



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS PROFIBRÓTICAS DE LA
MATRIZ EXTRACELULAR, POST-APLICACIÓN DE MODULADORES DE LA
CICATRIZACIÓN EN RATAS CON ESTENOSIS TRAQUEAL**

T E S I S QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A: MARIANA SILVA MARTINEZ

TUTOR:

J RAÚL OLMOS ZÚÑIGA

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

COMITÉ TUTOR:

JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

SARA CABALLERO CHACÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

CIUDAD DE MEXICO, NOVIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por apoyarme, quererme tanto, por impulsarme a cumplir mis metas, porque gracias a sus enseñanzas, cuidados y consejos puedo ser cada día una mejor persona.

A mi hermano Diego por ser uno de los pilares más fuertes e importantes de mi vida, por enseñarme a nunca darme por vencida, defender mis sueños, disfrutar la vida y apoyarme incondicionalmente.

A mis tías Rocío y Marcela por el apoyo y el cariño que siempre me han brindado ya que, sin ellos, este proceso no hubiera sido fácil.

Al Dr. Olmos por ser mi tutor y siempre confiar en mí, por enseñarme lo bonito y divertido que es la investigación y por ser esa guía que me ha llevado a tantas satisfacciones profesionales.

A los integrantes del Departamento de Cirugía Experimental: Dr. Jasso por tantos consejos y por la confianza que me da, Dra. Matilde por todas sus enseñanzas, Sergio por toda su ayuda, Beto por todas las buenas ideas y apoyo para este proyecto.

A mis compañeras del INER, Antonia por toda su ayuda en la toma de fotografías, Andrea por poner un poco de orden a mi desorden, por ser mi mejor equipo en este proceso y por hacer los momentos de trabajo más agradables y Marisabel por ser parte de este proyecto y por todas sus aportaciones a esta tesis.

A Jazmín Calyeca por compartirme sus conocimientos y formar parte importante de mi formación profesional.

A mi Universidad y mi facultad por darme tanto conocimiento porque soy orgullosamente UNAM.

Al CONACYT por todo el apoyo que me brindó para la realización de mis estudios de maestría y realizar esta investigación.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 Cicatrices fibróticas	3
1.2 Matriz extracelular (MEC).....	3
1.3 Componentes de la MEC involucrados en la cicatrización	5
1.3.1 Colágena	5
1.3.2 Fibronectina.....	6
1.3.3 Elastina	8
1.4 Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)	9
1.4.1 Isoformas del TGF- β	10
1.5 Cicatrices patológicas en la tráquea.....	12
1.6 Estenosis traqueal.....	13
1.6.1 Tipos de Estenosis traqueal	13
1.6.1.1 Clasificación de la ET por su etiología.....	14
1.6.1.2 Clasificación de la ET por localización y longitud	14
1.6.1.3 Clasificación de la ET por la severidad de la disminución de la luz traqueal	15
1.6.2 Tratamiento de las estenosis traqueales	16
1.6.2.1 Tratamiento farmacológico	16
1.6.2.2 Tratamientos endoscópicos.....	17
1.6.2.3 Tratamientos quirúrgicos	19
1.7 Moduladores de la cicatrización	21
1.7.1 Colágena polivinil-pirrolidona (CPVP)	21
1.7.2 Pirfenidona	21

2 JUSTIFICACIÓN	22
3 HIPÓTESIS	23
4 OBJETIVOS	23
5 OBJETIVOS ESPECIFICOS	23
6 MATERIAL Y MÉTODOS	24
6.1 Animales de experimentación	24
6.2 Grupos de estudio	26
6.3 Producción de la estenosis.....	27
6.4 Técnica quirúrgica de la resección y anastomosis termino-terminal	28
6.5 Tratamiento	30
6.6 Evaluación.....	31
7 RESULTADOS	37
7.1 Hallazgos clínicos.....	37
7.2 Hallazgos tomográficos	39
7.3 Hallazgos macroscópicos.....	42
7.4 Hallazgos microscópicos	45
7.5 Hallazgos bioquímicos	51
7.6 Hallazgos inmunohistoquímicos	53
8 DISCUSIÓN	63
9 CONCLUSIONES	71
10 REFERENCIAS	72

