exclusión

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

Criterios de eliminación

Todo animal que presento signos clínicos de cualquier patología que fue provocada por el procedimiento quirúrgico se eliminó.

Criterios de terminación

Aquellos animales que muestren signos de dolor agudo o crónico, de acuerdo a lo descrito por *The Rat Grimace Scale*⁵⁰ o signos de enfermedad respiratoria

relacionada con el procedimiento y que no disminuya con la aplicación de medicamentos, fueron sometidos a eutanasia con sobredosis anestésica utilizando pentobarbital sódico (Anestesal, Pfizer S.A. de C.V. Guadalajara, México).

Grupos de Estudio.

A todos los animales se les realizó resección de tres anillos traqueales cervicales y anastomosis termino-terminal del segmento reseado y recibieron tratamiento tópico o vía oral dependiendo del grupo de estudio. Los animales se dividieron en 4 grupos de estudio:

Grupo I (n=10): Traqueoplastía con aplicación extraluminal de solución fisiológica.

Grupo II (n=10): Traqueoplastía con administración de pirfenidona 40 mg/Kg de peso vía oral (VO) durante todo el estudio.

Grupo III (n=10): Traqueoplastía con aplicación extraluminal de 2.5 mg CPVP.

Grupo IV (n=10): Traqueoplastía con aplicación extraluminal de 1.2 mg MC.

Anestesia.

Todos las ratas fueron anestesiadas con ketamina (Anesket®, Pisa, Guadalajara, México) 70mg/kg/IP y xilazina (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Alemania) 5mg/kg/IP. Una vez anestesiadas se les administrara como analgésico preoperatorio meglumina de flunixin (Napzin®, Pisa, México, DF, México) 4 mg/kg/SC y

enrofloxacina (Baytril®, Bayer, Leverkusen, Alemania) a dosis de 5 mg/kg/SC de cómo antibiótico⁵¹. Durante la cirugía y la recuperación anestésica, por medio de un monitor de signos vitales (Datascope Passport 5 Lead Monitor®, Mindray Medical International, Shenzhen, China) se monitorizó la frecuencia cardiaca (FC) frecuencia respiratoria (FR) y saturación de oxígeno (SaO₂) durante todo el procedimiento quirúrgico y hasta la recuperación anestésica.

Técnica quirúrgica.

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

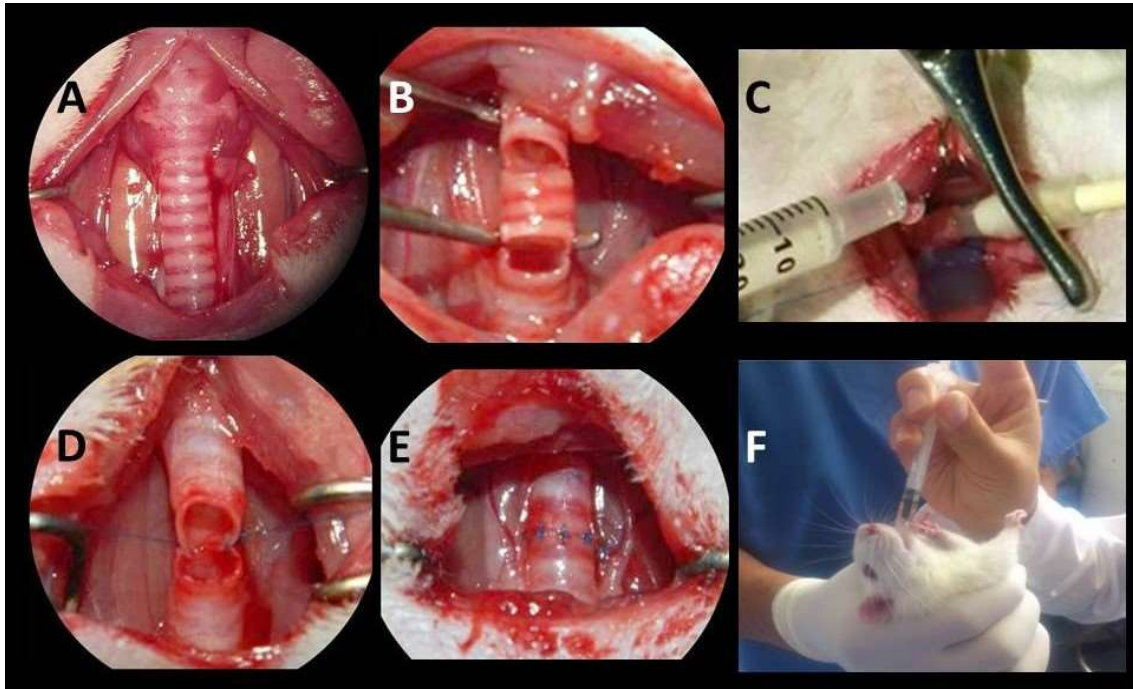


Figura 1. Técnica quirúrgica: A) Exposición de tráquea cervical, B) Disección y resección de segmento traqueal, C) Aplicación tópica del tratamiento sobre los bordes del segmento resecado en los grupos I, III y IV, D) Anastomosis de la porción membranosa de la tráquea, E) Fin de anastomosis y F) Aplicación del tratamiento VO en el grupo II.

Tratamiento.

En los grupos I, III y IV, el tratamiento se aplicó durante el procedimiento quirúrgico directamente sobre ambos extremos de la tráquea resecada (antes de llevar a cabo la anastomosis) (Figura 1C); mientras que en el grupo II se administró vía oral.

En el grupo I se instilo 1 mililitro de solución fisiológica (SSF). En el grupo III se aplico extraluminalmente 2.5 mg CPVP dosis utilizada experimentalmente para cicatrización traqueal ³⁴ y en el grupo IV 1.2 mg de MC (dosis utilizada para

estenosis traqueal y cinco minutos después de haber sido instilado el fármaco, la tráquea fue lavada con SSF²⁹. En el grupo II, los animales recibieron 40 mg/Kg/día (dosis utilizada para el tratamiento de fibrosis pulmonar en modelos experimentales) de PIRFE (KitosCell, Cell Pharma S. de R.L. de C.V., Mexico, DF) administrada en 2 dosis por vía oral (VO) durante 4 semanas (Figura 1F) ^{44,45}.

Evaluación

El estudio tuvo una duración de 28 días y al concluir este tiempo todos los animales fueron sometidos a eutanasia con sobredosis de pentobarbital sódico (150mg/kg/IP) (Anestosal, Pfizer S.A. de C.V. Guadalajara, México)^{48,49,51} y se evaluó macroscópicamente la cicatrización de la anastomosis, presencia de dehiscencia, infección y la formación de fístulas. Concluida esta evaluación, se retiró el segmento traqueal anastomosado para la evaluación de la luz traqueal.

Tamaño del diámetro de la luz traqueal mediante morfometría

Una vez extraído el segmento traqueal anastomosado, el cual incluía un anillo proximal y uno distal, se evaluó morfométricamente el diámetro de la luz traqueal postcirugía y se comparó con la luz de los anillos retirados durante la traqueoplastia para obtener el grado de estenosis postcirugía. Para esta evaluación se colocaron los anillos traqueales anastomosados sobre una escala milimétrica y con el mismo microscopio utilizado para la cirugía se tomaron fotografías de la luz traqueal, para posteriormente calcular el diámetro de la luz traqueal, la cual se comparó con el diámetro de los anillos resecados durante la traqueoplastia⁵². Al término de esta evaluación las muestras fueron divididas en 2 porciones por grupo: una para el

estudio microscópico e inmunohistoquímico y otra para la determinación del depósito de colágena en la cicatriz formada.

Microscópica

Para la evaluación microscópica las muestras tomadas de los sitios de anastomosis se fijaron en formaldehído al 10% y a las 24 horas se incluyeron en parafina, se les realizaron cortes de 3µm, se tiñeron con hematoxilina-eosina, así como tricrómica de Masson y se les evaluó la presencia de fibrosis, forma y distribución de la fibras de colágena, grado de inflamación y neovascularización.

La evaluación de éstos se realizó en toda la circunferencia de la muestra mediante una escala semicuantitativa descrita por Veiga⁵³ en la cual a cada parámetro evaluado se le asignó un grado de acuerdo a la intensidad de los cambios histopatológicos (Grado 1: ausente 0-10%, Grado 2: leve 11-25%, Grado 3: moderado 26-50% y Grado 4: severo 51-100%).

Determinación de la expresión Inmunohistoquímica de Fibronectina.

