



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

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
"ISMAEL COSÍO VILLEGAS"

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CPVP, MC Y PIRFE SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE TGFB 1, 2 Y 3 Y DEPÓSITOS DE COLÁGENA EN UN
MODELO DE ESTENOSIS TRAQUEAL EN RATAS CON Y SIN
TRAQUEOPLASTÍA.**

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

PRESENTA:
DRA. MARISABEL MORENO CEGARRA

ASESOR:
DR. ARTURO IVAN GONZÁLEZ GONZÁLEZ

CO-TUTORES:
M EN C J. RAÚL OLMOS ZUÑIGA
DR. ROGELIO JASSO VICTORIA

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

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO

AGOSTO 2017



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.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo incondicional y confiar en mí a lo largo de mi vida y carrera profesional. Mamá gracias por siempre estar ahí y enseñarme a nunca darme por vencida en los momentos más difíciles de estos 4 años.

A mi hermana por enseñarme a siempre ser agradecida con las oportunidades que la vida me ha dado y siempre estar dispuesta a ayudarme a pesar de la distancia.

Dr. Iván González por su apoyo, amistad y enseñanzas.

Dr. Olmos y Dr. Jasso por permitirme trabajar en el Departamento de Cirugía Experimental y transmitirme sus conocimientos y enseñanzas, así como brindarme su amistad.

Mariana gracias por ser la mejor maestra, ayudarme y tenerme toda la paciencia durante la realización de la tesis.

Al personal del Departamento de Cirugía Experimental, por su ayuda y colaboración para que fuera posible realizar ésta tesis. En especial a la Dra. Matilde, Beto y Sergio.

Al INER y todo su personal por darme la oportunidad de formarme como especialista, en especial al Dr. Arturo Ramírez García por aceptarme y ser un ejemplo a seguir. A mis adscritos del Departamento de Otorrinolaringología por sus enseñanzas.

A mis R más y R menos a lo largo de los últimos 4 años, gracias por su paciencia, amistad, y enseñanzas tanto académicamente como de vida. En especial a Lupe Góngora por creer en mí desde el primer día.

A mis compañeros y hermanos de generación, MIS PEQUES, sin ustedes nada hubiera sido igual, los quiero.

A Gianni Gelleni, Rossella Mazzocca, Wilmer Palacios, por su apoyo constante e incondicional, por creer en mí y ayudarme a no darme por vencida.

A México y mexicanos que han formado parte de mi formación y vida en los últimos 4 años, gracias por abrirme las puertas de su país y siempre hacerme sentir como en casa. En un futuro cercano espero poder abrirles las puertas de mi casa en una Venezuela libre.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	2
1.1 Estenosis Traqueal.....	3
1.2 Tipos de cicatrices patológicas.....	3
Cicatrices deficientes	3
Cicatrices fibróticas	4
1.3 Factor de crecimiento transformante beta	4
Isoformas del TGF- β	5
1.4 Características de las cicatrices patológicas en tráquea.....	7
1.5 Tipos de estenosis traqueales.....	8
1.6 Tratamiento de las estenosis traqueales.....	9
1.6.1 Tratamiento médico.....	10
Tratamientos endoscópicos de la estenosis traqueal.....	10
Dilatación endoscópica mecánica con globo.....	10
Dilatación endoscópica con láser.....	11
Dilatación endoscópica mediante la colocación de férulas.....	11
1.6.2 Tratamientos quirúrgicos.....	12
1.7 Moduladores de la cicatrización.....	14
Colágeno polivinil-pirrolidona.....	14
Pirfenidona.....	14
2 JUSTIFICACIÓN	15
3 HIPÓTESIS	16
4 OBJETIVOS	16
5 MATERIAL Y MÉTODOS	17
5.1 Animales de experimentación	17
5.2 Grupos de estudio	19
5.3 Producción de la estenosis.....	20
5.4 Técnica quirúrgica de la resección y anastomosis termino-terminal	21
5.5 Tratamiento	22
5.6 Evaluación.....	23
6 RESULTADOS	29
6.1 Hallazgos clínicos.....	30
6.2 Hallazgos radiográficos y tomográficos.....	31
6.3 Hallazgos macroscópicos.....	32
6.3 Hallazgos morfométricos	33
6.4 Hallazgos microscópicos.....	34
6.5 Hallazgos bioquímicos	35
6.6 Hallazgos inmunohistoquímicos	35
7 DISCUSIÓN	35
8 CONCLUSIONES.....	40
9 REFERENCIAS.....	41

RESUMEN

Evaluación del efecto de la CPVP, MC y PIRFE sobre la producción de TGF- β 1, 2 y 3 y depósitos de colágena en un modelo de estenosis traqueal en ratas con y sin traqueoplastia.

El tratamiento ideal de la estenosis traqueal (ET) es la traqueoplastia, pero no evita la re-estenosis, por esto se ha combinado con moduladores de la cicatrización (MDC) para disminuir la producción de citocinas y factores de crecimiento (TGF- β) que favorecen la fibrosis. El MDC más utilizado es la mitomicina C (MC), pero no evita la reestenosis, lo que justifica buscar MDC que la eviten. **Objetivo.** Evaluar el efecto de la colágeno polivinil-pirrolidona (CPVP) subcutánea (SC), MC tópica y pirfenidona PIRFE (VO) sobre la producción del TGF- β -1,2 y 3, depósitos de colágena (DC) macroscópica y microscópica en ratas con ET tratadas con y sin traqueoplastia. **Material y métodos.** Cuarenta ratas con ET, se trataron únicamente con MDC y con traqueoplastia más MDC: Grupo I: SSF vía IM, Grupo II: traqueoplastia-SSF, Grupo III: CPVP SC, Grupo IV: traqueoplastia-CPVP, Grupo V: MC tópica, Grupo VI: Traqueoplastia-MC, Grupo VII: PIRFE VO, Grupo VIII: Traqueoplastia-PIRFE. Se valoró la presencia de ET, cicatrización macroscópica y microscópicamente, expresión de TGF- β 1,2 y 3 y los DC. Los grupos tratados con CPVP y PIRFE, no revirtieron la ET, pero si evitaron su progresión. Además post- cirugía mostró menores cambios y mejor cicatrización sin re-estenosis imagenológicos, macro y microscópicos, y en la expresión de TGF- β . **Conclusión.** La aplicación SC de CPVP y PIRFE VO, no revierten la estenosis traqueal, pero la detienen y cuando se utilizan en combinación con la traqueoplastia evitan la re-estenosis en un modelo experimental de ET en ratas.

Palabras clave: Estenosis traqueal (ET), TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, deposición de colágena, pirfenidona (PIRFE), Colágena polivinil pirrolidona (CPVP).

INTRODUCCIÓN.

Estenosis traqueal.

La estenosis traqueal (ET) se define como la reducción anormal en el calibre de la luz traqueal, ya sea por retracción de una cicatriz o por depósito de tejido fibroso durante el proceso de cicatrización (1-3).

En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER), el cual es un centro de referencia para estos pacientes, en el 2014 se realizaron 231 procedimientos de vía aérea (154 dilataciones laríngeas y traqueales, 40 plastías de tráquea y bronquios, y 37 fibrobronoscopias con aplicación de fármacos), para su tratamiento.

La ET puede presentarse después de una intubación orotraqueal prolongada, post-cirugía, traqueoscopias, infecciones o inflamación crónica, son consecuencia de una cicatriz patológica en la que se presenta una fibrosis desproporcionada de la mucosa de la luz traqueal que impide la circulación de aire en ambos sentidos y representan problema clínico grave que compromete la vida de los pacientes (4).

Fisiopatológicamente en una intubación prolongada, causa más frecuente de la ET, se da posterior a 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 (5).

Tipos de cicatrices patológicas.

La cicatrización es un proceso de reparación o regeneración de un tejido dañado mediante una cicatriz o un tejido igual al existente previo a la lesión, la cual involucra una cascada de eventos que requieren de interacciones coordinadas entre las células, factores solubles, así como de los componentes de la matriz extracelular (MEC), y dependiendo de la eficiencia y control con el que se realicen estos eventos, se producirá una cicatriz normal o patológica, ya sea deficiente o fibrótica (6,7)

Cicatrices deficientes.

La cicatrización deficiente o los retrasos en la cicatrización son consecuencia de una inflamación prolongada en el sitio de la lesión y se caracterizan por tener insuficiente deposición de matriz de tejido conectivo, excesiva producción de metaloproteinasas (MMPs) e insuficiente angiogénesis (8,9). Las heridas con cicatrización deficiente comparten varias características bioquímicas como el incremento de mediadores inflamatorios, MMPs, disminución de la actividad de los factores de crecimiento que hacen que en la herida se degrade el nuevo tejido, así como los factores de crecimiento y se transformen en heridas crónicas, las cuales pueden permanecer por meses e incluso años. En la literatura se ha descrito que la expresión excesiva y durante demasiado tiempo de la metaloproteinasa 9 (MMP-9) es un importante factor para que se presente el retraso de la cicatrización (malacia o fistulas) debido a que degrada factores de crecimiento, receptores y proteínas de la MEC que son esenciales para la cicatrización (9-11).

Cicatrices fibróticas.

Las cicatrices fibróticas al igual que las deficientes, siempre están precedidas por una prolongación o exageración de la fase inflamatoria de la cicatrización o una alteración durante la contracción o remodelación (12). Se caracterizan porque el tejido normal perdido se sustituye con una MEC en la que predomina la colágena como resultado de una inflamación prolongada o exagerada, disminución del factor de crecimiento transformante beta tres (TGF- β 3), incremento en la producción de factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) y factor de crecimiento transformante beta 2 (TGF- β 2) (13,14). Disminución en la activación de las MMPs de la MEC (principalmente la MMP-1 y MMP-9 que son importantes para la degradación de proteínas de MEC durante la fibrosis y se ha visto que intervienen en la repitelialización de la vía aérea y cicatrización traqueal) y, además de cambios en la expresión de fibronectina y elastina (6-8).

Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).

El TGF- β es un factor de crecimiento multifuncional con diversos efectos en todo el cuerpo, el cual pertenece a una superfamilia de polipéptidos extracelulares con ciertas características estructurales comunes que regulan diversos eventos en el desarrollo embrionario, la respuesta inmunológica, carcinogénesis, inflamación, regeneración tisular y la cicatrización en donde al inicio atrae a los neutrófilos, macrófagos y fibroblastos, posteriormente estimula la angiogénesis, fibroplasia y en las etapas finales está involucrado en la remodelación de la MEC. Este factor modifica la síntesis y depósito de

componentes extracelulares tales como fibronectina, proteoglicanos y algunas formas de colágena (15-18).

Isoformas del TGF- β .

El TGF- β es sintetizado como una proteína de 390 aminoácidos y son los 112 residuos localizados en el extremo C-terminal los que constituyen la forma madura. En estado inactivo, conocido como TGF β latente, se encuentra unido al péptido asociado a la latencia (LAP).

Existen 5 isoformas de TGF β ; sin embargo en los mamíferos se han descrito tres: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, las cuales residen en diferentes cromosomas (19q13, 1q14 y 14q24 respectivamente), sin embargo poseen 80% de homología en la secuencia de sus aminoácidos. Por otro lado, las isoformas 4 y 5 se han identificado en aves y anfibios (19).

La mayoría de las isoformas de un factor de crecimiento, surgen de la duplicación inicial de un gen ancestral y el gen duplicado codifica la misma molécula, pero con el tiempo hay mutaciones de esa molécula, las cuales son compatibles con las funciones celulares normales del factor de crecimiento, pero pueden transmitir una característica nueva en un tejido específico o en un contexto específico, por ejemplo en la cicatrización de la herida (14).

Las moléculas que contienen la superfamilia del TGF β son muy diferentes entre sí, pero entre los tres existe un punto en común: el cual es el mecanismo de señalización a través de receptores transmembranales (20), denominados tipo I, II y III. Cuando el TGF- β se une a su receptor, el receptor tipo II fosforila al receptor tipo I, formando diferentes complejos que llevan la señal del TGF- β al núcleo celular (15,17) en donde interaccionan con los genes diana y producen

cambios en la transcripción, lo cual desencadena proliferación, diferenciación, o cualquier otra de las actividades desempeñadas por el TGF- β . No obstante, cualquier trastorno en la regulación o en los mecanismos de señalización del TGF- β puede ocasionar condiciones patológicas como procesos fibróticos que resultan de un exceso en la producción del mismo (17,20); mientras que la reducción en la señalización del TGF- β se ha asociado a heridas crónicas o que no cicatrizan (15).

Como ya se menciona el TGF- β , tiene tres isoformas: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, los dos primeros (TGF- β 1 y TGF- β 2) actúan como profibrogénicos, mientras que el TGF- β 3 funciona como antiinflamatorio y antifibrótico, asimismo estos actúan en todas las etapas de la cicatrización de heridas, especialmente en la fase proliferativa y de remodelación (6,13,14,21-23), en la que se convierte en una señal crítica, que actúa como control maestro para la regulación de la actividad de los fibroblastos, ya que incrementa la transcripción de genes de colágeno, proteoglicanos y fibronectina, lo que favorece el aumento en la producción global de proteínas de la MEC. La expresión del TGF- β 1 se da en células endoteliales, hematopoyéticas y células de tejido conectivo, TGF- β 2 en células epiteliales y células SNC, y el TGF- β 3 principalmente en células mesénquimales y son liberados al medio extracelular por las plaquetas (17,24). Al mismo tiempo, el TGF- β disminuye la producción de las MMPs encargadas de la degradación de la MEC y estimula la producción de sus inhibidores (TIMPs) (6). Cuando existe un incremento incontrolado de este factor de crecimiento en la producción y/o activación existe una producción excesiva de tejido conectivo (17).

Dentro del proceso de cicatrización actúa de forma diferente dependiendo de la fase de la misma; inicialmente atrae neutrófilos, macrófagos y fibroblastos, mientras que en la fase final incrementa la síntesis y depósito de fibronectina, proteoglicanos y algunas formas de colágena, interviniendo en la remodelación de la membrana extracelular (15,16-18). Las tres isoformas se encuentran presentes en las heridas en proceso de cicatrización, inclusive en la etapa fetal, donde se ha demostrado que difieren en sus niveles de expresión, duración en la herida y en su actividad biológica (15).

Hasta la fecha, no existe ningún tratamiento definitivo para prevenir o reducir cualquier forma de cicatrices, pero diferentes grupos han estudiado la manipulación del TGF- β para la prevención de la formación de cicatrices patológicas (14), ya que se ha demostrado que el tejido de las cicatrices hipertróficas producen más mRNA y proteína para TGF- β 1 que la piel normal y fibroblastos derivados de piel normal, lo cual sugiere un papel del TGF- β 1 en la formación de cicatrices hipertróficas. Así mismo se ha demostrado que las cicatrices hipertróficas presentan prolongación en la expresión de los receptores de TGF β comparado con tejido de piel normal, principalmente en la fase inflamatoria de la cicatrización, lo cual se reduce en la fase de remodelación (15).

Características de las cicatrices patológicas en tráquea.

Aunque el proceso de la cicatrización de las heridas varía entre los diferentes tipos de tejidos, hay más similitudes que diferencias entre ellos. De esta forma la cicatrización de la tráquea y bronquios se divide en tres fases: inflamación, proliferación y remodelación, 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 (6,25,26).

En la tráquea y los bronquios, cuando se produce una cicatriz hipertrófica se produce estenosis y la consecuente obstrucción al flujo de aire (26). Mientras que cuando se origina una cicatrización traqueal deficiente o retrasos en la misma se produce una malacia o fístulas (27).

Como ya se menciona la ET es la disminución de la luz traqueal producida por una fibrosis, la cual impide el flujo de aire (1,3). Clínicamente la ET se manifiesta con estridor, sibilancias, disnea, o una combinación de éstas y además de la evaluación clínica, puede diagnosticarse radiográficamente, a través de tomografía computarizada y por traqueoscopia (12).

Tipos de estenosis traqueales.

Las ET se pueden clasificar según su etiología en congénitas y adquiridas , encontrándose dentro del segundo grupo la gran mayoría y a su vez subdividiéndose éstas en; traumáticas (intubación prolongada, traqueostomía, trauma laríngeo externo, posradiación, quemaduras endotraqueales térmicas o químicas, etc.), infecciosas (Escleroma respiratorio, Sífilis, Tuberculosis, Lepra, Sarcoidosis, etc.), inflamatorias (Granulomatosis de Wegener, Policondritis recidivante, Lupus eritematoso sistémico, etc.), neoplásicas (Papilomatosis, Carcinoma, Linfoma, etc.) o idiopáticas (28).

Para su estudio se han desarrollado diversos sistemas de clasificación los cuales son de ayuda importante en el momento de decidir la opción terapéutica adecuada así como en algunos casos su pronóstico, como en el caso de la

clasificación de McCaffrey para el número de pacientes que se lograrán decanular.

La clasificación de Myers-Cotton mide el porcentaje circunferencial de una estenosis dividiéndola en; Grado I (0-50% de la luz traqueal), Grado II (51-70% de la luz traqueal), Grado III (71-99% de la luz traqueal) y Grado IV (sin lumen detectable) (29). Mientras que la clasificación de McCaffrey las divide de acuerdo al sitio afectado, así como por su longitud en Grado I (subglótica o traqueal pura <1cm), Grado II (subglótica >1cm), Grado III (subglótica y traqueal sin involucro de glotis) y Grado IV (estenosis con extensión a glotis) (30).

Tratamiento de las estenosis traqueales.

En la actualidad existen diferentes opciones terapéuticas para el manejo de las ET, los cuales se individualizarán de acuerdo a la localización de la lesión, gravedad del caso, tipo de estenosis, el mecanismo por el que se haya producido y la presencia de comorbilidades. Para esto se han intentado tratamientos médicos, endoscópicos y quirúrgicos, pero el abordaje de las estenosis en este tipo de pacientes variará de acuerdo a la presencia de éstas variables, junto con la experiencia del cirujano y el endoscopista, quienes determinarán la opción terapéutica más adecuada. Sin embargo ninguna opción terapéutica ofrece un resultado adecuado del 100%, debido a que todas pueden provocar daño adicional a la mucosa aérea, lo cual predispone a la aparición de re-estenosis, por el desarrollo de un tejido de neoformación de carácter fibrótico cicatricial (31-33).

Tratamiento médico.

Para este tipo de tratamientos generalmente se utiliza antibioticoterapia y esteroides, pero se ha observado que no se consigue disminuir significativamente la estenosis. Con esta opción terapéutica, los pacientes mejoran con la disminución del proceso inflamatorio agudo y del edema; por lo que el manejo médico solo está indicado para la fase aguda de la estenosis o como complemento de los otros métodos terapéuticos (33).

Tratamientos endoscópicos de la estenosis traqueal.

En pacientes con severas comorbilidades o en pacientes con estenosis de tipo simple, se ha reportado que los procedimientos endoscópicos pueden ser curativos, sin embargo generalmente se utilizan como puente hacia la cirugía. (32,34).