RESUMEN

El tratamiento de la estenosis traqueal (ET) es mediante procedimientos endoscópicos y quirúrgicos, solos o en combinación con moduladores de la cicatrización (MDC) como mitomicina C (MC) para evitar cambios en la expresión factores de crecimiento (TGF- β 1) y proteínas (fibronectina, elastina y colágena) de la matriz extracelular (MEC) que favorezcan la fibrosis y ET, por esta razón es necesario buscar otros MDC. La colágena polivinil pirrolidona (CPVP) y la pirfenidona (PIRFE) disminuyen la inflamación y fibrosis en piel, hígado y pulmón; pero su uso durante la ET no se ha estudiado. **Objetivo.** Evaluar el efecto de aplicación tópica y SC de CPVP, MC tópica y PIRFE VO sobre la expresión del TGF- β 1, producción de fibronectina, elastina y de colágena macroscópica y microscópica en un modelo de ET en ratas con y sin traqueoplastia. **Material y métodos.** Cincuenta ratas Wistar con ET, veinticinco fueron tratadas farmacológicamente (Tratamiento A) y veinticinco con resección y anastomosis termino terminal del segmento traqueal estenosado (Traqueoplastia) (Tratamiento B). Grupo I(A): ET-SSF, Grupo II(A): ET-CPVP, Grupo III(A): ET-MC, Grupo IV(A): ET-PIRFE, Grupo V(A): ET-CPVP-PIRFE, Grupo I(B): Traqueoplastia-SSF, Grupo II(B): Traqueoplastia-CPVP, Grupo III(B): Traqueoplastia-MC, Grupo IV(B): Traqueoplastia-PIRFE, Grupo V(B): Traqueoplastia-CPVP-PIRFE. Los animales se valoraron clínica y tomográficamente (TAC) por 8 semanas, al final del estudio se evaluó en la ET y cicatriz traqueal postquirúrgica la expresión de TGF- β 1, fibronectina, elastina y depósitos de colágena. **Resultados.** En los grupos con el tratamiento A, en ningún caso se revirtió la ET, pero se detuvo su evolución y fue menor en los grupos II(A), IV(A) y V(A) ($p < 0.001$, ANDEVA). Postcirugía, ningún animal mostró re-estenosis (RE). Macroscópica e histológicamente los animales tratados con CPVP, PIRFE y su mezcla sin cirugía y con traqueoplastia mostraron menor inflamación y fibrosis ($p < 0.001$ Kruskal-Wallis). La expresión de TGF- β 1, fibronectina y elastina fue severa en todos los grupos con ET, mientras que postraqueoplastia fue menor en los tratados con CPVP, PIRFE y su mezcla ($p < 0.005$ ANDEVA,) vs grupos de SSF. Los depósitos de colágena fueron menores en los grupos II(B), III(B), IV(B) y V(B) vs tratamiento A y I(B) ($p < 0.001$, ANDEVA, Tukey). **Conclusión.** El uso de CPVP, PIRFE y su mezcla detienen la evolución de la ET, disminuyen la expresión de TGF- β 1, fibronectina, elastina y colágena durante la ET y postraqueoplastia en un modelo de ET en ratas.

Palabras clave: Estenosis traqueal, re-estenosis, TGF- β 1, fibronectina, elastina, depósitos de colágena, PIRFE, CPVP, MC.