La determinación de la expresión *in situ* del fibronectina en la cicatriz traqueal se llevó a cabo por inmunohistoquímica, para esto a las muestras incluidas en parafina se les realizaron cortes de tres micras y se montaron en laminillas silanizadas. Para desparafinarlas se pusieron en una estufa (Fisher Scientific) a 60°C durante 30 minutos, se deshidrataron mediante transferencia en xilol por cinco minutos y posteriormente un minuto hasta Alcohol 96%, después se colocaron en una cámara

de recuperación de antígenos con buffer de citratos pH 6, el antígeno se recuperó con calor en baño húmedo (StableTemp®, Cole Parmer®) a 60°C por 30 minutos, se dejaron enfriar y se lavaron con Tris-Buffered Saline with Tween (TBST) tres veces por cinco minutos. La peroxidasa endógena se removió con peróxido de hidrógeno al 30% (J.T. Baker, Méx.) diluido (1:9 en H₂O desionizada) durante 15 minutos y se lavó nuevamente en tres tiempos de cinco minutos con TBST. Posteriormente se agregó suero bloqueador (Vectastain Universal Quick Kit., Burlingame, CA) durante 15 minutos a temperatura ambiente para el bloqueo del pegado inespecífico y se lavo nuevamente. Una vez que se llevaron a cabo los pasos anteriores las secciones de tejido fueron incubadas con anticuerpo policlonal de conejo para fibronectina (Ab2413, USA) a una concentración de 5µg/ml durante 24 horas a 4°C, pasado este tiempo se lavaron nuevamente en tres ocasiones con TBST por cinco minutos cada uno y se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo biotilnado universal (Vectastain Universal Quick Kit, Burlingame,CA) 10 minutos, se lavó al final en tres tiempos de cinco minutos, posteriormente se utilizó el sistema Biotina-Estreptavidina-Peroxidasa (Vectastain Universal Quick Kit., Burlingame, CA) y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y nuevamente se lavaron como ya se describió, se utilizó 3,3´Diaminobencidina (DAB) (BioCare Medical, USA) como revelador durante cinco minutos, para virar el contraste se utilizó una solución saturada de Carbonato de Litio (Fisher Chemical,USA) y finalmente se tiñeron con Hematoxilina. En todos los grupos se realizaron controles negativos, a los cuales no se les agregó anticuerpo primario. Una vez realizada la tinción se cuantifico la expresión de fibronectina en toda la

circunferencia de la muestra utilizando el software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), desarrollado por el National Institute of Health (NIH)) y el plugin IHC Profiler.⁵⁴

Determinación de colágena formada por miligramo de tejido mediante el método Sircol.

La determinación del depósito de colágena en la cicatriz traqueal se realizó mediante el ensayo Sircol⁵⁵. Una vez colectadas las muestras de la anastomosis traqueal fueron congeladas y lisadas, en el sobrenadante obtenido se cuantifico la concentración de proteínas totales mediante el método de Lowry utilizando el Kit SircolTM (Sircol Kit Pack Standard Assay Kit Product Code: S1000, Biocolor, UK). Al término del ensayo se llevó a cabo la lectura para cuantificar el depósito de colágena, a una longitud de onda de 555 nm con un espectrofotómetro Epoch (Bio-teck Instruments, Winooski, USA).

Análisis estadístico

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

RESULTADOS

Todos los animales sobrevivieron al procedimiento quirúrgico, pero no al tiempo de estudio establecido, debido a que 2 animales del grupo II(PIRFE) y 2 del grupo IV (MC) tuvieron que ser sometidos a eutanasia, uno de cada grupo en la 3ª semana postcirugía y el otro en la 4ª semana. Al igual que para 1 animal de los grupos I (SSF), y III (CPVP) en donde a la 3ª semana tuvieron que ser sometidos a eutanasia, en todos los casos por presentar insuficiencia respiratoria de esta forma 8 animales de los grupos II y IV y 9 de los grupos I y III sobrevivieron al final del estudio.

HALLAZGOS MACROSCÓPICOS

Macroscópicamente, en ningún caso se presentó dehiscencia de la anastomosis, infección o fístulas. La anastomosis se observó bien cicatrizada en todos los casos, pero en los animales de los grupos I y IV se mostró inflamada y fibrótica, (Figura 2A y 2D), así mismo en los animales del grupo de MC que no concluyeron el tiempo de estudio la luz traqueal se observó disminución de la luz traqueal mayor al 50% (Figura 3D).

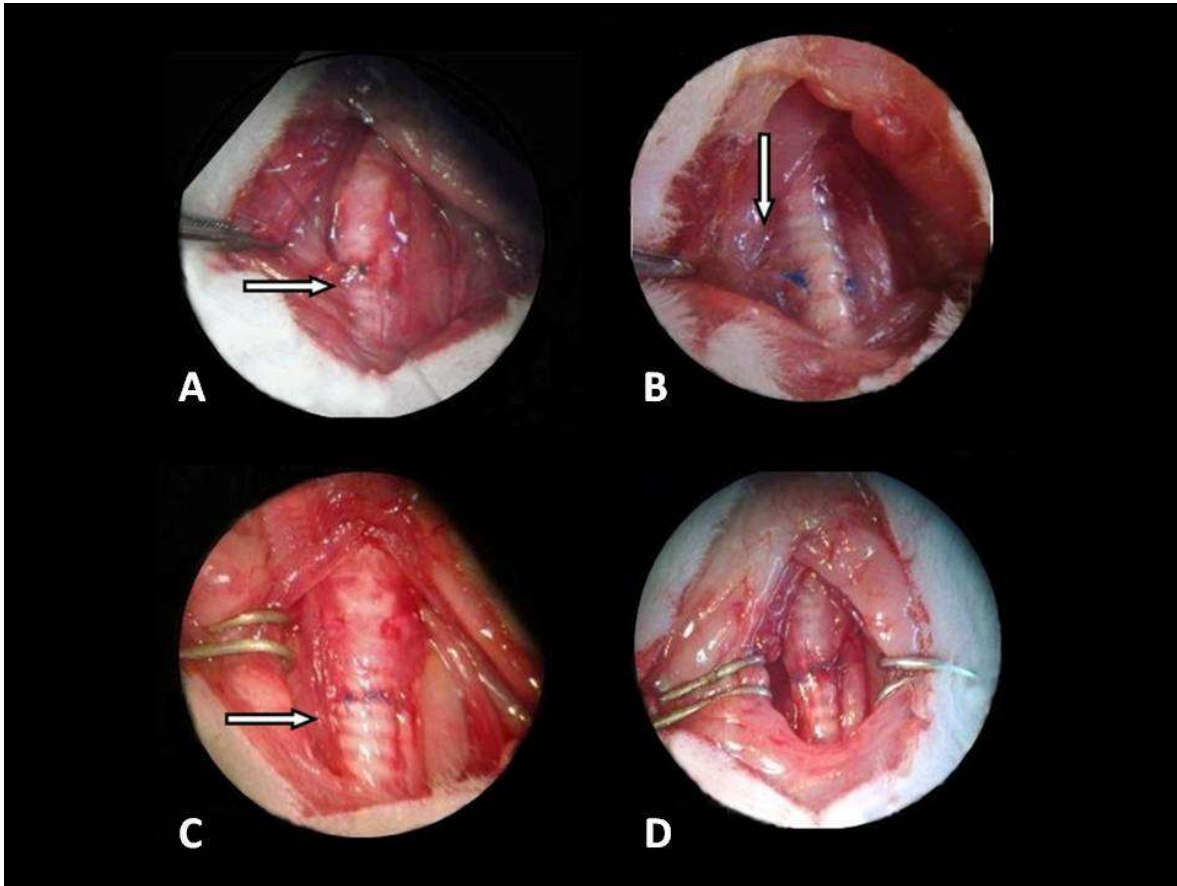
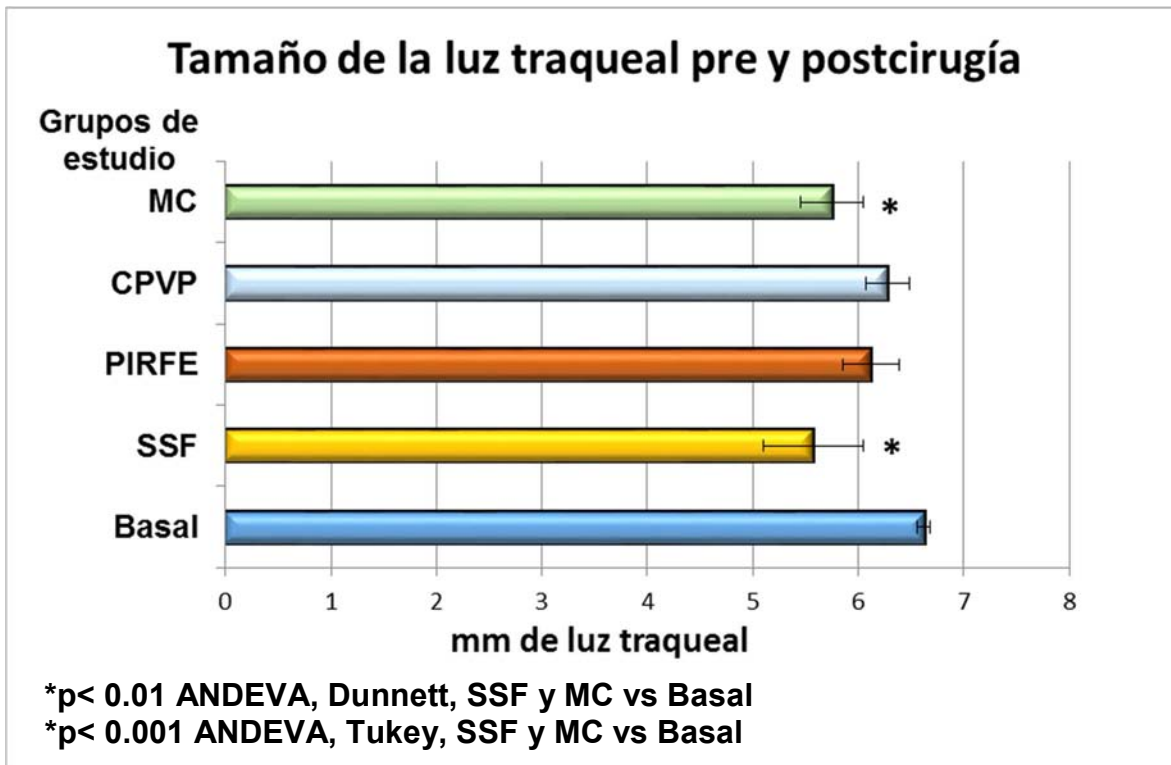