Los procedimientos endoscópicos más empleados para el tratamiento de las ET son la dilatación mecánica con balón neumático, la aplicación de láser CO₂ o NdYAG y la colocación de prótesis endoluminales (35).

Dilatación endoscópica mecánica con globo.

La dilatación endoscópica realizada con globos, solamente ejercen fuerzas radiales sobre el sitio lesionado para reducir al mínimo el daño mecánico en la mucosa y esta permite tener un mejor control visual del procedimiento. Está indicada como ayuda a otras técnicas endoscópicas a distintos niveles de la vía aérea o de forma aislada ante estenosis simples, cortas, y que no obstruyen por completo la luz de la vía aérea (32). Esta técnica es útil para el alivio temporal de sintomatología aguda. También como paso previo a la colocación

de una prótesis o empleo de láser. La complicación más importante es la rotura de la vía aérea con riesgo de neumotórax, neumomediastino, mediastinitis y sangrado.

Dilatación endoscópica con laser.

La aplicación de láser consiste en realizar cortes sobre el tejido fibrosado y es útil para el tratamiento de lesiones pequeñas, estrechas, de longitud cráneo-caudal reducida y esqueleto cartilaginoso estable, aunque su uso se ha extendido y generalizado, presentando igualmente buenos resultados y bajo riesgo ante lesiones mayores. Proporciona un elevado porcentaje de decanulación con un reducido tiempo operatorio y una estancia hospitalaria baja. Ésta se puede utilizar en combinación para las ET en banda, realizando cortes radiales con láser o con el cuchillo del electrocauterio a las 3, 9 y 12' del campo antes de la dilatación. En la literatura, también se ha descrito que el tratamiento óptimo de las estenosis post-intubación se realiza mediante la aplicación de incisiones radiales de láser con la ayuda asociada de dilataciones con balón (32,33,36).

Dilatación endoscópica mediante la colocación de férulas.

La colocación de férulas está indicada en pacientes que no responden a la dilatación endoscópica y a su vez no son candidatos para resección quirúrgica. Sin embargo el uso de éstos no está exento de sufrir complicaciones como la presencia de migración de la férula, infecciones y la re-estenosis como consecuencia del propio proceso de reparación y obstrucción de las férulas. Se

debe mencionar que las férulas más utilizadas son los de silicón y los de nitinol, los cuales están cubiertos de poliuretano y son auto-expandibles (32,36).

Tratamientos quirúrgicos

La cirugía abierta mediante la resección y anastomosis termino-terminal del segmento afectado (traqueoplastía), desempeña un papel importante en el tratamiento de las ET recurrentes y muchos autores lo consideran como el método definitivo para solucionar este problema (32), ya que al utilizar maniobras que permitan el descenso laríngeo o la movilización del hilio pulmonar permite reseca hasta el 50% de la tráquea, lo cual en la práctica puede dar solución a la mayor parte de los casos. No obstante al igual que otro tipo de cirugía, las traqueoplastías pueden presentar riesgos y complicaciones.

Los riesgos quirúrgicos dependen del estado del paciente (respiratorio, cardiovascular y neurológico) y de la extensión de la lesión. La mayoría de los autores coinciden en que la cirugía no debe realizarse de forma apresurada y si existe un compromiso respiratorio, debe realizarse primero una dilatación endoscópica con globos, dilatadores o mediante el broncoscopio rígido, laser o colocación de un férula.

Las complicaciones más frecuentes en la cirugía traqueal son hemorragia grave, dehiscencia de sutura, malacia, formación de granuloma a nivel de la anastomosis y la re-estenosis (32,33). Esta última se presenta porque este tipo de lesiones cursan con una intensa respuesta inflamatoria tanto por la lesión inicial de la vía aérea como por el tratamiento posterior, que provoca la formación excesiva de tejido de granulación y fibrosis, lo que ha hecho que en los últimos años se haya intentado la combinación de los procedimientos

terapéuticos endoscópicos y quirúrgicos con los tratamientos médicos, principalmente utilizando fármacos moduladores de la cicatrización (MDC), para tratar de modular la respuesta inflamatoria del huésped a la lesión, disminución de la producción de citocinas y factores de crecimiento proinflamatorios, incrementar la de los no inflamatorios y regular la producción de colágena en el sitio de la herida para mejorar la cicatrización (31,37). Como ya se menciono, hasta la fecha, no existe ningún fármaco que prevenga o reduzca cualquier forma de cicatriz, pero diferentes grupos han estudiado la manipulación farmacológica del TGF- β para la prevención de la formación de cicatrices patológicas (14).

Dentro de los MDC probados en combinación con los procedimientos endoscópicos y quirúrgicos en tráquea, se encuentra la mitomicina C (MC) tópica y se ha utilizado porque inhibe la actividad fibroblástica; sin embargo se ha observado que en estudios realizados en humanos y animales, predisponen a la acumulación aguda de moco y costras persistentes, retrasa la reepitelialización traqueal y producen defectos en la revascularización de la mucosa, lo cual bloquea el cierre de la herida y puede causar necrosis parcial del cartílago y no evitan la estenosis, ni la re-estenosis (12,31). También se ha utilizado la colágena polivinilpirrolidona (CPVP) con buenos resultados; sin embargo este hay que aplicarlo semanalmente vía intratraqueal por cuatro semanas (3); por lo que hay que buscar nuevos MDC que no requieran de procedimientos invasivos para su aplicación , como la Pirfenidona (PIRFE) para su uso en esta patología (38).

Moduladores de la cicatrización.

Colágeno polivinil-pirrolidona (CPVP).

La CPVP es un fármaco constituido de colágeno porcino tipo I tratado con rayos gamma y polivinil-pirrolidona, del cual se ha observado que la aplicación intralesional semanal (vida media del fármaco) previene la fibrosis, ya que tiene actividad fibrinolítica y actúa como remodelador de procesos fibrosos a través de un mecanismo de equilibrio en los niveles de citocinas pro-inflamatorias y fibrogénicas, así como moléculas de adhesión, lo que disminuye el volumen de la cicatriz, desaparece el infiltrado inflamatorio y restablece la arquitectura normal de la cicatriz tratada con ésta (39-41). Además, su uso postraqueoplastía disminuye la cantidad de colágena formada por gramo de tejido traqueal en el sitio de la anastomosis y provoca que la consistencia del tejido traqueal sea más firme que la del tejido normal; sin embargo, para lograr esto se requiere de 4 aplicaciones intratraqueales por traqueoscopia (3,42-44).

Pirfenidona (PIRFE).

La Pirfenidona (5-metil-1-fenil-2-[1H]-piridina) (PIRFE) es un fármaco que aplicado vía oral (VO), actúa como antifibrótico, antiinflamatorio y antioxidante, que inhibe la síntesis de colágeno gracias que bloquea la expresión de citocinas como la IL-1 e IL-6 y factores de crecimiento como el TNF- α y TGF- β , con lo que bloquea las fibrosis patológicas. Su uso tanto experimental como clínico ha mostrado buenos resultados en cicatrices fibróticas de piel (45, 46), fibrosis pulmonar (47-49), cirrosis hepática (50), fibrosis renal (51), pero su utilidad en la estenosis y cicatrización traqueal posresección del segmento afectado por la ET no se ha estudiado.

Aunque en los modelos animales de cicatrización traqueal se ha reportado que la aplicación intratraqueal de 1 dosis por semana durante 4 semanas de CPVP disminuye la cantidad de colágena formada por gramo de tejido traqueal y mejora la calidad de la cicatriz traqueal post-cirugía (3,42-44), en la clínica es difícil someter a los pacientes a un procedimiento endoscópico cada semana por lo que hay que buscar otra manera de aplicar el tratamiento y evaluar su eficacia durante la ET, así como post-cirugía y valorar su efecto sobre la expresión de TGF- β 1, 2 y 3. En estudios realizados en humanos se han reportado buenos resultados con el uso de CPVP subcutánea (SC) en pacientes con artritis reumatoide (52) y con esclerodermia (53), por lo que podría ser una opción en las ET o post-cirugía traqueal. Por otro lado, también se ha observado en modelos experimentales, que la PIRFE disminuye la producción de TGF- β 1 y colágena formada por gramo de tejido en la cicatrización traqueal, sin embargo no se ha estudiado su efecto sobre la producción del TGF- β 1,2 y 3 durante la ET.

Con base en lo anterior se puede pensar que la aplicación subcutánea (SC) de CPVP y de PIRFE (VO) disminuirán la inflamación y regularan la producción de TGF- β 1, 2 y 3, los depósitos de colágena en un modelo de ET en ratas con y sin traqueoplastia.

JUSTIFICACIÓN

El INER ICV es un centro de referencia para el tratamiento de las estenosis laringo-traqueales y en los últimos años se ha observado un incremento en el número de pacientes con esta patología. La causa principal de este padecimiento es una cicatrización patológica en la que se presenta una

inflamación crónica que altera las interacciones celulares coordinadas que se presentan durante esta y predispone a un trastorno en la expresión de factores de crecimiento como el TGF- β , depósitos excesivos de colágena y fibrosis en el sitio de la lesión traqueal. En la literatura se ha reportado en diferentes estudios experimentales de cicatrización traqueal, que la CPVP y la PIRFE disminuyen la reacción inflamatoria aguda y crónica; así como la expresión de TGF- β 1 y depósitos de colágena. No obstante, aún no se ha reportado el efecto de estos fármacos sobre la producción del TGF- β 2 y TGF- β 3 y depósitos de colágena en un modelo de estenosis traqueal en ratas con y sin traqueoplastía.