ABSTRACT

The treatment of tracheal stenosis (ET) is through endoscopic and surgical procedures, alone or in combination with wound-healing modulators (WHM), such as mitomycin C (MC) in order-to prevent changes in the expression of extracellular matrix (ECM) growth factors (TGF- β 1) and proteins (fibronectin, elastin and collagen) that promotes fibrosis and TS, therefore, it is necessary to find new WHM. Collagen-polyvinylpyrrolidone (CPVP) and pirfenidone (PIRFE) decreases inflammation and fibrosis on skin, liver and lung, but it's role on TS has not been studied yet. **OBJECTIVE:** To evaluate the topical and SC application of CPVP, topical MC and PO PIRFE on the TGF- β 1 expression, and on the fibronectin, elastin and macroscopic and microscopic collagen production in a TS rat model with and without tracheoplasty. **Materials and methods:** Fifty Wistar rats with TS. Twenty-five were pharmacologically treated (treatment A) and twenty-five underwent tracheal stenosis resection and end-to-end anastomosis (tracheoplasty) (treatment B). Group I(A): TS-NSS, Group II(A): TS-CPVP, Group III(A): TS-MC, Group IV(A) TS-PIRFE, Group V(A): TS-CPVP-PIRFE. Group I(B): Tracheoplasty-NSS, Group II(B): Tracheoplasty-CPVP, Group III(B): Tracheoplasty-MC, Group IV(B): Tracheoplasty-PIRFE, Group V(B): Tracheoplasty-CPVP-PIRFE. The animals were clinically assessed and with CT scan for 8 weeks, at the end of the study the expression of TGF- β 1, fibronectin, elastin and collagen deposits were evaluated on the TS and postsurgical scar. **Results.** None of the treatment A groups showed TS reversal, but progression decreased, and TS was lower in groups II(A), IV(A) y V(A) ($p < 0.001$, ANOVA). After surgery, none of the animals had recurrent stenosis (RS). Macroscopically and histologically the animals treated with CPVP, PIRFE and CPVP-PIRFE with and without surgery showed milder inflammation and fibrosis ($p < 0.001$ Kruskal-Wallis). The TGF- β 1, fibronectin and elastin expression was severe in every group with TS, while the tracheoplasty groups treated with CPVP, PIRFE and CPVP-PIRFE had a lower expression when compared to groups with NSS. The collagen deposits were milder in groups II(B), III(B), IV(B) y V(B) compared to treatment A and I(B) ($p = < 0.001$, ANOVA, Tukey). **Conclusion.** The use of CPVP, PIRFE and CPVP-PIRFE halt the TS progression, decreases the TGF- β 1, fibronectin, elastin and collagen expression during TS and after tracheoplasty in a TS rat model.

KEY WORDS: tracheal stenosis, TGF- β 1, fibronectin, elastin, collagen deposits, PIRFE, CPVP, MC.

1. INTRODUCCIÓN.

La cicatrización es el proceso de reparación de un tejido dañado en el que se involucra una cascada de eventos que requieren de interacciones coordinadas entre células, factores solubles, así como de los componentes de la matriz extracelular (MEC). Dependiendo de la eficiencia y control con el que se realicen estos eventos, se producirá una cicatriz normal o bien una patológica, ya sea deficiente o fibrótica (1,2).

1.1 Cicatrices fibróticas.

Las cicatrices fibróticas, al igual que las deficientes, siempre están precedidas por una prolongación de la fase inflamatoria de la cicatrización o una alteración durante la contracción o remodelación (3). Se caracterizan porque el tejido normal afectado se sustituye por la MEC en la que predomina el depósito de la colágena como resultado de la inflamación prolongada, así como disminución de la producción de TGF- β 3, incremento en la producción de TGF- β 1 y TGF- β 2 (4,5) y cambios en la expresión de fibronectina, elastina y metaloproteinasas (MMPs) (1,2,6).

1.2 Matriz Extracelular (MEC).

La MEC es un complejo de distintas proteínas como las colágenas (responsables de conferirle resistencia a los tejidos), proteoglicanos, moléculas de adhesión, así como diferentes glicoproteínas entre las que se encuentra la fibronectina (esencial para la adhesión) y la elastina (la cual confiere elasticidad y flexibilidad) (7). Este complejo de proteínas, forma una red tridimensional dentro de los tejidos y

algunas de estas moléculas desempeñan funciones como mediadores de señalización o realizan cambios estructurales en la MEC. Estos componentes son sintetizados y regulados por las células de soporte (fibroblastos/fibroцитos, condroblastos/condrocitos, osteoblastos/osteocitos, miofibroblastos y adipocitos) (8).

En general se puede decir que la MEC desempeña un papel fundamental en los tejidos ya que mantiene la integridad estructural, constituye un filtro biofísico de protección y nutrición y proporciona resistencia y flexibilidad. Así mismo tiene un papel importante en los procesos de migración celular, diferenciación, proliferación, apoptosis y adhesión celular, desarrollo embrionario, morfogénesis tisular, angiogénesis, mantenimiento de la función tisular normal, respuesta celular ante una lesión y cicatrización (8,9). Además, en el proceso de cicatrización participa indirectamente en la modulación de la secreción de proteasas extracelulares (las cuales degradan la MEC durante su remodelación), así como en la actividad y biodisponibilidad de factores de crecimiento, los cuales pueden prolongar o modular la acción de otros factores como el TGF- β o TNF- α (7,10).