Figura 2. Fotografía tomada al final del estudio en la que se observa la buena cicatrización en los grupos tratados con PIRFE (B) y CPVP (C), así como la inflamación y fibrosis en los animales de los grupos I y IV, respectivamente (A y D).

HALLAZGOS MORFOMÉTRICOS

Al valorar morfométricamente el tamaño de la luz traqueal pre y postcirugía, se observó que en todos los grupos disminuyó el tamaño de esta; sin embargo los grupos tratados con CPVP y PIRFE mantuvieron valores similares a los basales, pero los tratados con SSF y MC la luz disminuyó de manera significativa en comparación con la luz de los anillos controles ($p < 0.01$, ANDEVA, Dunnett) (Gráfica 1) (Figura 3).



Gráfica 1. Disminución de la luz traqueal en todos los grupos de estudio 1 mes después del procedimiento quirúrgico en comparación con sus valores basales.

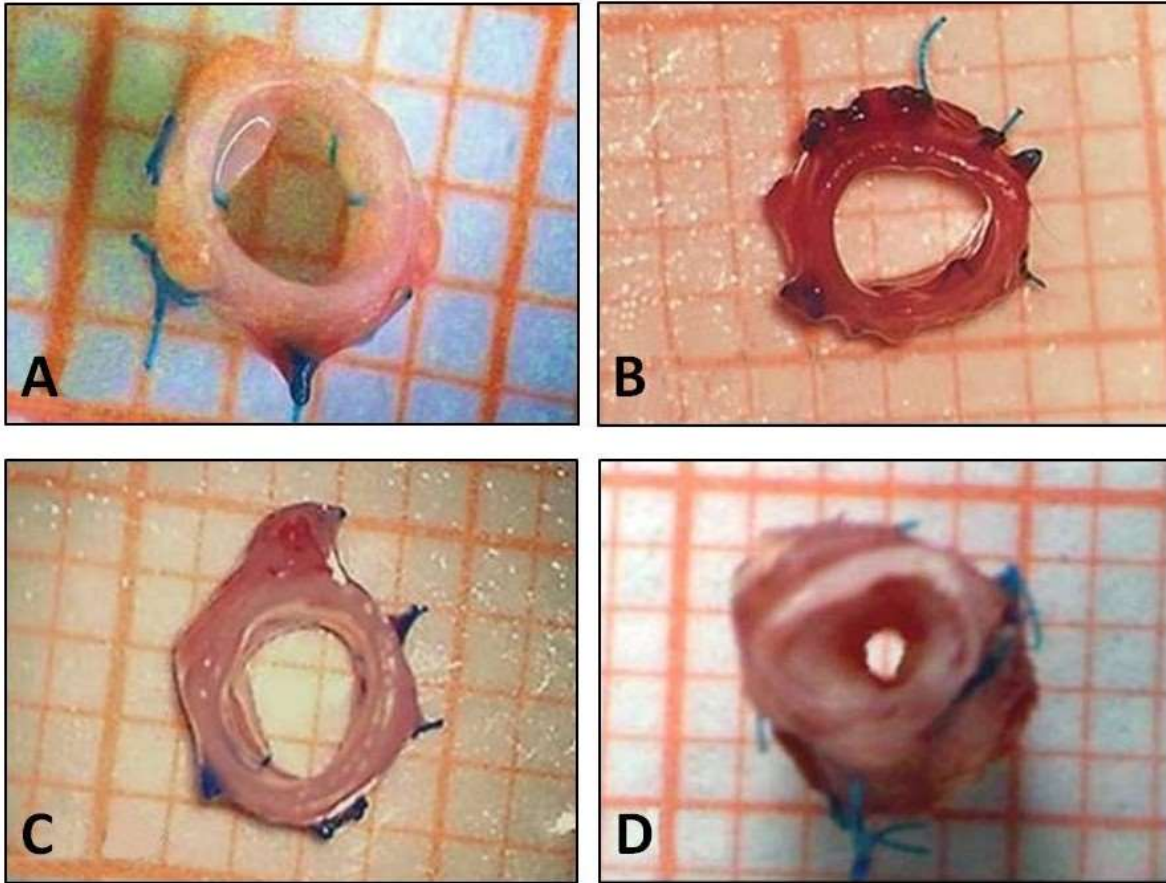
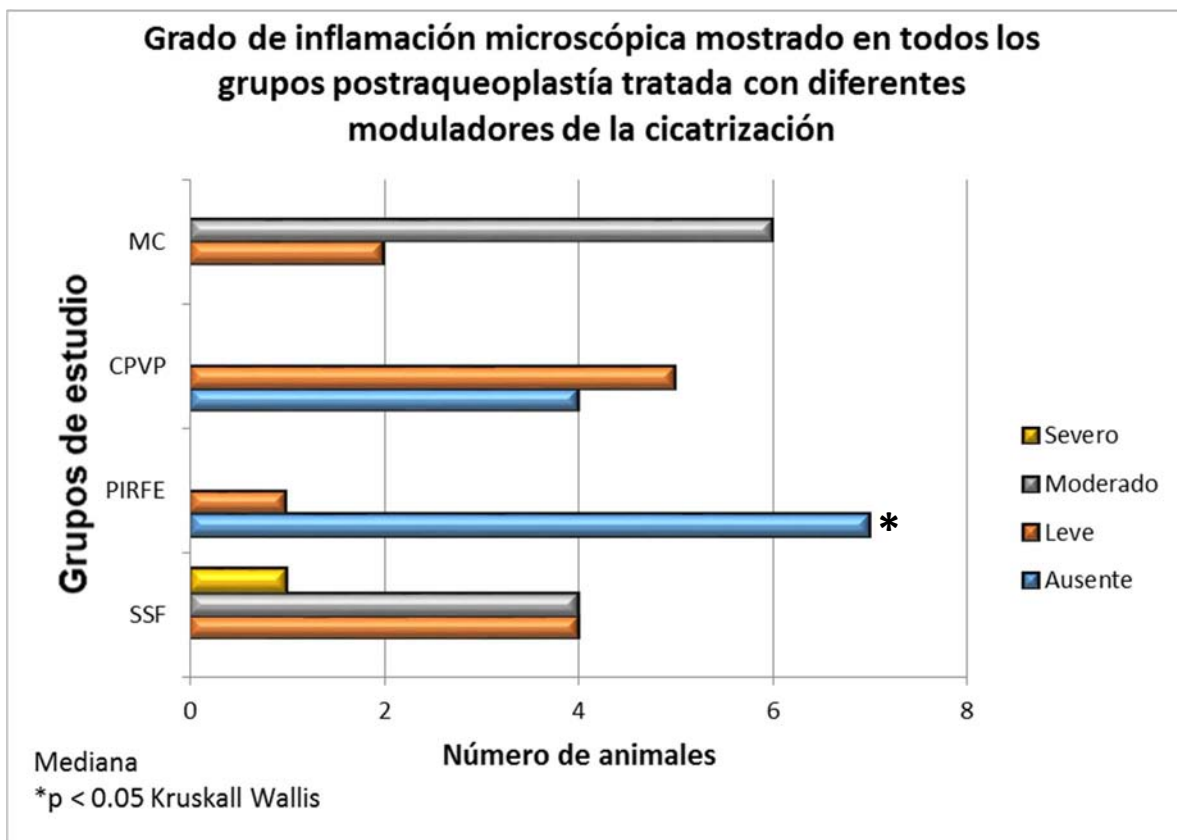


Figura 3. Fotografía que muestra el tamaño de la luz traqueal al final del estudio en todos los grupos. A) Grupo I, B) Grupo tratado con PIRFE, C) Grupo de CPVP y D) Se observa la estenosis traqueal desarrollada por un animal del grupo de MC.