HIPÓTESIS

La CPVP y la PIRFE son MDC que modifican la respuesta inflamatoria y fibrosis; por lo que se puede pensar que al ser aplicadas durante la estenosis traqueal y post-cirugía traqueal, disminuirá la producción del TGF- β 1 y 2, así como los depósitos de colágena e incrementara la producción del TGF- β 3 con lo que revertirá la estenosis y evitara la re-estenosis postquirúrgica en un modelo de estenosis traqueal en ratas con y sin traqueoplastía.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la CPVP SC, MC tópica y PIRFE VO sobre la producción del TGF- β -1, TGF- β 2, TGF- β 3 y depósitos de colágena macroscópica y microscópica en un modelo de ET en ratas con y sin traqueoplastía.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto del tratamiento CPVP (SC), MC tópica y PIRFE (VO) sobre la expresión del TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 en las estenosis y cicatriz traqueal de ratas con ET traqueal y anastomosis termino-terminal post-resección de un segmento traqueal cervical estenosado.
- Valorar el efecto del tratamiento CPVP (SC), MC tópica y PIRFE (VO) sobre los depósitos de colágena en la estenosis y cicatriz traqueal de ratas con estenosis traqueal y anastomosis termino-terminal post-resección de un segmento traqueal cervical estenosado.
- Evaluar el efecto del tratamiento CPVP (SC), MC tópica y PIRFE (VO) sobre los cambios macroscópicos y microscópicos que se producen en la estenosis y en la cicatriz traqueal de ratas con estenosis traqueal y anastomosis termino-terminal post-resección de un segmento traqueal cervical estenosado.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Se realizó un estudio experimental y longitudinal.

Animales de experimentación.

En este estudio se utilizaron 40 ratas Wistar, clínicamente sanas de sexo y edad indistinta, con un peso aproximado de 250 a 300 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 (54) y la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos (55).

La muestra fue calculada para una población finita con un intervalo de confianza del 95% (33 ratas por grupo), pero como eran muchos animales y las normas oficiales nacionales e internacionales para el uso y manejo de los animales de laboratorio no permiten el uso excesivo de los mismos, recomiendan que las investigaciones realizadas en animales se lleven a cabo bajo la ley de las tre Rs (56), en la cual se reduce al mínimo (para que se alcancen diferencias estadísticas) la cantidad de sujetos experimentales.

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 hayan sido incluidos en otros protocolos de investigación, hayan sido sometidos a alguna cirugía o no sean de la misma cepa.

Criterios de eliminación.

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

Criterios de terminación.

Aquellos animales que mostraron signos de dolor agudo o crónico, de acuerdo a los descrito por The Rat Grimace Scale o signos de enfermedad respiratoria relacionada con el procedimiento y que no disminuyó con la aplicación de

medicamentos, fueron sometidos a eutanasia con sobredosis anestésica utilizando pentobarbital sódico (57).

Grupos de estudio.

En todos los animales se produjo estenosis traqueal (ET). Unos animales de experimentación recibieron tratamiento farmacológico postproducción de la ET y otros recibieron tratamiento quirúrgico (traqueoplastía) más farmacológico según su grupo de estudio

Grupo I (n=5): ET tratada con SSF vía IM.

Grupo II (n=5): Resección de cuatro anillos traqueales cervicales y anastomosis termino-terminal del segmento resecado (traqueoplastia) con aplicación tópica extraluminal de solución fisiológica (SSF).

Grupo III (n=5): ET tratada con 2.5/kg de CPVP subcutánea por cuatro semanas.

Grupo IV (n=5): Traqueoplastia más aplicación tópica extraluminal de 2.5 mg de CPVP durante la cirugía.

Grupo V (n=5): ET con aplicación tópica extraluminal de 1.2 mg MC.

Grupo VI (n=5): Traqueoplastia más aplicación tópica extraluminal de 1.2 mg MC.

Grupo VII (n=5): ET con administración vía oral de 40 mg/Kg/día de PIRFE durante 4 semanas.

Grupo VIII (n=5): Traqueoplastia con administración vía oral de 40 mg/Kg/día de PIRFE durante 4 semanas.

Producción de la estenosis

Todos los animales fueron sometidos a anestesia general con ketamina (Anesket®, Pisa, Guadalajara, México) 120mg/kg/IP y xilazina (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Alemania) 5mg/kg/IP (58). Durante la cirugía y la recuperación anestésica, por medio de un monitor de signos vitales (Datascopie Passport 5 Lead Monitor®, Mindray Medical International, Shenzhen, China) se monitorizó la frecuencia cardíaca (FC) frecuencia respiratoria (FR) y saturación de oxígeno (SaO₂) durante todo el procedimiento quirúrgico y hasta la recuperación anestésica.

Con el animal bajo anestesia general, se realizó una incisión media en la región cervical ventral, se disecó por planos hasta llegar a la tráquea, la cual fue disecada en toda su circunferencia y se resecaron cuatro anillos, los cuales se sumergieron en una solución que contenía factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) a una concentración de 5 µg/ml durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, el segmento reseado fue anastomosado en su sitio original utilizando material de sutura no absorbible de 7-0 (Seda 7/0, Ethicon, Sao Paulo, Brasil) y se procedió al cierre convencional (59).

Posteriormente al procedimiento quirúrgico para producir la ET, los animales fueron valorados diariamente para observar su estado clínico. Además se les realizaron rayos X antes de producir la estenosis y cada semana después de la cirugía. También se llevaron a cabo tomografías computadas (TC) antes del procedimiento quirúrgico y cada semana hasta el momento en el que se desarrolló la estenosis.

Técnica quirúrgica de la resección y anastomosis termino-terminal.

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

Al concluir los procedimientos quirúrgicos para producir la ET y la traqueoplastia de tratamiento, a todas las ratas se les administró como analgésico preoperatorio meglumina de flunixin (Napzin®, Pisa, México, DF, México) 4 mg/kg/SC y enrofloxacin (Baytril®, Bayer, Leverkusen, Alemania) a dosis de 5 mg/kg/SC como antibiótico.

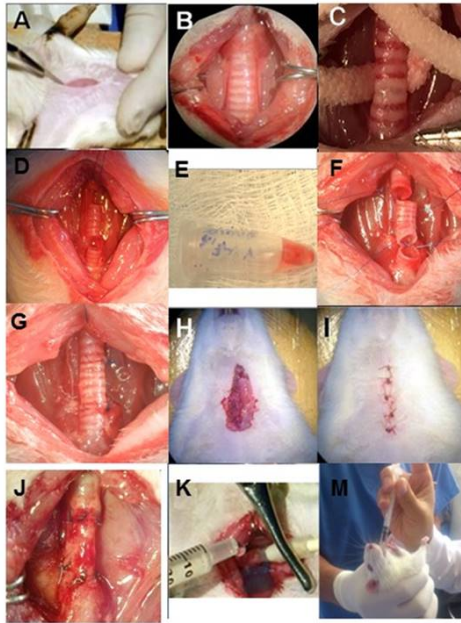


Figura 1. Se observa la técnica quirúrgica utilizada para la producción de la ET y la traqueoplastia

Tratamiento.

En los grupos II, IV y VI, VIII el tratamiento se aplicó directamente sobre la tráquea estenosada y bordes de la resección (antes de llevar a cabo la anastomosis) durante el procedimiento quirúrgico. En el grupo de MC, después de resecar el segmento estenosado, se aplicó tópicamente el fármaco por cinco minutos, al concluir este tiempo la tráquea fue lavada con SSF (60). En el grupo II, se instilaron 0.5 ml de SSF. En los grupos III y IV, las ratas recibieron 2.5 mg de CPVP (dosis utilizada para los problemas de piel, tendones y experimentalmente en estenosis traqueales crónicas) (Figura 1K) (3), además se les aplicó semanalmente la misma dosis pero vía SC. Mientras que en los grupos V y VI se aplicaron 1.2 mg de MC (dosis utilizadas para las estenosis traqueales) (60). Las ratas de los grupos VII y VIII recibieron cada 24 horas 40 mg/kg de peso de PIRFE vía oral (Figura 1M) (38).

Evaluación.

El estudio tuvo una duración de 28 días, después de que se produjo la estenosis y fueran tratados farmacológicamente o se hayan sometido a la traqueoplastia y tratamiento farmacológico, durante este tiempo se sometieron a evaluación clínica, radiológica, tomográfica, macroscópica, medición del tamaño de la circunferencia de la luz traqueal, microscópica, determinación de colágena formada por gramo de tejido, así como evaluación de la producción de los 3 TGF- β s mediante inmunohistoquímica.

Clínica.

Se realizó diariamente durante la primera semana post-cirugía y cada semana el tiempo restante del estudio. Durante este tiempo se evaluó la presencia de estridor, disnea, estado de la herida quirúrgica (inflamación, infección, dehiscencia, formación de enfisema subcutáneo) y signos de dolor de acuerdo a los criterios establecidos por The Rat Grimace Scale y que se basan en los cambios en la expresión de la cara (57).

Radiológica.

A todos los animales se les realizó rayos X laterales de cuello para evaluar la continuidad de la tráquea. Estos se llevaron a cabo antes de producir la estenosis y cada semana después que esta se produjera, así como después de la traqueoplastia.

Tomografía computada (TC).

Se llevaron cortes axiales y coronales de la región cervical de todos los animales sometidos al estudio. Estas se realizaron antes de la producción de la estenosis, cada semana hasta que se produjo la ET y cada semana después de haber realizado los tratamientos.

Macroscópica.