La remodelación de la MEC en condiciones fisiológicas normales, se lleva a cabo mediante un equilibrio dinámico entre la síntesis y degradación de sus componentes, en la cual, dependiendo del tipo y la cantidad de células y proteínas, forma y organización de sus proteínas, almacenamiento y producción de citocinas y factores de crecimiento, equilibrio de MMPs y sus inhibidores, así como los mecanismos de endocitosis, se puede presentar una remodelación adecuada. Cuando se presenta una alteración en la regulación de la remodelación de la MEC pueden presentarse procesos patológicos, inflamatorios, autoinmunes,

degenerativos, tumorales (8,9,11) o formación de cicatrices deficientes o fibróticas. Un ejemplo de esto, son las enfermedades fibroproliferativas que se definen como la reparación alterada del tejido, debido a un cambio en la remodelación de la MEC que conduce a una acumulación de componentes de la matriz y que concluye en la pérdida de la función del órgano afectado (7,10,12).

1.3 Componentes de la MEC involucrados en la cicatrización.

1.3.1 Colágena.

La colágena forma parte de una familia de moléculas que representa el componente principal de la estructura de la MEC y son sintetizadas por los fibroblastos.

Está formada por un conjunto de tres cadenas polipeptídicas agrupadas en una estructura helicoidal. La secuencia de la colágena se caracteriza por repeticiones de una unidad conformada por tres aminoácidos, Glicina-X-Y, donde X y Y pueden ser cualquier aminoácido, pero con frecuencia son prolina (28%) e hidroxiprolina (38%) inminoácidos que le confieren rigidez y estabilidad a la molécula (7,13).

La mayoría de las colágenas se sintetizan como procolágenos que se procesan extracelularmente para formar una colágena madura también conocida como tropocolágeno. Como parte de este proceso se forman entrecruzamientos entre lisinas e hidroxilisinas con las cadenas de esta molécula y entre otras moléculas de colágena. Estos entrecruzamientos aumentan con el tiempo; así una colágena recién sintetizada y depositada en el espacio extracelular tiene pocos entrecruzamientos, pero con el tiempo aumentan y las fibras de colágena se vuelven menos elásticas y más quebradizas (7).

De acuerdo con sus estructura y función, las colágenas se pueden clasificar en: a) colágenas fibrilares (colágenas tipo I, II, III, V y XI) que representan el 90% de todas las colágenas presentes en el organismo. B) Colágenas asociados a fibras (colágenas tipo IX y XII) las cuales se unen a las colágenas fibrilares y a otros componentes de la MEC. C) Colágenas que forman redes (colágenas tipo IV) las cuales constituyen uno de los principales componentes de las membranas basales y d) las colágenas de anclaje (colágena tipo VII) las cuales unen a la colágena tipo I con las láminas basales (7,8).

Una vez que la colágena es depositada en el espacio extracelular ejerce diferentes funciones en diferentes procesos biológicos uniéndose a los receptores o ligandos de superficie celular y secuestrando factores de crecimiento que interviene en diferentes procesos regenerativos, de reparación y patológicos, como la cicatrización, angiogénesis, fibrosis y crecimiento tumoral (13).

En el proceso de cicatrización está presente en todas las fases, su síntesis inicia a partir del primer día del proceso inflamatorio, aumenta en la fase proliferativa cuando los fibroblastos llegan al tejido lesionado (48-72 h) alcanzando su nivel máximo a las 2-3 semanas posteriores a la lesión y termina en la fase de remodelación donde la colágena tipo III inmadura se gradua y se da la formación de la colágena tipo III madura; sin embargo en las cicatrices patológicas la expresión de esta puede ser muy elevada y desarrollar fibrosis (1)

1.3.2 Fibronectina.

La fibronectina es una glicoproteína multidominio que tiene un peso molecular de 230-270 KDa. Se encuentra en forma soluble en el plasma como dímero y en

forma insoluble en la MEC como multímeros de alto peso molecular mantenidos por enlaces covalentes, los cuales son organizados en el componente fibrilar de la misma mediante enlaces disulfuro (14).

La fibronectina plasmática es sintetizada por los hepatocitos, mientras que la celular es secretada por los fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos (15).

La actividad biológica de la fibronectina es resultado de la conformación de las moléculas que la constituyen, así como la cantidad y la tensión mecánica de las fibras de la MEC y factores ambientales como el pH (16).

Esta proteína está compuesta por unidades repetitivas de tipo I, II y III (FNI, FNII y FNIII). La FNI participa en la unión con la fibrina, heparina y colágena, FNII solo en la unión con la colágena y FNIII participa en la unión con las células de la MEC.