HALLAZGOS MICROSCÓPICOS

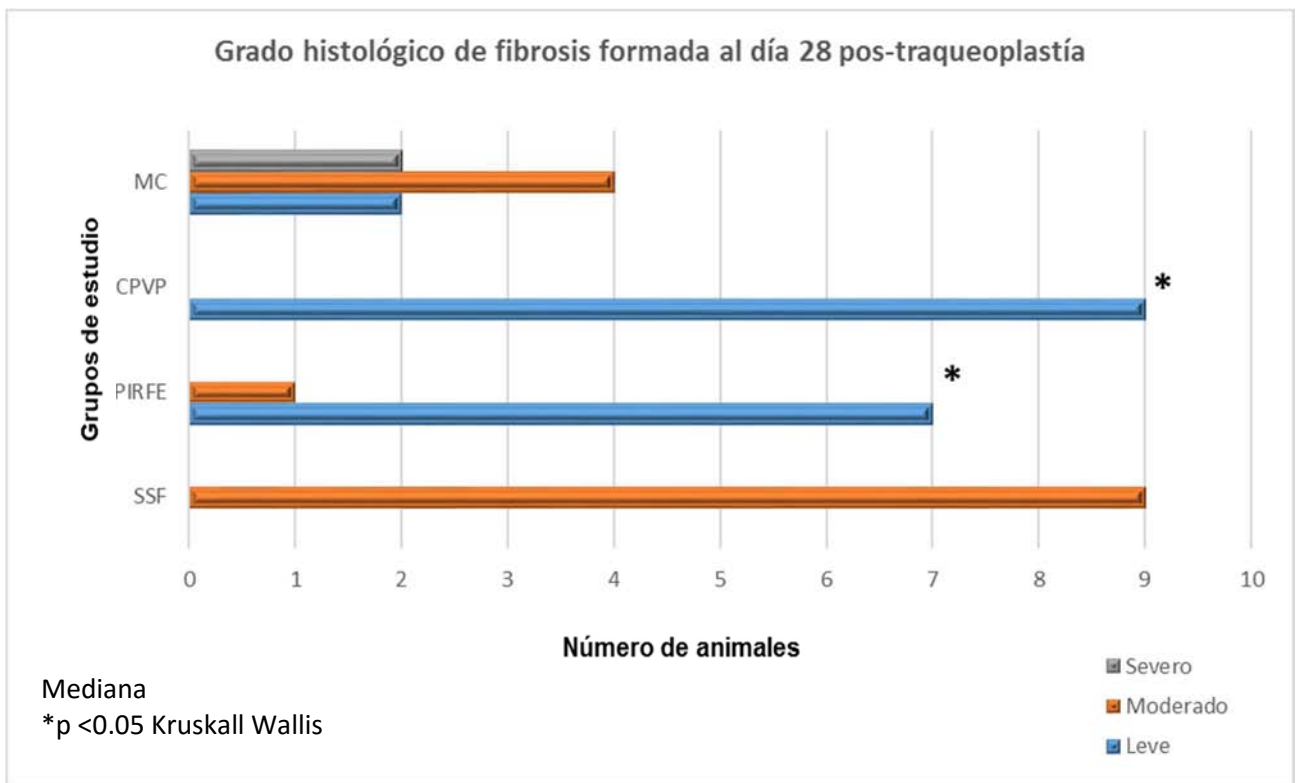
Microscópicamente todos los anillos controles mostraron apariencia normal. Al valorar la inflamación se observó que en los animales del grupo I, el 55% de los animales del grupo I desarrollaron inflamación moderada, 33% leve y 11% severa. En el grupo II (PIRFE) solo el 10% de los animales desarrollo inflamación leve, Los animales tratados con CPVP, el 55% de los casos presentó inflamación leve y el 45% restante moderada mientras que en el grupo de MC el 75% de los animales

desarrollo inflamación moderada y el 25% leve. Al comparar entre grupos la ausencia de inflamación microscópica presentada por los animales tratados con PIRFE, fue significativa en comparación con los otros grupos de estudio ($p < 0.05$ Kruskal Wallis) (Gráfica 2). Esta inflamación fue a base de linfocitos; sin embargo, la presencia de estos fue mayor en los grupos I y IV, pero sólo se observaron cambios estadísticamente significativos entre el grupo I y el tratado con PIRFE ($p < 0.05$ Kruskal Wallis).



Grafica 2. Relación entre el número de animales y el grado de inflamación que desarrollaron los animales en cada grupo de estudio.

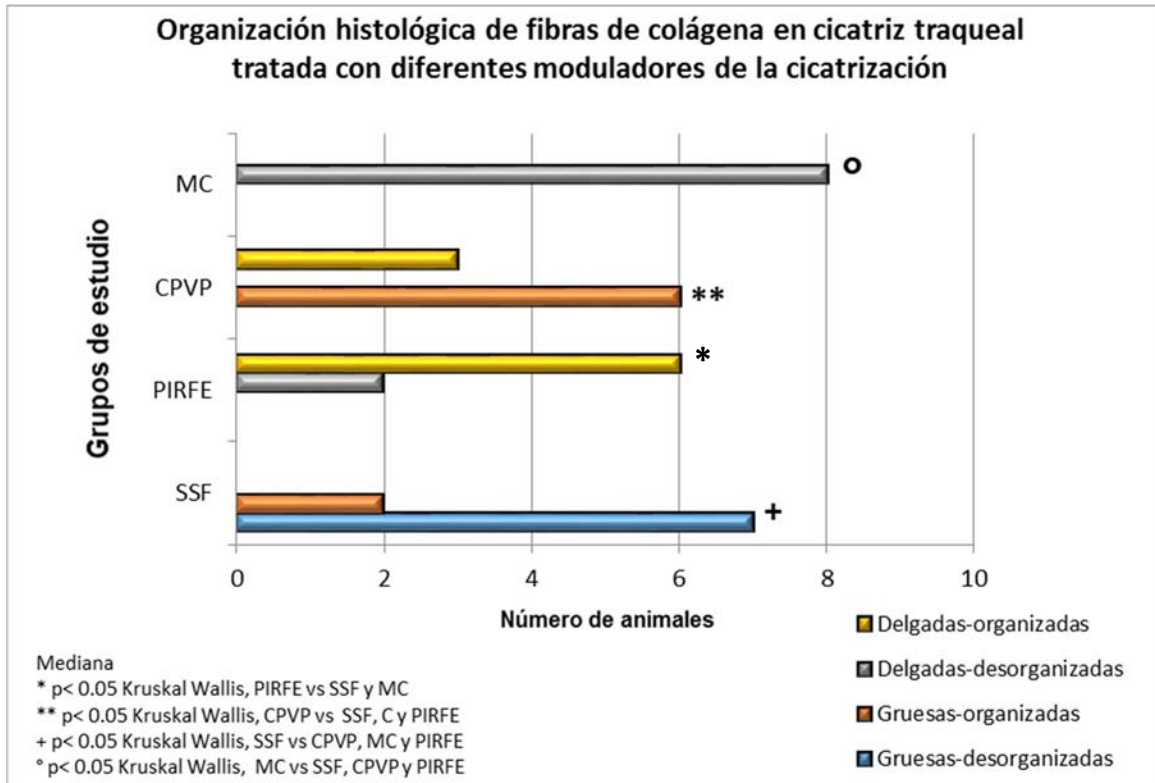
Al valorar el grado de fibrosis formada al final del estudio, los animales tratados con SSF y MC desarrollaron fibrosis moderada; mientras que los tratados con CPVP y PIRFE mostraron fibrosis leve ($p < 0.05$ Kruskal Wallis) (Gráfica 3) (Figura 4). Además, los animales del grupo I desarrollaron fibras de colágena gruesas y desorganizadas, los tratados con PIRFE delgadas organizadas, los de CPVP gruesas organizadas, los de MC delgadas y desorganizadas.



Gráfica 3. Relación entre el grado de fibrosis mostrado por los animales sometidos a tratamiento con los diferentes MDC.