Al concluir el estudio todos los animales fueron sometidos a eutanasia con sobredosis de pentobarbital sódico (150mg/kg/IP) (Anestesal, Pfizer S.A. de C.V. Guadalajara, México) (54), se extrajo el segmento anastomosado o el sitio en el que se produjo la ET y se evaluó el tamaño de la circunferencia de la luz traqueal, así como la cicatrización de la anastomosis, presencia de dehiscencia, infección y la formación de fístulas.

Después de realizar esto el segmento resecado se incidió por la parte membranosa de la tráquea para evaluar la cicatrización de la mucosa y el estado de la luz traqueal. De este tejido obtenido, una porción de la parte membranosa de la tráquea se utilizó para la cuantificación bioquímica de la colágena formada en la cicatriz traqueal y el restante para estudio histológico e inmunohistoquímico para determinar la expresión del TGF- β 1, 2 y 3.

Tamaño de la circunferencia de la luz traqueal

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

El grado de estenosis se evaluó utilizando la escala de Freitag et al. (61), la cual se basa en el porcentaje de severidad de disminución de la luz traqueal: Grado 0= sin estenosis, Grado 1= <25%; Grado 2= 25-50%; Grado 3= 50-75%; Grado 4= 75-90% y Grado 5= estenosis del 100%. Después de realizar esto, el segmento reseado se incidió por la parte membranosa de la tráquea para evaluar la cicatrización de la mucosa traqueal. De este tejido obtenido, una porción de la parte membranosa de la tráquea fue designada para la cuantificación bioquímica de la colágena formada en la cicatriz traqueal y el restante para estudio histológico e inmunohistoquímico para determinar la expresión del TGF- β 1, 2 y 3.

Microscópica.

Para la evaluación microscópica las muestras tomadas de los sitios de la zona de la ET y de la anastomosis se fijaron en formaldehído al 10% y a las 24 horas se incluyeron en parafina, posteriormente se les realizó cortes de 4 μ y se tiñeron con hematoxilina-eosina, así como tricrómica de Massón y se les evaluó la presencia de fibrosis, forma y distribución de las 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 Veiga (62), 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 bioquímica de la deposición de colágena en la cicatriz postraqueoplastía.

La determinación de la deposición de colágena en la cicatriz traqueal se realizó mediante el ensayo de Sircol (63). Una vez colectadas las muestras de la anastomosis traqueal fueron congeladas y se determinó la concentración de proteínas totales utilizando el micro método de Lowry y los lisados se analizaron utilizando el Kit SircolTM (Sircol Kit Pack Standard Assay Kit Product Code: S1000, Biocolor, UK), para esto las muestras de proteína se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml (Eppendorf Protein LoBind Tubes, Sigma-Aldrich), se les agregó 1 ml de reactivo del colorante Sircol y se dejaron en agitación constante por 30 minutos, para favorecer la unión de la colágena al colorante, posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se eliminó y el pellet obtenido se lavó con 750 µl de reactivo de lavado ácido-salino (dilución 1:4, agua desionizada) para eliminar el excedente de colorante. Las muestras se centrifugaron nuevamente por 10 minutos a 12000 rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue secado completamente para ser re-suspendido en 250 µl de reactivo alcalino y se agitaron por 5 minutos utilizando un Vortex (Velp Scientific, F202A0175,) para mezclar el sedimento de colágeno unido colorante. Después 200 µl de cada muestra fueron colocados en una microplaca Nunc-Immuno MaxiSorpTM (Sigma-Aldrich, M5785 New Jersey, USA) y se llevó a cabo la lectura de la deposición de la colágena, a una longitud de onda de 555 nm con un espectrofotómetro Epoch (Bio-teck Instruments, Winooski, USA).

Determinación de la producción de TGF- β 1,2 y 3 mediante inmunohistoquímica.

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

Para desparafinarlas se pusieron en una estufa (Fisher Scientific) a 60 °C durante 30 minutos, se deshidrataron mediante transferencia en xilol por cinco minutos y posteriormente un minuto hasta Alcohol 96%, después se colocaron en una cámara de recuperación de antígenos con buffer de citratos pH 6, el antígeno se recuperó con calor en baño húmedo (StableTemp®, Cole Parmer®) a 60°C por 30 minutos, se dejaron enfriar y se lavaron con Tris-Buffered Saline with Tween (TBST) tres veces por cinco minutos. La peroxidasa endógena se removió con peróxido de hidrógeno al 30% (J.T. Baker, Méx.) diluido (1:9 en H₂O desionizada) durante 15 minutos y se lavó nuevamente en tres tiempos de cinco minutos con TBST. Posteriormente se agregó suero bloqueador (Vectastain Universal Quick Kit., Burlingame, CA) durante 15 minutos a temperatura ambiente para el bloqueo del pegado inespecífico y se lavo nuevamente. Una vez que se llevaron a cabo los pasos anteriores las secciones de tejido fueron incubadas con anticuerpo policlonal de conejo para TGF- β 1 (Abcamab25121, USA) a una concentración de 5 μ g/ml durante 24 horas a 4°C, pasado este tiempo se lavaron nuevamente en tres ocasiones con TBST por cinco minutos cada uno y se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo biotilnado universal (Vectastain Universal Quick Kit, Burlingame,CA) 10 minutos, se lavó al final en tres tiempos de cinco minutos,

posteriormente se utilizó el sistema Biotina-Estreptavidina-Peroxidasa (Vectastain Universal Quick Kit., Burlingame, CA) y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y nuevamente se lavaron como ya se describió, se utilizó 3,3´Diaminobencidina (DAB) (BioCare Medical, USA) como revelador durante cinco minutos, para virar el contraste se utilizó una solución saturada de Carbonato de Litio (Fisher Chemical,USA) y finalmente se tiñeron con Hematoxilina. En todos los grupos se realizaron controles negativos, a los cuales no se les agregó anticuerpo primario.

La cuantificación de la expresión del TGF- β 1,2 y3 fue realizada con el software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), desarrollado por el National Institute of Health (NIH) y el plugin IHC Profiler. Para esto se tomaron imágenes de microscopía en formato digital, a través de un microscopio, una cámara fotográfica digital (Hitachi digital), una computadora y el software necesario para capturar las imágenes. Todas las fotografías se tomaron a la vez utilizando el mismo objetivo y el mismo tiempo de exposición. Una vez que se obtuvieron las imágenes se cuantificó el área positiva de acuerdo a lo descrito por Varghese et al. (64) y se reporta la intensidad de la tinción del TGF- β 1, 2 y 3 en pixeles.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los hallazgos no paramétricos se llevó a cabo con la prueba de Kruskal-Wallis; mientras que los datos paramétricos, 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 para la producción de la ET.

Una vez producida la ET y que se realizó la traqueoplastía para resecar el segmento anastomosado también todos los animales sobrevivieron al procedimiento quirúrgico, pero no al tiempo de estudio establecido, debido a que mostraron signos de insuficiencia respiratoria y fueron sometidos a eutanasia. Dos animales del grupo I (SSF) fallecieron en la segunda semana post-cirugía, 1 del grupo IV (Traqueoplastía más CPVP) y 2 del grupo VI (Traqueoplastía más MC) concluyeron su estudio en la tercera semana posterior al procedimiento quirúrgico (Cuadro 1). Sin embargo al comparar entre grupos, no se observó ninguna diferencia estadística ($p > 0.05$, Chi cuadrada).

Sobrevida en los grupos sometidos a resección y anastomosis termino-terminal de la ET y tratamiento farmacológico	
Grupos de estudio	Animales que completaron el estudio
II Traqueoplastia + SSF	3
IV Traqueoplastia + CPVP	4
VI Traqueoplastia + MC	3
VIII Traqueoplastia + PIRFE	5

Cuadro 1. Muestra el número de animales que sobrevivieron, en los grupos en los que se trató la ET mediante traqueoplastia combinada con el tratamiento médico.

Hallazgos clínicos

En todos los casos la herida quirúrgica se encontró bien cicatrizada al concluir la 1er semana post-cirugía cuando se operaron para producir la ET; sin embargo después de realizar la traqueoplastia para tratar la ET, en los animales tratados con MC esta se observó con inflamación severa, durante las 2 primeras semanas post-quirúrgicas.

En todos los animales la ET traqueal se produjo hasta la cuarta semana post-quirúrgica, la cual fue confirmada por los estudios clínicos e imagenológicos, pero en todos los casos se observó presencia de estridor, en el 40% de los casos en la segunda semana post-cirugía y en el 60% de los animales al concluir la tercera semana.

En los animales del grupo I, los 5 animales tuvieron que ser sometidos a eutanasia al concluir la primera semana después de haberse diagnosticado la ET y haberse iniciado con el tratamiento por mostrar disnea severa.

En el grupo II, dos animales del grupo I (SSF) mostraron estridor en la primera semana post-quirúrgica y disnea severa en la tercera semana post-cirugía por lo que tuvieron que ser sometidos a eutanasia.

En los animales tratados con traqueoplastia más CPVP (grupo IV), 1 animal mostro estridor severo al concluir la primera semana post-cirugía y disnea

severa al concluir la segunda, el resto de los animales del grupo tuvieron una evolución clínica sin complicaciones.

En el grupo VI (Traqueoplastia más MC), 2 animales presentaron estridor severo en la segunda semana después de la cirugía y disnea severa en la tercera semana, los animales restantes no mostraron este signo.

Los animales del grupo VIII, presentaron una evolución clínica sin complicación alguna.

Hallazgos radiográficos y tomográficos.