En la MEC forma una red fibrilar a través de la cual interaccionan receptores de superficie celular regulando funciones celulares como adhesión celular, migración, crecimiento y diferenciación (16).

La fibronectina está presente en tejidos sometidos a cicatrización y en la formación patológica de tejido fibroso (11). Su forma plasmática participa en la fase temprana de la cicatrización uniéndose a las plaquetas y fibrina proporcionando resistencia al cuágulo formado durante la hemostasia, además de ayudar a las plaquetas a realizar sus funciones de adherencia, migración y agregación. Posteriormente, las células endoteliales y los fibroblastos que llegan a la herida depositan fibronectina para la formación de tejido de granulación, la cual promueve la adhesión y depósito de otras proteínas como la colágena a través de la formación de fibrillas (16). Así mismo, diversos estudios *in vitro* han demostrado que la fibronectina juega un papel muy importante en la regulación del TGF- β , ya que está

involucrada en la incorporación inicial de la proteína de unión asociada a latencia (LTBP-1) dentro de la MEC (17). Por otra parte, en la fase final del proceso de cicatrización está involucrada en la contracción de la herida (16,17).

1.3.3 Elastina.

La elastina es una proteína hidrofóbica, sintetizada de forma soluble (tropoelastina) y secretada por células musculares lisas y fibroblastos. Se caracteriza por presentar una estructura que contiene aminoácidos con bajo contenido en residuos ácidos o básicos y una muy alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos, especialmente valina. Además, contiene varios derivados de lisina que sirven de base para uniones entrecruzadas con los monómeros de elastina, los cuales son fundamentales para adquirir las propiedades elásticas de la molécula.

La polimerización de la tropoelastina es catalizada por la lisiloxidasas, la cual desamina los residuos de lisina para formar las uniones cruzadas de desmosina e isodesmosina, las cuales son dos estructuras que son exclusivas de la elastina presente en los vertebrados y que pueden usarse como marcadores de la proteína. Esta modificación resulta en una fibra muy estable, altamente inerte y soluble. Una vez que la tropoelastina es secretada al espacio extracelular, se une a una proteína de membrana que es similar al receptor de laminina (7).

La producción de elastina está ausente en la madurez, sin embargo, al presentarse una lesión puede ser producida nuevamente, pero esta síntesis a menudo resulta aberrante y con fibras de elastina desorganizadas. Además, la

producción de elastina al presentarse una lesión favorece la quimiotaxis y proliferación celular en las primeras etapas de la cicatrización.

La expresión de elastina está regulada por factores solubles pro-elastogénicos como el TGF- β 1 y el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) y por factores con actividades antielastogénicas como el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF/FGF-2), factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina (IL)-1 β . La degradación de la elastina es mediada por la MMP-12 secretada por los macrófagos y la elastasa de neutrófilos (18,19). Así mismo, se ha descrito que la elastina favorece la regeneración del tejido mediante la promoción de la angiogénesis (20).

La elastina de neoformación no solo confiere propiedades elásticas a la herida, también influye en las células para regular la contracción de la herida y mejorar la reparación del tejido lesionado (21,22)

1.4 Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).

El TGF- β es sintetizado como una proteína de 390 aminoácidos y los 112 residuos localizados en el extremo C-terminal constituyen la forma madura. En estado inactivo, conocido como TGF- β latente, se encuentra unido al péptido asociado a la latencia (LAP) y cuenta con 5 isoformas (23).

El TGF- β es un factor de crecimiento multifuncional, que pertenece a la superfamilia de polipéptidos extracelulares con características estructurales comunes, las cuales regulan el desarrollo embrionario, la respuesta inmunológica, carcinogénesis, inflamación, regeneración tisular y la cicatrización, en donde al

inicio atrae a los neutrófilos, los macrófagos y los 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 (24-27).

1.4.1 Isoformas del TGF- β .

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, cuyos genes residen en diferentes cromosomas (19q13, 1q14 y 14q24, respectivamente). Estas isoformas contienen 80% de homología en la secuencia de sus aminoácidos. Por otro lado, las isoformas 4 y 5 se han identificado en aves y anfibios (23).