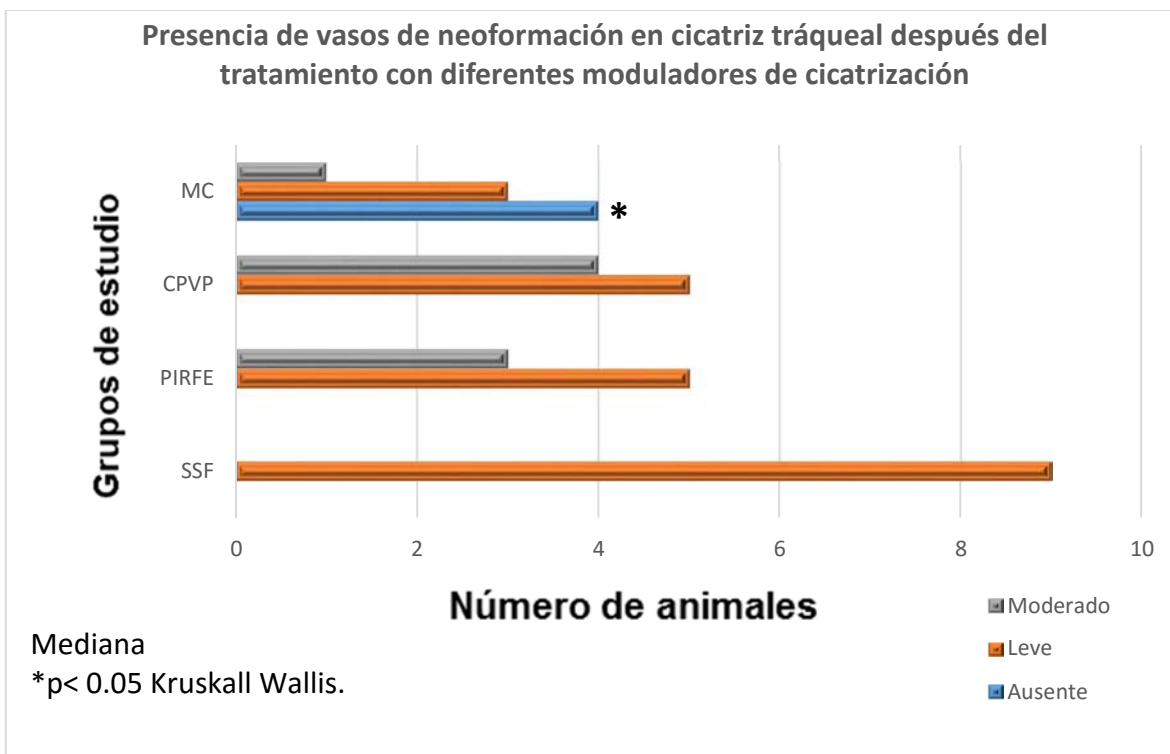
Al evaluar la organización de las fibras de colágena, se observó que los animales del grupo I desarrollaron fibras de colágena gruesas y desorganizadas, los tratados

con CPVP gruesas organizadas, los de MC delgadas desorganizadas y los tratados con PIRFE delgadas organizadas. Al comparar entre grupos lo mostrado por cada uno fue significativo vs los otros grupos de estudio ($p < 0.05$ Kruskal Wallis) que al comparar entre grupos fue significativo (Gráfica 4) (Figura 4).



Gráfica 4. Muestra el grosor y organización histológica de las fibras de colágena al final del estudio en todos los grupos.

En todos los casos se observó presencia de vasos de neoformación, leve en el grupo I, leve a moderado en el grupo II y III, mientras que en el grupo IV fue leve en el 50% de los casos y ausente en el 50% restante, lo cual fue significativo ($p < 0.05$ Kruskal Wallis) en comparación con los otros grupos de estudio (Gráfica 5) (Figura 4).



Gráfica 5. Relación entre el número de animales y desarrollo de nuevos vasos sanguíneos en todos los grupos de estudio.

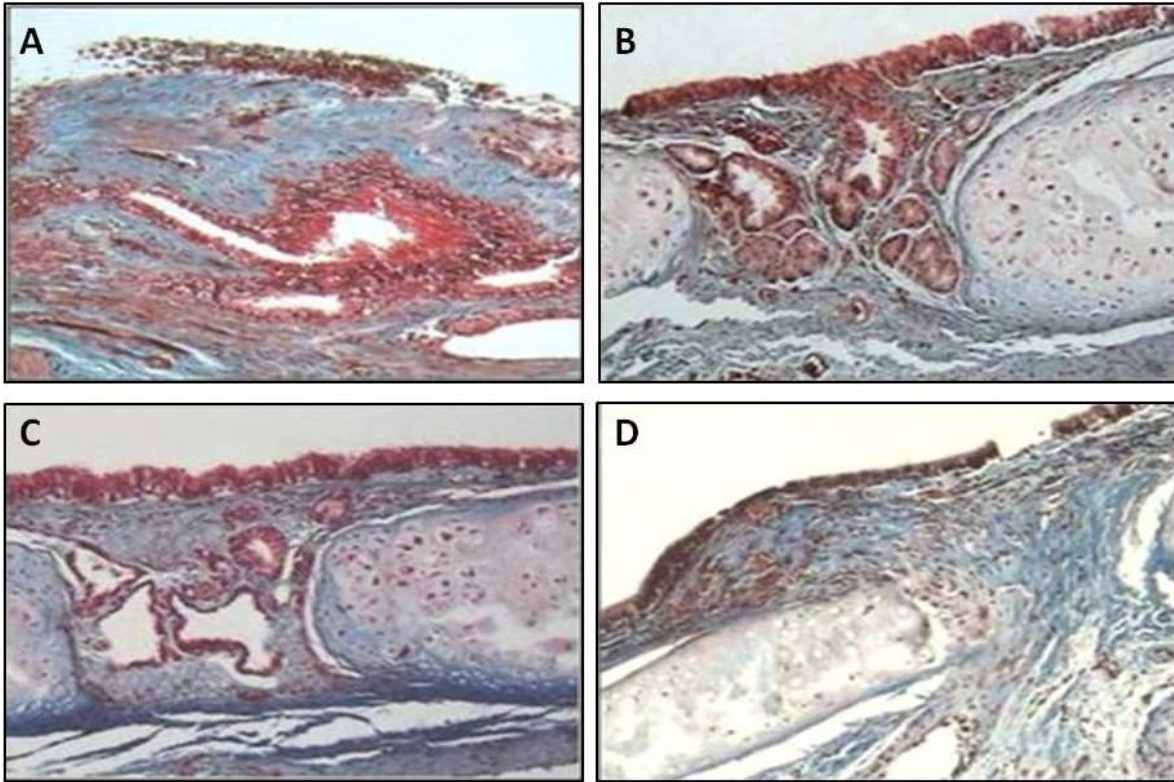
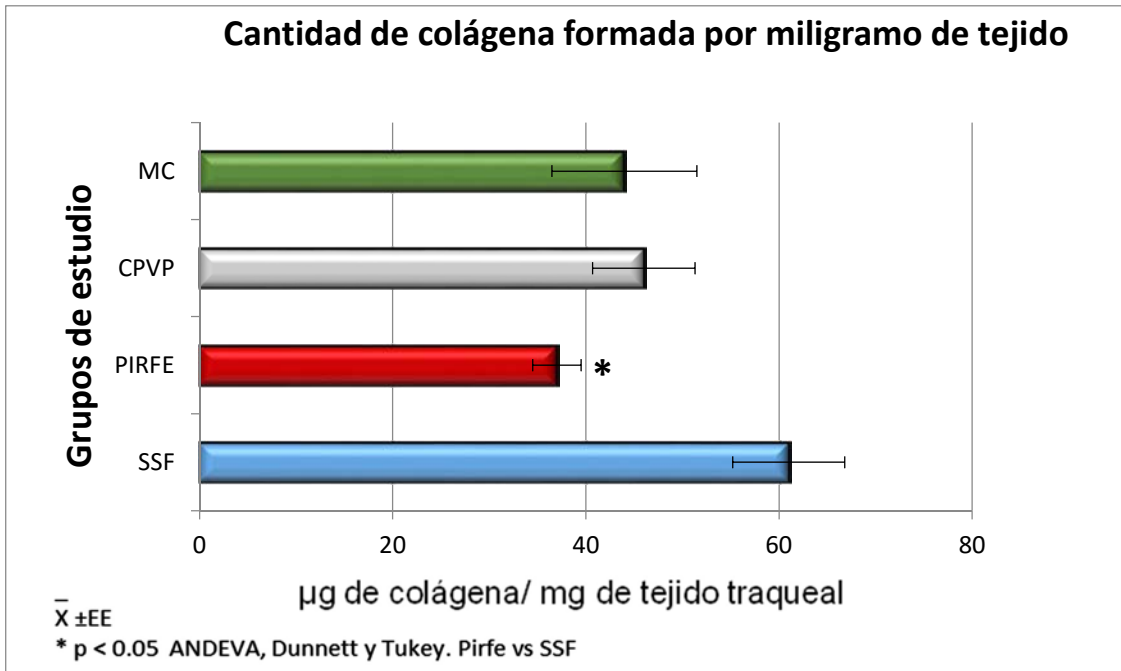


Figura 4. Fotomicrografías en las que se observa: A) Moderada cantidad de fibras de colágena gruesas desorganizadas en el grupo I. B) Leve cantidad de fibras de colágena delgadas y organizadas en los animales tratados con PIRFE C) leve cantidad de fibras de colágena gruesas y organizadas en el grupo de CPVP. D) Fibrosis moderada con fibras de colágena delgadas y desorganizadas. En A, B y C se muestran vasos de neoformación (Masson 10X).