Todos los animales mostraron disminución de la luz traqueal a partir de la segunda semana de haberse producido el ET, sin embargo después de aplicar los tratamientos, los animales sometidos a cirugía y tratamiento médico con CPVP y PIRFE presentaron menor grado de estenosis (Figura 2).



Figura 2. Tomografía que muestra la estenosis traqueal previa a la aplicación del tratamiento.

Hallazgos macroscópicos

Macroscópicamente, los animales desarrollaron varios grados de ET, desde leve hasta severa en forma de reloj de arena y recibieron su tratamiento.

En el grupo I, después de aplicar el tratamiento todos los animales mostraron estenosis en reloj de arena (Figura 3). De los grupos con ET, solamente tratados farmacológicamente en ninguno se revirtió, sin embargo en los de los grupos IV y VIII se mantuvo similar a la diagnosticada. Después de la cirugía combinada con el tratamiento médico, los grupos de CPVP y PIRFE desarrollaron menos ET.



Figura 3. Se observa la estenosis traqueal en forma de reloj de arena, desarrollada al final del estudio por un animal tratado con SSF.

En los animales que fueron sometidos a traqueoplastía mas tratamiento médico, en ningún caso se presentó necrosis, infección, dehiscencia de la anastomosis o fístulas. La anastomosis se observó bien cicatrizada en todos los casos, pero en los animales que no concluyeron su estudio del grupo II, IV y VI la cicatriz de la anastomosis se observó fibrótica y con disminución de la luz traqueal mayor al 50%.

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 después de producir la ET. En los grupos que recibieron el tratamiento médico el tamaño de esta fue similar al de la ET. Mientras que en los grupos que fueron sometidos a cirugía y tratamiento médico, los grupo IV y VIII (CPVP y PIRFE, respectivamente) 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. Al comparar entre grupos todos los animales que recibieron tratamiento médico, presentaron mayor disminución de la luz traqueal que los grupos IV y VIII (Figura 4).

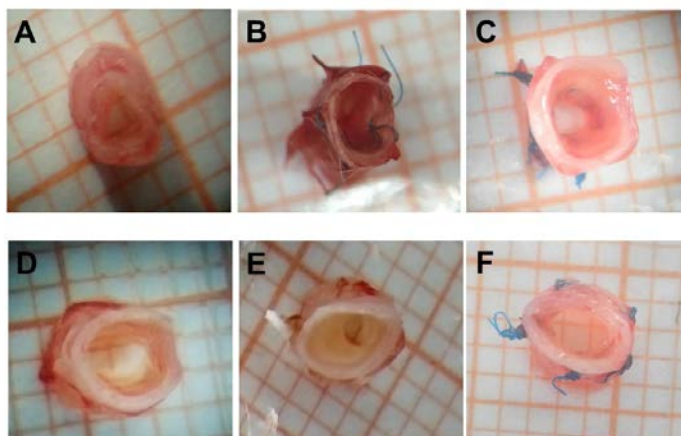


Figura 4. A) Estenosis traqueal sin tratamiento, B) ET del grupos I al final del estudio, C) ET del grupo II al final del estudio, D) Luz traqueal en el grupo tratado con traqueoplastía y CPVP, E) Traqueoplastía con MC, y F) Traqueoplastía con PIRFE. Muestra la cicatrización

Hallazgos microscópicos.

Microscópicamente todos los anillos controles mostraron apariencia normal. Los anillos estenosados se observaron con fibrosis e inflamación de moderada a severa. En los grupos que solo recibieron tratamiento médico, los grupos I y V, la presencia de estos hallazgos fue severa; mientras que en los grupos III y VII estos a fibrosis e inflamación fue moderada. Después de la traqueoplastía, todos los grupos presentaron pérdida parcial del epitelio, además todos los animales del grupo II, uno del grupo VIII desarrollaron hiperplasia del mismo. Al valorar el grado de fibrosis, los animales de los grupos I y V desarrollaron fibrosis severa, con fibras de colágena desorganizadas y gruesas; mientras que en los grupos III y VII estos hallazgos fueron moderados, pero las fibras de colágena se observaron delgadas. Los hallazgos observados después de la traqueoplastía revelaron que los animales tratados con SSF presentaron fibrosis severa con fibras desorganizadas y gruesas, los de MC desarrollaron fibrosis moderada con fibras delgadas desorganizadas; mientras que los tratados con CPVP y PIRFE mostraron fibrosis leve con fibras de colágena delgadas y organizadas. Al valorar la inflamación post-quirúrgica el grupo II mostró inflamación de moderada a severa, el grupo IV inflamación de leve a moderada; mientras el grupo VI desarrollo inflamación moderada y el grupo VIII inflamación leve. En todos los grupos, las células inflamatorias que predominaron fueron los linfocitos, pero la presencia de estos fue mayor en los animales tratados con SSF y MC.

Hallazgos bioquímicos

Al evaluar la cantidad de colágena formada por miligramo de tejido post-estenosis traqueal y post-traqueoplastía, se observó que en todos hay deposición de colágena; pero la producida en los grupos con ET fue mayor que en los que recibieron tratamiento quirúrgico combinado con algún modulador de la cicatrización. Sin embargo la cantidad en los grupos IV, VI y VIII fue similar a la de los anillos sanos.

Hallazgos inmunohistoquímicos

Al valorar la expresión del TGF- β 1 y 2 por inmunohistoquímica se observó que éste se expresa en todos los grupos, pero su expresión fue mayor en los grupos que solo recibieron tratamiento médico que en los que se les realizó traqueoplastía.

DISCUSION.

En la actualidad existen diferentes opciones terapéuticas para el manejo de la estenosis laringotraqueal, las cuales se individualizarán de acuerdo a la localización de la lesión, gravedad del caso, tipo de estenosis, el mecanismo por el que se haya producido y la presencia de comorbilidades. Sin embargo la resección y anastomosis término terminal del segmento traqueal estenosado se ha empleado como el tratamiento curativo en la mayoría de los casos, pero el hecho de que este tipo de lesiones curse con una intensa respuesta inflamatoria tanto por la lesión inicial de la vía aérea como por el tratamiento quirúrgico provoca la formación excesiva de tejido de granulación, fibrosis y re-estenosis traqueal, ha estimulado que en los últimos años se hayan intentado

aplicar procedimientos alternativos centrados en modular la respuesta inflamatoria y la producción de factores de crecimiento como el TGF- β , depósitos de colágena y citocinas pro-inflamatorias del huésped a la lesión inicial. El fármaco más utilizado para esto es la MC debido a su acción inhibitoria de la actividad fibroblástica, no obstante hay resultados muy variados acerca de su eficacia y no evita la re-estenosis; por lo que se ha intentado el uso de factores de crecimiento (31-33,65) y otros fármacos moduladores de la cicatrización para evitar la re-estenosis como la CPVP, así como la PIRFE. Estos fármacos han mostrado buenos resultados en modelos de cicatrización traqueal en animales, pero el primero requiere de 4 aplicaciones intratraqueales por traqueoscopia y además ninguno se ha probado en un modelo de estenosis traqueal. Por esta razón el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la CPVP SC, MC tópica y PIRFE VO sobre la producción del TGF- β -1, TGF- β 2, TGF- β 3 y depósitos de colágena macroscópica y microscópica en un modelo de ET en ratas con y sin traqueoplastia.

Todos los animales desarrollaron ET, debido a que el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), probablemente al quedarse en el tejido traqueal, estimule una excesiva angiogénesis, hiperpermeabilidad vascular y estimule la producción de factores de crecimiento como el TGF- β 1 y 2, así como prolongación de la fase inflamatoria de la cicatrización y fibrosis, como lo describió Revilla et al (59). Cabe mencionar que en nuestro modelo el segmento traqueal re-anastomosado se mantuvo sumergido en el VEGF por 30 minutos.

Clínicamente, la presencia de estridor observada en todos los grupos de estudio durante la segunda y tercera semana después de haber producido la

ET y post-traqueoplastía fue porque el procedimiento quirúrgico ocasiono una lesión, la cual estimulo la presencia de inflamación como mecanismo de defensa y su consecuente presencia de células y mediadores que eliminan los cuerpos extraños, bacterias, tejido dañado o degradan la MEC, que a su vez ocasionaron el incremento en el grosor de la mucosa traqueal que al paso del aire ocasiono la presencia de este signo (6,26). Mientras que la disnea severa observada en los animales que no concluyeron su tiempo de estudio fue ocasionada porque la inflamación prolongada ocasiono la fibrosis del sitio quirúrgico y la obstrucción al paso de aire (66).

Por otro lado, en el grupo VI, la permanencia del estridor por 3 semanas fue debida a que la MC no tiene efecto antiinflamatorio e incluso a los 2 meses de su aplicación, causa irritación del sitio lesionado, acumulación de detritus fibrinoides y tejido de granulación como lo describió Silva (12) al estudiar los efectos de la MC clínica y experimentalmente en la cicatrización traqueal.

Con respecto a los animales de los grupos IV y VIII que no presentaron estridor, fue debido a que la CPVP y la PIRFE mostraron su efecto antiinflamatorio y coincide con lo descrito por otros autores que han estudiado el efecto de este fármaco en modelos animales de cicatrización traqueal sobre la cicatrización traqueal y han observado lo mismo (3,38).