Las tres isoformas de TGF- β son muy diferentes entre sí, pero entre las tres existe un punto en común: el cual es el mecanismo de señalización a través de receptores transmembranales (28). Estos receptores contienen cinasas de serina-treonina, la función de los receptores tipo I y II es la transducción de señales al interior de la célula y la función del receptor tipo III (T β RIII), o β -glicano, es la estabilización de los receptores tipo I y II (23). Cuando el TGF- β se une al receptor tipo II este fosforila al receptor tipo I, desencadenando la cascada de información hacia el núcleo celular a través de sustratos de los receptores conocidos como proteínas Smad (24,26), los cuales interactúan 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 aumento de la producción del mismo (26,28); mientras que la reducción en la señalización del TGF- β se ha asociado a heridas crónicas o que no cicatrizan (24).

Las isoformas TGF- β 1 y TGF- β 2 actúan como profibrogénicos, mientras que el TGF- β 3 funciona como antiinflamatorio y antifibrótico, así mismo estos actúan en todas las etapas de la cicatrización de heridas, especialmente en la fase proliferativa y de remodelación (1,4,5,29-31). El TGF- β es 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 colágena, 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 del SNC, y el TGF- β 3 principalmente en células mesenquimales y son liberados al medio extracelular por las plaquetas (26,32). 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) (1). Cuando existe un incremento no controlado de este factor de crecimiento en la producción y/o activación existe una producción excesiva de tejido conectivo (26).

Dentro del proceso de cicatrización, el TGF- β , 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 MEC (24-27). Las tres isoformas se encuentran presentes en las heridas en proceso de

cicatrización, donde se ha demostrado que difieren en sus niveles de expresión, tiempo de vida media y en su actividad biológica (24).

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 (5), ya que se ha demostrado que los tejidos con cicatrices hipertróficas sobre-expresan el mensajero y la proteína TGF- β 1 en comparación con tejido de 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 aumento 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 (24).

1.5 Cicatrices patológicas en la tráquea.

Aunque el proceso de la cicatrización de las heridas varía entre los diferentes tipos de tejidos, hay más similitudes que diferencias entre ellos. 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 reparar el tejido lesionado (1,33,34).

En la tráquea y los bronquios, cuando se produce una cicatriz fibrótica se produce estenosis traqueal o bronquial y la consecuente obstrucción al flujo de aire (33).

Mientras que cuando se origina una cicatrización traqueal deficiente se produce una malacia o fístula (35).

1.6 Estenosis traqueal.

La estenosis traqueal (ET) se define como la reducción anormal en el calibre de la luz traqueal (36-38) como 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 representa un problema clínico grave que compromete la vida de los pacientes (39).

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 en la vía aérea para tratar la ET (154 dilataciones laríngeas y traqueales, 40 plastías de tráquea y bronquios, y 37 fibrobronoscopias con aplicación de fármacos). Sin embargo, el 30% de los pacientes presentaron re-estenosis.

1.6.1 Tipos de Estenosis traqueal.

La ET se puede clasificar de acuerdo a su etiología, localización y longitud (40), así como por la severidad de la disminución de la luz traqueal (41). Estos sistemas de clasificación son una herramienta importante en el momento de decidir la opción terapéutica adecuada y en algunos casos establecer su pronóstico (40).

1.6.1.1 Clasificación de la ET por su etiología.

De acuerdo a su etiología, las ET se pueden clasificar en congénitas, extrínsecas (producidas principalmente por tumores que presionan la tráquea) y adquiridas. Estas últimas son las más frecuentes y se subdividen 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.) e idiopáticas (42).

La causa más frecuente por la que se presentan las ET es la intubación prolongada. Sin embargo, en todas se produce isquemia, necrosis y ulceración de la mucosa traqueal, pericondritis y condritis con reabsorción cartilaginosa, lo cual predispone a un proceso de cicatrización que conlleva a la remodelación de la MEC, que si se realiza de forma adecuada se presentará una cicatriz normal, pero si esta se altera, se presentará formación de tejido fibroso y disminución de la luz traqueal (7,10,12,43).

1.6.1.2 Clasificación de la ET por localización y longitud.

Esta clasificación consiste en describir el sitio anatómico que ocupa la estenosis en la vía aérea: glótica (estenosis del espacio interaritenoides), subglótica (0.5 cm debajo del borde inferior del cartílago cricoides) y traqueal. Considerando la longitud de la misma. Esta clasificación se divide en cuatro grados, de acuerdo a lo propuesto por McCaffrey (40) y permite predecir la probabilidad de una decanulación exitosa en los pacientes. Esta se divide de la siguiente forma:

Grado I: Es un ET subglótica o traqueal menor a 1 cm.