HALLAZGOS BIOQUÍMICOS

Al evaluar la cantidad de colágena formada por miligramo de tejido posttraqueoplastía, se observó que en todos hay deposición de colágena; pero la producida en los grupos que recibieron tratamiento con alguno de los fármacos moduladores de la cicatrización fue comparativamente menor que la de los del

grupo control (SSF). Al comparar entre grupos se observó que la menor producción de colágena en el grupo tratado con PIRFE (II) sólo fue significativa en comparación con el grupo I(SSF) ($p < 0.05$ ANDEVA, Dunnett, Tukey) pero no entre los demás grupos en los que se utilizo un fármaco modulador de la cicatrizacion (Gráfica 6).



Gráfica 6. Muestra el depósito de colágena en la cicatriz traqueal por grupo de estudio, veintiocho días después de la cirugía traqueal.

HALLAZGOS INMUNOHISTOQUIMICOS

En la evaluación realizada se encontró una disminución en la presencia de fibronectina en los grupos tratados con PIRFE y CPVP ($P < 0.05$) en comparación con el grupo I pero sin diferencia significativa entre los demás grupos

DISCUSIÓN

La reparación de los tejidos es un proceso natural que se lleva a cabo mediante la cicatrización y se inicia cuando el tejido se lesiona. Durante este proceso el tejido dañado será reemplazado por un tejido similar al existente, dependiendo de la eficiencia y control con la que se lleven los procesos de señalización, la cicatriz generada puede ser normal o patológica. ^{1,2,56}

La cicatrización patológica se caracteriza por una acumulación excesiva de colágena, se ha comprobado que una prolongación de la fase inflamatoria es una de las causas⁵⁶ para esto se requiere de la actividad de diferentes células incluyendo a los fibroblastos que son las principales células efectoras durante este proceso⁷ y se ha descrito que durante esta fase la fibronectina estimula al fibroblasto y promueve su supervivencia, migración y movimiento a través de la MEC^{7,57,58}

En las heridas crónicas el proceso de cicatrización se encuentra activo en diferentes fases y se ha demostrado tanto in vivo como in vitro, que en la cicatrización patológica se encuentra una regulación alta de la expresión de fibronectina y deposición de colágena tipo I en la MEC.^{7,58,59} En la tráquea, cuando se produce una cicatriz fibrótica se produce estenosis y la consecuente obstrucción al flujo de aire ²¹.

En la actualidad los procedimientos para el tratamiento de la estenosis laringotraqueal puede ser endoscópicos o abiertos siendo los segundos los que tienen mejores resultados.⁶⁰

Las indicaciones para el tratamiento endoscópico de la estenosis laringotraqueal no están claramente definidas, sin embargo autores como Monnier han desarrollado algoritmos para el manejo de esta patología en la cual recomienda realizar

tratamientos endoscópicos como primer intento en las estenosis subglóticas con clasificación de la estenosis I o II, longitud de la estenosis en dirección cráneo caudal menor de 1.5cm y si la estenosis es principalmente membranosa con adecuado soporte cartilaginoso. Mientras que el tratamiento abierto se recomienda para estenosis clasificadas grado III y IV.⁶¹

El uso de moduladores de la cicatrización como tratamiento adyuvante del quirúrgico se ha reportado en la literatura con diferentes medicamentos tales como mitomicina C, ácido hialurónico, esteroide y recientemente CPVP, sin embargo no han tenido el éxito deseado porque no evitan la reestenosis o tienen que aplicarse en varias ocasiones por vía intratraqueal; por lo que es necesario buscar otros fármacos moduladores que eviten esto ^{2, 29,34,40,45 46.}

La PIRFE es un fármaco antioxidante y antiinflamatorio que se ha observado que disminuye la expresión y deposición de colágena de diversas patologías como la fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, esclerosis múltiple, y en múltiples condiciones que involucran fibrosis.^{41,42,23,45,62} Se ha descrito que sus efectos se deben a que genera una regulación a la baja de genes profibrogénicos como TGFβ1, el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas,⁶² pero su efecto sobre la expresión de fibronectina en la cicatrización traqueal no se ha descrito; por esta razón en este estudio se analizó la expresión de fibronectina y la deposición de colágena durante la cicatrización traqueal de ratas con resección y anastomosis término-terminal de tráquea cervical tratadas con PIRFE, CPVP y MC, así como su efecto sobre la arquitectura macroscópica y microscópica de la tráquea cicatrizada

Los hallazgos macroscópicos y morfométricos denotan la tendencia que tiene la tráquea a disminuir su luz durante la cicatrización ya sea por la presencia de inflamación o incremento en la producción de colágena, ya que al final del estudio en todos los grupos intervenidos desarrollaron una disminución de la luz traqueal posterior al procedimiento quirúrgico, independientemente del grupo analizado; sin embargo, la reducción de la luz traqueal fue más importante en los grupos I (SSF) y IV (MC), probablemente porque la SSF y la MC no tienen actividad antiinflamatoria³², CPVP y PIRFE que si tiene este efecto como lo describió Olmos et al en otros trabajos en los que se utilizó la CPVP y la MC como moduladores de la cicatrización traqueal en perros³⁴, y Solis et al⁶³ También coinciden con lo observado por Zhou et al. quienes en un modelo murino de trasplante heterotópico traqueal observaron que los animales tratados con PIRFE desarrollaron menor fibrosis luminal.⁶⁴ Por otro lado los resultados obtenidos en el grupo tratado con MC concuerdan con lo observado por Iñiguez et al quienes mencionan que la ausencia de propiedades antiinflamatorias de este fármaco prolonga la cascada inflamatoria de la cicatrización y su actividad antiproliferativa, favorece la necrosis del tejido, promueve la acumulación de detritus en la herida y la disminución de la luz traqueal³²

El menor grado de inflamación microscópica observado los grupo de CPVP y PIRFE, fue probablemente originado por la actividad antiinflamatoria de los mismos, como lo han observado algunos autores que han estudiado el efecto de la CPVP en estudios clínicos y experimentales realizados en pacientes con artritis reumatoide, cicatrices hipertróficas de piel, esclerodermia, úlceras por presión y en las cicatrices postraqueoplastía y han observado que la administración a cortos y largos posee

este inhibe la inflamación aguda y crónica^{34 65,66}. Mientras que el de la PIRFE se debió a que este tiene propiedades que evitan el estrés oxidativo, lo cual inhibe el reclutamiento de células inflamatorias y la expresión de genes profibrogenicos como TGF- β 1, CTGF, IL-1,IL-6^{42,62,67}, como lo reportaron Oku et al⁴⁵ e Iyer et al⁶⁸ quienes han estudiado su efecto en modelos experimentales de fibrosis pulmonar.

Por otro lado el mayor grado de inflamación histológica que presentaron los animales de los grupos de SS y MC fue provocado porque estas drogas no tienen actividad antiinflamatoria como lo han observado Roh et al³⁰ e Iñiguez et al³² al estudiar el efecto de la MC en las estenosis traqueales y han observado que hasta 2 meses después de su aplicación, este fármaco provoca irritación del sitio lesionado, con lo que favorece la inflamación.