Los hallazgos radiológicos, tomográficos, macroscópicos y morfométricos confirmaron que el VEGF si produce ET como lo han reportado otros autores (59,67); sin embargo no concuerdan con lo reportado por Dodge et al que aplicaron de manera tópica el VEGF en cortes de 6 anillos traqueales y observaron que estos cicatrizan bien sin que se produzca ET (68). En todos los casos de los animales tratados solo medicamente, la ET no se revirtió, pero en

los tratados con CPVP y PIRFE se mantuvo y no evoluciono probablemente porque ambos medicamentos ejercieron sus efectos antiinflamatorios y evitaron la progresión de la fibrosis como se ha observado en los estudios de piel (39,41) y artritis reumatoide (69), así como en los fibrosis pulmonar y hepática (38,50,70). Por otro lado, en los grupos I y V la ET se observó más severa porque, ninguno de los dos medicamentos tiene efectos antiinflamatorios y el proceso de cicatrización siguió su curso normal.

La mayor disminución de la luz traqueal tanto en los grupos de ET tratada medicamente como en los de tratamiento combinado en los grupos tratados con SSF y MC probablemente fue originada porque como ya se menciona ninguno de los 2 compuestos tiene propiedades antiinflamatorias, favorecen que prevalezca la inflamación y por lo tanto la acumulación de tejido cicatrizal inmaduro en el sitio de la anastomosis que hace se reduzca la luz del órgano y coincide con lo observado por otros autores han estudiado las complicaciones provocadas por la aplicación tópica de MC en las lesiones traqueales (12,60,71). Mientras que en los grupos IV y VIII, la mejor cicatrización se pudo haber presentado porque ambos fármacos tienen actividad fibrinolítica (4,39,41). Estos hallazgos concuerdan con lo observado en otros trabajos en los que se utilizó la CPVP y la MC como moduladores de la cicatrización traqueal en perros (3) y también coinciden con lo observado por Zhou et al. (72) quienes en un modelo murino de trasplante heterotópico traqueal observaron que los animales tratados con PIRFE desarrollaron menor fibrosis luminal.

Histológicamente los anillos estenosados presentaron más fibrosis e inflamación porque el VEGF promueve una sobreexpresión de varias moléculas de adhesión celular del endotelio, quimio-atracción de monocitos y

macrófagos que favorecen el infiltrado leucocitario y porque, además, incrementa la permeabilidad de vasos linfáticos (que en condiciones fisiológicas están colapsados) que facilitan el transporte linfático hacia la matriz extracelular, retraso en el alivio del edema y de la inflamación (67,73).

Por otro lado el mayor desarrollo de fibrosis y mala organización de las fibras de colágena en los animales que recibieron el tratamiento médico como el combinado con SSF y MC, posiblemente fue originado porque no tienen propiedades antifibroticas y además la aplicación de la MC ocasiona irritación del sitio lesionado e inflamación prolongada que favorece la fibrosis como lo han descrito varios autores que han estudiado los cambios histopatológicos ocasionados por la MC en oído (74), mucosa mastoidea (75), ojo (76) y tráquea (77).

La fibrosis moderada y mejor organización de las fibras de colágena observada en los grupos III y VII se ocasiono tanto la CPVP como la PIRFE inhibición de las citocinas proinflamatorias y profibrogénicas como lo hacen estos fármacos, evitan la fibrosis, promueven la formación de fibras de colágena organizadas como en los tejidos normales (41,78).

Con respecto a los depósitos de colágena en el tejido cicatrizal y la expresión del TGF- β 1 y 2 post-estenosis traqueal fue mayor que post-traqueoplastía combinado con algún modulador de la cicatrización, posiblemente porque provoca cambios en el metabolismo celular y disminuye la producción de citocinas proinflamatorias, así como profibrogénicas (79) y en estudios de piel con cicatrices hipertróficas y en esclerodermia se ha observado que la expresión *in situ* de TGF- β 1 por inmunohistoquímica y los depósitos de

colágena disminuye con su aplicación (41,53). Por otro lado, no existen estudios en tráquea en los que se haya evaluado la producción del TGF- β 1 y 2; pero en un estudio realizado *in vitro* en cultivos de fibroblastos dérmicos humanos se describió que la MC inhibe la expresión del mismo, evitando la expresión de este factor de crecimiento y de colágena (80), lo que coincide con lo observado en este estudio. En los grupos tratados con PIRFE se observó menor expresión de TGF- β 1 porque es un fármaco que tiene propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y anti-fibróticas que evitan la inflamación prolongada, permiten la regulación de la expresión de citocinas pro-inflamatorias y pro-fibrogénica, así como la regulación de la homeostasis entre la síntesis y la degradación de la colágena en la MEC como lo han observado varios autores (81,82). Solo existe un estudio realizado en tráquea, en donde en un modelo de cicatrización traqueal en ratas observaron que tanto la CPVP, MC y la PIRFE disminuyen la producción de este factor de crecimiento (38).

CONCLUSIÓN.

Con base a lo anterior se puede concluir que tanto la aplicación subcutánea de CPVP y la administración de PIRFE no revierten la estenosis traqueal, pero la detienen y cuando se utilizan en combinación con la traqueoplastia evitan la re-estenosis ya que disminuyen la inflamación, fibrosis, expresión de TGF- β 1 y 2, depósitos de colágena en la cicatriz de la ET y postraqueoplastia en un modelo experimental de ET en ratas.

REFERENCIAS.

- 1.- Grillo HC. Development of tracheal surgery: A historical review. Part 2: Treatment of tracheal diseases. *Ann Thorac Surg.* 2003;75: 1039–1047.
- 2.- 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.
- 3.- 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.
- 4.- González I. Efecto de la aplicación de la mezcla de ácido hialurónico y colágeno polivinil-pirrolidona y de la mitomicina c sobre la expresión de decorina en la cicatriz postraqueoplastía en un modelo experimental canino. Tesis Especialidad de Otorrinolaringología, Cirugía de Cabeza y Cuello. México D.F. Facultad de Medicina. UNAM, 2013.
- 5.- Weymuller EA. Laryngeal injury from prolonged endotracheal intubation. *Laryngoscope* 1988; 98 Suppl 45, Part 2: 1-15.
- 6.- Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience.* 2004; 9: 283-289.
- 7.- Salem C, Vidal A, Mariangel P, Concha M. Cicatrices hipertróficas y queloides. *Cuad. Cir.* 2002; 16: 77-86.
- 8.- Rahban SR, Garner WL. Fibroproliferative scars. *Clin Plast Surg.* 2003; 30:77-89.

- 9.- Chen WY, Rogers AA. Recent insights into the causes of chronic leg ulceration in venous diseases and implications on other types of chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 2007; 15: 434-449.
- 10.- 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: 951-961.
- 11.- Liu Y, Min D, Bolton T, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care.* 2009; 32: 117-119.
- 12.- Silva-Martínez M. Expresión de TGF- β 1, deposición de colágena en cicatriz traqueal después de la aplicación de diferentes moduladores de la cicatrización postraqueoplastía. Tesis Licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 2016.
- 13.- Elicora A, Liman ST, Yegin BA, Akgül AG, Eroglu H, Yildiz K, Topcu S, Ozer C. Effect of Locally Applied Transforming Growth Factor Beta 3 on Wound Healing and Stenosis Development in Tracheal Surgery. *Respir Care.* 2014; 59: 1281-1286.
- 14.- 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.
- 15.- Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burn Trauma* 2012; 2:18-28.
- 16.- Walraven M, Gouverneur M, Middelkoop E, Beelen R, Ulrich M. Altered TGF- β signaling in fetal fibroblasts: What is known about the underlying mechanisms?. *Wound Rep Reg.* 2014; 22: 3-13.

- 17.- Vilchis-Landeros MM, Juárez P, López-Casillas F. I. El papel fisiopatológico del TGF- β en las nefropatías de diversas etiologías: los inhibidores del TGF- β como agentes terapéuticos potenciales Gac Méd Méx. 2003; 2: 126-134.
- 18.- Hernández-Pando R. II. Participación del factor de transformación tumoral- β en la regulación de la inflamación y la respuesta inmunológica. Gac Méd Méx. 2003; 2: 135-138.
- 19.- Senties-Gómez MD, Gálvez-Gastélum FJ, Meza-García Eduardo, Armendáriz-Borunda J. Fibrosis Hepática. El papel de las metaloproteinasas y de TGF- β . Gac Méd Méx 2005; 141: 315-322.
- 20.- Prieto M, Rivas JV, López-Novoa JM, Pérez-Barriocanal F. El TGF- β : síntesis y mecanismo de acción. Nefrología. 2002; 22: 135-143.
- 21.- Hernández CA, Toro AM. Enfoque y manejo de las cicatrices hipertróficas y queloides. Rev Asoc Colomb Dermatol. 2011; 19: 218-228.
- 22.- Rolfe KJ, Grobbelaar AO. A review of fetal scarless healing. ISRN Dermatol. 2012;2012:698034. doi: 10.5402/2012/698034. Epub 2012 May 17.
- 23.- Zheng Z, Nguyen C, Zhang X, Khorasani H, Wang JZ, Zara JN, Chu F, Yin W, Pang S, Le A, Ting K, Soo Ch. Delayed wound closure in fibromodulin-deficient mice is associated with increased TGF- β 3 signaling. J Invest Dermatol. 2011; 131: 769-778.
- 24.- Cordeiro MF. Beyond mitomycin: TGF- β and wound healing. Prog Retin Eye Res. 2002; 21:75-89.
- 25.- 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.