Grado II: ET subglótica mayor a 1cm.

Grado III: ET subglótica y traqueal sin involucrar la glotis.

Grado IV: ET con extensión a la glotis.

1.6.1.3 Clasificación de la ET por la severidad de la disminución de la luz traqueal.

La clasificación de la ET por la severidad de la disminución de la luz traqueal fue descrita por Freitag (41) y toma como referencia el porcentaje de reducción del tamaño de la luz traqueal. Cabe mencionar que esta también se toma en cuenta la localización de la ET dividiendo la tráquea en tercios. Esta clasificación permite estudiar la efectividad de las modalidades de tratamiento para la estenosis de la vía aérea central.

Grado de ET de acuerdo al tamaño de la luz traqueal:

Grado 0 = Sin estenosis o luz completamente permeable.

Grado 1= Disminución de la luz traqueal menor al 25%.

Grado 2= Disminución de la luz traqueal entre el 25-50%.

Grado 3= Disminución de la luz traqueal entre el 50-75%.

Grado 4= Disminución de la luz traqueal entre el 75-90%.

Grado 5= estenosis del 100%).

De acuerdo a su ubicación:

Ubicación I: Presencia de ET en el tercio traqueal superior.

Ubicación II: Presencia de ET en el tercio traqueal medio.

Ubicación III: Presencia de ET en el tercio traqueal inferior.

Ubicación IV: Presencia de ET en el bronquio principal derecho.

Ubicación V: Presencia de ET en el bronquio principal izquierdo.

1.6.2 Tratamiento de las estenosis traqueales.

Existen diferentes opciones terapéuticas para el manejo de las ET, los cuales se emplearán 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 farmacológicos, endoscópicos y quirúrgicos; sin embargo, el abordaje de las estenosis, además de considerar las variables antes descritas, requiere de la experiencia del cirujano y el endoscopista, para poder determinar la opción terapéutica más adecuada. No obstante, ninguna opción terapéutica ofrece un resultado exitoso, 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 cicatricial fibrótico (44-46).

1.6.2.1 Tratamiento farmacológico.

Para este tipo de tratamientos generalmente se utiliza antibióticos y esteroides, pero se ha observado que no se consigue disminuir la estenosis. Con esta opción terapéutica, los pacientes disminuyen el proceso inflamatorio agudo y el edema; por lo que el manejo farmacológico solo está indicado para la fase aguda de la estenosis o como complemento de los otros métodos terapéuticos (46).

1.6.2.2 Tratamientos endoscópicos.

En pacientes con severas comorbilidades o en pacientes con estenosis grado I, se ha reportado que los procedimientos endoscópicos pueden ser curativos; sin embargo, generalmente se utilizan como puente hacia la cirugía (45,47).

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 (argón plasma) y la colocación de prótesis endoluminales (48).

A) Dilatación endoscópica mecánica con globo.

La dilatación endoscópica realizada con globos, consiste en la insuflación de un globo endoscópico para ejercer una fuerza mecánica radial sobre el sitio lesionado, guiada mediante un endoscopio para tener un mejor control visual del procedimiento y reducir al mínimo el daño mecánico en la mucosa. Este tipo de tratamiento está indicado en ET simples y cortas, que no obstruyen por completo la luz de la vía aérea (45). Esta técnica también es útil para el alivio temporal de sintomatología aguda, así como un paso previo a la colocación de una prótesis o empleo de láser. La complicación más importante de este tratamiento es la ruptura de la vía aérea con riesgo de neumotórax, neumomediastino, mediastinitis y sangrado.

B) Dilatación endoscópica con láser.

La aplicación de láser consiste en realizar cortes sobre el tejido fibrosado y es útil para el tratamiento de lesiones pequeñas y estrechas de longitud cráneo-caudal reducida que tienen el esqueleto cartilaginoso estable. Este método consiste en realizar cortes radiales con el láser sobre el tejido fibrosado a las 3, 9 y 12 horas del campo. Sin embargo, en la literatura se ha descrito que el tratamiento óptimo de las estenosis postintubación se realiza mediante la aplicación de incisiones radiales de láser con la ayuda asociada de dilataciones con balón y se ha observado que proporciona un elevado porcentaje de decanulación con un reducido tiempo operatorio y una estancia hospitalaria corta (45,46,49).

C) Dilatación endoscópica mediante la colocación de férulas.