El grupo de CPVP presento menor infiltrado linfocitario posiblemente porque en los procesos inflamatorios crónicos, el compuesto disminuye la quimiotaxis y estimulación de los linfocitos⁶⁹, como lo observó Bazan et al⁶⁵ durante la remodelación del tejido de la vía aérea de cobayos asmáticos tratados con CPVP. En el grupo tratado con PIRFE, la menor cantidad de linfocitos se originó porque el fármaco disminuye la proliferación de los mismos como lo describieron algunos autores quienes estudiaron la involución de las cicatrices queloides y observaron esto.⁷⁰

En el grupo tratado con MC, la presencia de fibrosis moderada a severa con fibras de colágena desorganizadas en el sitio de la herida fue porque su aplicación provoca irritación del sitio lesionado e inflamación prolongada que favorece la fibrosis como lo describieron Rahbar et al²⁹ y Eliashar et al⁷¹ al estudiar el efecto de este fármaco en las estenosis traqueales. Mientras que en los grupos de CPVP y PIRFE la menor fibrosis y mejor organización histológica de las fibras de colágena observadas confirman sus propiedades para inhibir las citocinas proinflamatorias y profibrogénicas, así como la modulación de la fibrosis como en los tejidos normales.^{45,64,66,70,72}

En todos los casos se observó presencia de vasos de neoformación, leve en el grupo I, leve a moderado en el grupo II y III, mientras que en el grupo IV fue leve en el 50% de los casos y ausente en el 50% restante, lo cual fue significativo en comparación con los demás grupos de estudio y coincide con lo observado por otros autores³²,

Con respecto a la menor cantidad de neovascularización observada en el grupo de MC, fue originada porque este fármaco bloquea expresión del VEGF⁷³

EXPRESIÓN DE FIBRONECTINA

La evaluación bioquímica reveló que todos los MDC disminuyen el depósito de colágena, la CPVP por inhibir la expresión de varias citocinas proinflamatorias (Kröttsch E, Díaz de León E, Furuzawa GJ, Marquez R, Quiroz E, Citokine expresión is down regulated by collagen-polyvinylpyrrolidone in hypertrophic scars. J Invest Dermatol. 1998; 111: 828-834.) (Furuzawa-Carballeda J, Kröttsch E, Barile-Fabris L, Alcalá M, Espinosa-Morales R. *Subcutaneous administration of collagen-polyvinylpyrrolidone down regulates IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1, ELAM-1 and VCAM-1 expression in scleroderma skin lesions.* Clin Exper Dermatol. 2005; 30: 83-86.). Mientras que la PIRFE disminuye la inflamación, bloquea la producción del TGF- β 1 y otros factores profibrogénicos, además de que activa la producción de MMPs con lo que modula la vía fibrogénica (Macías-Barragán J, Sandoval-Rodríguez A, Navarro-Partida J, Armendáriz-Borunda J. The multifaceted role of pirfenidone and its novel targets. Fibrogenesis Tissue Repair 2010;3:16. <http://www.fibrogenesis.com/content/3/1/16>.), (Oku H, Shimizu T, Kawabata T, Nagira M, Hikita I, Ueyama A, Matsushima S, Torii M, Arimura A. Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: Different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. Eur J Pharm. 2008; 590: 400-408.) (Zhao XY, Zeng X, Li XM, Wang TL, Wang BE. Pirfenidone effectively inhibits carbon tetrachloride- and albumin complex-induced liver fibrosis in rodents by preventing activation of hepatic stellate cells. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2009, 36:963-8.) (Iyer SN, Gurujeyalakshmi G, Giri SN. Effects of pirfenidone on transforming growth factor-beta gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. J Pharmacol Exp Ther. 1999; 291: 367-373.). En el grupo de MC se origino porque el fármaco evita

la proliferación y replicación de los fibroblastos y estimular la apoptosis de los mismos ocasiono la menor expresión de los niveles de colágena (Solís N. Tesis: Efecto de diferentes moduladores de la cicatrización sobre la expresión de metaloproteinasa 9 en la cicatrización de traqueoplastías en perros. Maestría en Ciencias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2014.) (Wang YW, Ren JH, Xia K, Wang SH, Yin TF, Li LH. Effect of mitomycin on normal dermal fibroblast and HaCat cell: an in vitro study. J Zhejiang Univ Sci B. 2012; 13: 997-1005.)

CONCLUSIONES

El uso de CPVP como PIRFE son opciones terapéuticas que en este estudio mostraron una efectividad mayor a el estándar actual de tratamiento para estenosis laringotraqueal, sin embargo al ser un estudio en modelos animales se deben de realizar estudios en modelos humanos para validar su efectividad para adyuvancia en esta patología, al momento aunque no es la mejor opción la MC muestra beneficios en comparación al grupo control y su amplio estudio a nivel mundial en modelos humanos la hace vigente como opción terapéutica en humanos.

REFERENCIAS

1. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*. 2004; 9: 283-289.))
2. Gonzalez I. Efecto De La Aplicación De La Mezcla De Ácido Hialurónico Y Colágeno Polivinil-Pirrolidona Y De La Mitomicina C Sobre La Expresión De Decorina En La Cicatriz Postraqueoplastía En Un Modelo Experimental Canino. Tesis especialidad de otorrinolaringología. Facultad de Medicina UNAM 2013
3. Teller P., White T. K. The Physiology of Wound Healing: Injury Through Maturation, *Surgical Clinics of North America*, Volume 89, Issue 3, June 2009, Pages 599-610, ISSN 0039-6109,
4. (Lenselink E.A. Role of fibronectin in normal wound healing, *International Wound Journal* volume 12, Issue 3, pages 313-316, june 2015)
5. Young A., Mcnaught C. E. The physiology of wound healing. *Surgery Oxford* October 2011 Volume 29, Issue 10, Pages 475–479 DOI: 10.1016/j.mpsur.2011.06.011
6. P. Senet, *Fisiología de la cicatrización cutánea*, EMC - Dermatología, Volume 42, Issue 1, 2008, Pages 1-10, ISSN 1761-2896
7. (loureirin B inhibits hipertrofic scar formtion via inhibition of the tgb1 erk/jnk pathway ting he, xiaozhi bai, departamento of burns and cutaneous surgery)
8. Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int.*1992; 41: 557-559

9. Hornstra IK, Birge S, Starcher B, Bailey AJ, Mecham RP, Shapiro SD. Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice. *J Biol Chem.* 2003; 278: 14387-14393
10. Davies, Jamie A (Apr 2001) *Extracellular Matrix*. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net> [doi: 10.1038/npg.els.0001274].
11. Tomás Álvaro Naranjo, Rosa Noguera-Salvá, Fernando Fariñas Guerrero, *La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad (parte I)*, *Revista Española de Patología*, Volume 42, Issue 4, October–December 2009, Pages 249-261, ISSN 1699-8855, [http://dx.doi.org/10.1016/S1699-8855\(09\)70192-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1699-8855(09)70192-8).
12. Zollinger AJ, Smith ML. *Fibronectin, the extracellular glue*. *Matrix Biology*, Available online 3 August 2016, ISSN 0945-053X
13. Naranjo T.A, Noguera-Salva R, Fariñas-Guerrero F. *Extracellular matrix: morphology, function and biotensegrity (part 1)* *REV ESP PATOL* 2009; vol42, no. 4: 249-261
14. (collagens in wound healing A nystrom medical center university of freiburg germany, chap 9)
15. (fibronectina at a glance roumen pankov and keneth M Yamada *journal of cell science* 115 doi 10.1242/jcs.00059)
16. Lucena Sara, Arocha Piñango Carmen Luisa, Guerrero Belsy. *Fibronectina: Estructura y funciones asociadas a la hemostasia*. Revisión. *Invest. clín* [Internet]. 2007 Jun [citado 2016 Mayo 11]; 48(2): 249-262.

17. Hérard A.L., Pierrot D. Fibronectin and its alpha 5 beta 1-integrin receptor are involved in the wound-repair process of airway epithelium, *Am J Physiol.* 1996 Nov;271(5 Pt 1):L726-33.
18. (Salem C, Vidal A, Mariangel P, Concha M. Cicatrices hipertróficas y queloides. *Cuad. Cir.* 2002; 16: 77-86.)
19. (Rahban SR, Garner WL. Fibroproliferative scars. *Clin Plast Surg.* 2003; 30:77-89.)
20. (Nedelec B, Ghahary A, Scott PG, Tredget EE. Control of wound contraction. Basic and clinical features. *Hand Clin.* 2000; 16: 289-302.)
21. (Hirshoren N, Eliashar R, Wound-healing modulation in upper airway stenosis-myths and facts. *Head Neck;* 2009; 31:111-126.)
22. Norwood, S., Vallina, V. L., Short, K., Saigusa, M., Fernandez, L. G., & McLarty, J. W. (2000). Incidence of Tracheal Stenosis and Other Late Complications After Percutaneous Tracheostomy. *Annals of Surgery,* 232(2), 233–241
23. S. Cortés de Miguel, J. Cabeza Barrera, M. Gallardo Medina. Mitomicina C tópica endotraqueal como terapia complementaria al tratamiento endoscópico de la estenosis laringotraqueal fibrótico-cicatricial recurrente. *Farm Hosp.* 2011;35(1): 32-35
24. Patel HH, Goldenberg D, McGinn JD. Surgical Management of Upper Airway Stenosis en Cummings Otolaryngology Head and Neck Surgery 6th ed de Paul W. Flint. Philadelphia, PA : Mosby/Elsevier 2015, P 982-992.
25. Cotton RT. Management of subglottic stenosis. *Otolaryngol Clin North Am.* 2000; 33: 111-130

26. McCaffrey, T. V. (1993). Management of laryngotracheal stenosis on the basis of site and severity. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery*, 109(3), 468-473.
27. Hermes C. Grillo, Dean M. Donahue, Douglas J. Mathisen, John C. Wain, Cameron D. Wright, Postintubation tracheal stenosis: Treatment and results, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, Volume 109, Issue 3, March 1995, Pages 486-493, ISSN 0022-5223
28. 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.
29. Rahbar R, Shapshay SM, Healy GB. Mitomycin: Effects on laryngeal and tracheal stenosis, benefits and complications. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001; 110:1-6.
30. 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.)
31. Roh JL, Koo BS, Yoon YH, et al. Effect of topical mitomycin C on the healing of surgical and laser wounds: a hint on clinical application. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005; 133: 851-856.
32. Iñiguez R, San Martin JS, Iñiguez M, Zuñiga S, Jofre D, González S, Guilemani JM, Iñiguez R. Effect of mitomycin in the surgical treatment of tracheal stenosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008; 134: 709-714.