- 26.- Hirshoren N, Eliashar R, Wound-healing modulation in upper airway stenosis-myths and facts. *Head Neck*; 2009; 31:111-126.
- 27.- Liberman M, Cassivi SD. Bronchial Stump Dehiscence: Update on Prevention and Management. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2007; 19: 366-373.
- 28.- Sarper A, Aytan A, Eser I. Tracheal stenosis after tracheostomy or intubation: review with special regard to cause and management. *Tex Heart Inst J*. 2005; 32: 154-158.
- 29.- Cotton RT. Management of subglottic stenosis. *Otolaryngol Clin North Am*. 2000; 33: 111-130.
- 30.- McCaffrey TV. Management of laryngotracheal stenosis on the basis of site and severity. *Otolaryngol Head Neck surg*, 1993; 109:468-473.
- 31.- Cortés de Miguel S, Cabeza Barrera J, Gallardo Medina M, Cassini Gómez de Cádiz LF, Salmerón-García A, Rodríguez Lucas F. Mitomicina C tópica endotraqueal como terapia complementaria al tratamiento endoscópico de la estenosis laringotraqueal fibrótico-cicatricial recurrente. *Farm Hosp*. 2011; 35: 32-35.
- 32.- Barros Casas D, Fernández-Bussy S, Folch E, Flandes Aldeyturriaga J, Majid A. Patología obstructiva no maligna de la vía aérea central. *Arch Bronconeumol*. 2014; 50:345-354.
- 33.- Núñez Áreas EA. Comportamiento de la estenosis de tráquea en pacientes ingresados en el servicio de cirugía, en el Hospital Militar Escuela, Dr. Alejandro Dávila Bolaños, en el periodo comprendido de enero 2010 a diciembre del 2014. Tesis para optar al título de Médico Especialista en Cirugía

General. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. Facultad de Ciencias Médicas. 2015.

34.- Bricchet A, Verkindre C, Dupont J, Carlier ML, Darras J, Wurtz A, et al. Multidisciplinary approach to management of postintubation tracheal stenosis. *Eur Respir J.* 1999;13:888-893.

35.- Bagheri R, Majidi M, Khadivi E, Sharifian A, Tabari A. Outcome of surgical treatment for proximal long segmental post intubation tracheal stenosis. *J Cardiothorac Surg.* 2013;8:35.

36.- Metha AC, Lee FY, Cordasco EM, Kirby T, Eliachar I, De Boer G. Concentric tracheal and subglottic stenosis. Management using the Nd-YAG laser for mucosal sparing followed by gentle dilatation. *Chest.* 1993; 104: 673-677.

37.- Perepelitsyn I, Shapshay SM. Endoscopic treatment of laryngeal and tracheal stenosis-has mitomycin C improved the outcome?. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 131:16-20.

38.- Olmos-Zuñiga JR, Silva-Martínez M, Jasso-Victoria R, Baltazares-Lipp M, Hernández-Jiménez C, Buendía-Roldan I, Jasso-Arenas J, Martínez-Salas A, Calyeca Gómez J, Guzmán-Cedillo AE, Gaxiola-Gaxiola M, Romero-Romero L. Effects of pirfenidone and collagen-polyvinylpyrrolidone on macroscopic and microscopic changes, TGF- β 1 expression and collagen deposition in an experimental model of tracheal wound healing. *BioMed Research Int.* Volume 2017 (2017), Article ID 6471071, 10 pages <https://doi.org/10.1155/2017/6471071>.

- 39.- Rodríguez R, Furuzawa J, Corchado A, Krötzsch F. Collagen-polyvinylpyrrolidone promotes human wound healing through cytokine down modulation. *Wound Rep Reg.* 2001; 9: 166.
- 40.- 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.
- 41.- Krötzsch E, Díaz de León E, Furuzawa GJ, Marquez R, Quiroz E, Cytokine expresión is down regulated by collagen-polivinylpirrolidone in hypertrophic scars. *J Invest Dermatol.* 1998; 111: 828-834.
- 42.- 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.
- 43.- Santillán A. 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.
- 44.- 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.
- 45.- 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.
- 46.- 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.

- 47.- Selman M, Navarro MC, Gaxiola M. Fibrosis pulmonar idiopática: en busca de un tratamiento eficaz. Arch Bronconeumol. 2005;41:15-20.
- 48.- 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.
- 49.- Nakayama S, Mukae H, Sakamoto N, Kakugawa T, Yoshioka S, Soda H, Oku H, Urata Y, Kondo T, Kubota H, Nagata K, Kohno S. Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF- β 1-stimulated human lung fibroblasts. Life Sci. 2008; 82: 210-217.
- 50.- García L, Hernández I, Sandoval A, Salazar, García J, Vera J, Grijalva G, Muriel P, Margolin S, Armendariz-Borunda J. Pirfenidone affectively reverses experimental liver fibrosis. J Hepatol. 2002; 32: 797-805.
- 51.- Shimizu T, Kuroda T, Hata S, Fukagawa M, Margolin SB, Kurokawa K. Pirfenidone improves renal function and fibrosis in the postobstructed kidney. Kidney Int. 1998; 54: 99-109.
- 52.- Furuzawa-Carballeda J, Cabral AR, Zapata-Zuñiga M, Alcocer-Varela J. Subcutaneous Administration of polymerized-type I collagen for the treatment of patients with rheumatoid arthritis. An open-label pilot trial. J Rheumatol 2003; 30: 140-149.
- 53.- 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.

- 54.- 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.
- 55.- 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.
- 56.- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. PLoS Biol 8(6): e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412.
- 57.- Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. Mol Pain. 2011; 7: 55. <http://www.molecularpain.com/content/7/1/55>
- 58.- 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.
- 59.- Rodríguez-Revilla I, Olmos-Zuñiga R, Jasso-Victoria R, Soda-Merhy A, Sotres-Vega A, Baltazares-Lipp M, et al. *Efecto del factor de crecimiento del endotelio vascular en la cicatrización traqueal (traqueoplastía o autotrasplante) en ratas.* An ORL Mex. 2009; 54: 55-62.

- 60.- Rahbar R, Shapshay SM, Healy GB. Mitomycin: Effects on laryngeal and tracheal stenosis, benefits and complications. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2001; 110:1-6.
- 61.- Freitag L, Ernst a, Unger M, Kovitz K, Marquette CH. A proposed classification system of central airway stenosis. *Eur Respir J.* 2007; 30: 7-12.
- 62.- 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.
- 63.- Mungu3a A. Tesis: Comparaci3n de dos m3todos para la determinaci3n del contenido de col3gena en pulm3n de rat3n. Maestr3a en Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM, 2007.
- 64.- Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: An open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *Plos One.* 2014; 9; 1-11
- 65.- Anton-Pacheco J, Usategui A, Mart3nez I, Garc3a-Herrero CM, Gamez AP, Grau M et al. TGF-b Antagonist Attenuates Fibrosis But Not Luminal Narrowing in Experimental Tracheal Stenosis. *Laryngoscope,* 2017; 127: 561–567.
- 66.- 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.
- 67.- Lazaraous D, Shou M, scheinowitz M, Hodge E, et al. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the response to injury. *Circulation.* 1996; 94: 1074-1082.

- 68.- Dodge-Khatami A, Backer C, Holinger L, Mavroudis C, et al. Healing of a free tracheal autograft is enhanced by topical vascular endothelial growth factor in a rabbit model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:554-61.
- 69.- Furuzawa-Carballeda J, Lima G, Llorente L, Nuñez-Alvarez C, Ruiz-Ordaz BH, Echevarría-Zuno S, Hernández-Cuevas V. Polymerized-type I collagen downregulates inflammation and improves clinical outcomes in patients with symptomatic knee osteoarthritis following arthroscopic lavage: A randomized, double-blind, and placebo-controlled clinical trial. *Scientific World Journal*. 2012, 342854. doi:10.1100/2012/342854.
- 70.- Armendáriz-Borunda J, Islas-Carbajal MC, Meza-García E, Rincón AR, Sandoval AS, Salazar A, Berumen J, Alvarez A, Alvarez A, Covarrubias A, Aréchiga G, García L. A pilot study in cirrhotic patients using a new antiinflammatory and antifibrotic agent, pirfenidone. *Gut*. 2006; 55: 1663-1665.
- 71.- 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.
- 72.- 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.
- 73.- Kunstfeld R, Hirakawa S, HonG K, Schacht T, et al. Induction of cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions in VEGF-A transgenic mice results in chronic skin inflammation associated with persistent lymphatic hyperplasia. *Blood* 2004;104:1048-1057.

- 74.- 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.
- 75.- Ozturk L, Kaygusuz I, Akpolat N, Keles E, Karlidag T, Alpay HC, Yalcin S. Histopathologic changes in guinea pig mastoid mucosa after topical mitomycin C application followed by mastoidectomy. *Am J Otolaryngol.* 2008; 29: 300-304
- 76.- Zhong H, Sun G, Lin X, Wu K, Yu M. Evaluation of pirfenidone as a New Postoperative Antiscarring Agent in Experimental Glaucoma Surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52: 3136-3142.
- 77.- Eliashar R, Eliachar I, Esclamado R, Gramlich T and Strome M. Can Topical Mitomycin Prevent Laryngotracheal Stenosis?. *Laryngoscope.* 1999; 109: 1594-1600.
- 78.- 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.
- 79.- Castro-Alba PJ. Expresión de Factor Inducible de Hipoxia HIF 1 α y VEGF implicados en el síndrome del túnel del carpo y su asociación con la aplicación de Colágeno y Polivinipirrolidona in vitro. Tesis Maestría en Ciencias de la Salud. Escuela Superior de Medicina. Instituto Politécnico Nacional. México; D.F. Marzo de 2011.
- 80.- 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.

81.- 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>.

82.- Salazar-Montes A, Ruiz-Corro L, López-Reyes A, Castrejón-Gómez E, Armendáriz-Borunda J. Potent antioxidant role of pirfenidone in experimental cirrhosis. *Eur J Pharmacol.* 2008; 595: 69-77.