33. Hueman EM, Simpson CB. Airway complications from topical mitomycin C. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 133:831-835
34. Olmos JR, Hernández C, Díaz E, Jasso R, Sotres A, Gaxiola M. Wound healing modulators in a tracheoplasty canine model. *J Invest Surg.* 2007; 20: 333-338.
35. Palmer S. Mitomycin as adjunct chemotherapy with trabeculectomy. *Ophthalmol.* 1991; 98: 317-321.
36. (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.)
37. (Smith ME, Elstad M. Mitomycin C and the endoscopic treatment of laryngotracheal stenosis: are two applications better than one?. *Laryngoscope.* 2009; 119: 272-283.)
38. (Simpson CB, James JC. The efficacy of mitomycin-C in the treatment of laryngotracheal stenosis. *Laryngoscope.* 2006; 116: 1923-1925.)
39. Ruiz-Eng, Rafael; Montiel-Jarquín, Álvaro; Rosa-Pérez, Raúl de la; López-Colombo, Aurelio; Gómez-Conde, Eduardo; Zamudio-Huerta, Leticia. Colágeno-polivinilpirrolidona, nueva opción para tratar secuelas de la mastectomía radical en mujeres con cáncer mamario. Informe preliminar. *Cirugía y Cirujanos*, vol. 78, núm. 4, julio-agosto, 2010, pp. 310-314
40. 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.

41. Gancedo M, Ruiz-Corro L, Salazar-Montes A, Rincón AR, Armendáriz-Borunda J. Pirfenidone prevents capsular contracture after mammary implantation. *Aesth Plast Surg.* 2008; 32: 32-40.
42. Bayhan Z, Zeren S, Kocak FE, Kocak C, Akcılar R, Kargı E, Tiryaki C, Yaylak F, Akcılar A, Antiadhesive and Antiinflammatory Effects of Pirfenidone in Postoperative Intraabdominal Adhesion in an Experimental Rat Model, *Journal of Surgical Research* (2015), doi: 10.1016/j.jss.2015.11.033
43. Torres J, Ramos A, Rodríguez J, De la Parra M. El uso de pirfenidona tópica en el tratamiento de cicatrices patológicas: estudio clínico en fase II. XIX Congreso Internacional de Cirugía Endoscópica. Asoc Mex Cir End. 2010.
44. Selman M, Navarro MC, Gaxiola M. Fibrosis pulmonar idiopática: en busca de un tratamiento eficaz. *Arch Bronconeumol.* 2005;41(Supl 5):15-20
45. Hisashi Oku H, Shimizu T, Kawabata T, Nagira M, Hikita I, Ueyama A, Matsushima S, Torii M, Arimura A. Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: Different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *Eur J Pharm.* 2008; 590: 400-408
46. Silva-Martinez M. Tesis: Expresión de TGF- β 1 y deposición de colágena en cicatriz traqueal después de la aplicación de diferentes moduladores de la cicatrización postraqueoplastía. Estudio experimental. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Marzo 2016.

47. Zias N, Chroneou A, Taba MT, Gonzalez AV, Gray AW, Lamb CR, Riker DR, Beamsy Jr Jhon F. Post tracheostomy and post intubation tracheal stenosis: Report of 31 cases and review of the literature. *BMC Pulmonary Medicine* 2008. 8:18. DOI: 10.1186/1471-2466-8-18
48. 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.
49. 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
50. Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain*. 2011;7(1):55
51. 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.).
52. (Rodríguez-Revilla I, Olmos-Zuñiga R, Jasso-Victoria R, Soda-Merhy A, Sotres-Vega A, Baltazares-Lipp M, Villalba-Caloca J, Santillan-Doherty P, Santibáñez-Salgado JA. Efecto del factor de crecimiento del endotelio vascular en la cicatrización traqueal (traqueoplastía o autotrasplante) en ratas. *An ORL Mex*. 2009; 54: 55-62.)

53. 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.
54. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: An open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One*. 2014 May 6;9(5):e96801. doi: 10.1371/journal.pone.0096801. eCollection 2014.
55. Mungu3a A. Comparison of two methods for determining the content of collagen in mouse lung. M.Sc. Thesis, Facultad de Ciencias. UNAM, 2007.
56. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous Wound Healing. *N Engl J Med* 1999; 341:738-746 September 2, 1999
57. Lin F, Ren XD, Pan Z, Macri L, Zong WX, Tonnesen MG, Rafailovich M, Bar-Sagi D, Clark RA. Fibronectin growth factor-binding domains are required for fibroblast survival. *J Invest Dermatol*. 2011 Jan;131(1):84-98.
58. Stuart Enoch, David John Leaper, Basic science of wound healing, Surgery (Oxford), Volume 23, Issue 2, 2005, Pages 37-42, ISSN 0263-9319
59. (Ian A. Darby, Tim D. Hewitson, Fibroblast Differentiation in Wound Healing and Fibrosis, International Review of Cytology, Academic Press, 2007, Volume 257, Pages 143-179, ISSN 0074-7696, ISBN 9780123737014,
60. Perepelitsyn I, Shapshay SM. Endoscopic treatment of laryngeal and tracheal stenosis—has mitomycin C improved the outcome?. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004 Jul;131(1):16-20.

61. Bakthavachalam S, McClay JE. Endoscopic management of subglottic stenosis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008 Oct;139(4):551-9.
62. Orozco-Perez J, Aguirre-Jauregui O, Salazar-Montes AM, Sobrevilla-Navarro AA, Lucano-Landeros MS, Armendáriz-Borunda J. Pirfenidone prevents rat esophageal stricture formation. *J Surg Res.* 2015 Apr;194(2):558-64. doi: 10.1016/j.jss.2014.11.009. Epub 2014 Nov 15.
63. Solís N. Tesis: Efecto de diferentes moduladores de la cicatrización sobre la expresión de metaloproteinasa 9 en la cicatrización de traqueoplastías en perros. Maestría en Ciencias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2014.
64. Zhou H, Latham CW, Zander DS, Margolin SB, Visner GA. Pirfenidone Inhibits Obliterative Airway Disease in Mouse Tracheal Allografts. *J Heart Lung Transplant.* 2005; 24: 1577-1585.
65. Bazán-Perkins B, Campos MG, Sánchez-Guerrero E. Polymerized type I collagen reverts airway hyperresponsiveness and fibrosis in a guinea pig asthma model. En *Inflammatory Diseases 2*. Editor. Mahin Khatami, 2011, ISBN: 978-953-307-762-8.
66. Furuzawa-Carballeda J, Rojas E, Valverde M, Castillo I, Diaz de León L, Krötzsch E. Cellular and humoral responses to collagen–polyvinylpyrrolidone administered during short and long periods in humans. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003, 81: 1029-1035.
67. Macías-Barragán J, Sandoval-Rodríguez A, Navarro-Partida J, Armendáriz-Borunda J. The multifaceted role of pirfenidone and its novel targets. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2010;3:16.

68. Iyer SN, Gurujeyalakshmi G, Giri SN. Effects of pirfenidone on transforming growth factor-beta gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 291: 367-373.
69. Ferguson MW, O'Kane S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004; 359: 839-850.
70. Shetlar MR, Shetlar DJ, Bloom RF, Shetlar CL, Margolin SB. Involution of keloid implants in athymic mice treated with pirfenidone or with triamcinolone. *J Lab Clin Med.* 1998; 132: 491-496.
71. Eliashar R, Eliachar I, Esclamado R, Gramlich T and Strome M. Can Topical Mitomycin Prevent Laryngotracheal Stenosis?. *Laryngoscope.* 1999; 109: 1594-1600
72. Krötzsch E, Díaz de León E, Furuzawa GJ, Marquez R, Quiroz E, Citokine expresión is down regulated by collagen-polivinylpirrolidone in hyperthrophic scars. *J Invest Dermatol.* 1998; 111: 828-834.
73. Su C, Sui T, Zhang X, Zhang H, Cao X. Effect of topical application of mitomycin-C on wound healing in a postlaminectomy rat model: An experimental study. *Eur J Pharmacol.* 2012; 674: 7-12.)