La dilatación endoscópica mediante la colocación de férulas consiste en la colocación de férulas de diferentes materiales mediante endoscopia para dilatar la zona estenosada. 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 de silicón y de nitinol, los cuales están cubiertos de poliuretano y son auto-expandibles (45, 49).

1.6.2.3 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 (45), 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 una 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 (45,46). 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 farmacológicos, principalmente utilizando fármacos moduladores de la cicatrización (MDC), para tratar de modular la

respuesta inflamatoria del huésped a la lesión, disminuir la producción de citocinas y de los factores de crecimiento proinflamatorios, incrementar los no inflamatorios y regular la producción de colágena en el sitio de la herida para mejorar la cicatrización (44,50), pero hasta la fecha, no existe ningún fármaco que prevenga o reduzca cualquier forma de cicatriz. No obstante, diferentes grupos han estudiado la manipulación farmacológica del TGF- β para la prevención de la formación de cicatrices patológicas (5).

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 tanto en estudios clínicos como experimentales, que su uso predispone a la acumulación de moco y formación 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 re-estenosis (3,44). También se ha utilizado la colágena polivinilpirrolidona (CPVP) con buenos resultados; sin embargo, ya que su aplicación es semanalmente vía intratraqueal por cuatro semanas (38), el uso de esta se dificulta debido a que se tiene que someter al paciente a anestesia general; por lo que hay que buscar nuevos MDC que no requieran de procedimientos invasivos para su aplicación, como la Pirfenidona (PIRFE) que se administra por vía oral y se ha utilizado para el tratamiento de otras enfermedades fibróticas (51).

1.7 Moduladores de la cicatrización.

1.7.1 Colágena 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 manteniendo el 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 (52-54). 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 cuatro aplicaciones intratraqueales por traqueoscopia (38,55-57). Diferentes estudios han reportado buenos resultados con el uso de CPVP subcutánea (SC) en pacientes humanos con artritis reumatoide (58) y con esclerodermia (59), por lo que podría ser una opción en las ET o post-cirugía traqueal.

1.7.2 Pirfenidona (PIRFE).

La Pirfenidona (5-metil-1-fenil-2-[1H]-piridina) (PIRFE) es un fármaco que administrado vía oral (VO) actúa como antifibrótico, antiinflamatorio y antioxidante, ya que inhibe la síntesis de colágeno bloqueando 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 inhibe las fibrosis patológicas. Su uso tanto experimental como clínico ha mostrado

buenos resultados en cicatrices fibróticas de piel (60,61), fibrosis pulmonar (62-64), cirrosis hepática (65) y fibrosis renal (66). En la literatura se ha reportado que en modelos experimentales, 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, fibronectina y elastina 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 regularán la producción de TGF- β 1, fibronectina, elastina y depósitos de colágena en un modelo de ET en ratas con y sin traqueoplastía.

2. JUSTIFICACION.

El INER ICV es un centro de referencia para el tratamiento de la ET, la cual es una patología que, depende de la severidad, puede poner en riesgo la vida de los pacientes al impedir el flujo adecuado de aire hacia los pulmones y se caracteriza por ser una cicatriz fibrótica en la que la MEC sufre cambios en la expresión de proteínas profibróticas, por lo que su tratamiento se hace de forma endoscópica o quirúrgica combinado con el uso de moduladores de la cicatrización para regular la producción de estas proteínas. Se ha reportado clínica y experimentalmente que la aplicación tópica, así como subcutánea (SC) de la CPVP y la PIRFE vía oral (VO) disminuyen la reacción inflamatoria aguda y crónica, así como la fibrosis. Sin embargo, aún no se ha reportado el efecto de estos fármacos sobre la expresión

del TGF- β 1, fibronectina, elastina y depósitos de colágena en la ET y cicatriz postraqueoplastia.

3. HIPÓTESIS.

Ya que la aplicación tópica y subcutánea de CPVP y la administración vía oral de PIRFE disminuyen la inflamación y fibrosis, regulan la expresión del TGF- β 1, fibronectina, elastina y depósitos de colágena, entonces disminuirán la ET, mejorarán la calidad de la cicatriz traqueal postquirúrgica y evitará la formación de re-estenosis en un modelo de ET en ratas con y sin traqueoplastía.

4. OBJETIVO.

Evaluar el efecto de aplicación tópica y SC de CPVP, MC tópica y PIRFE VO sobre la expresión del TGF- β 1, producción de fibronectina, elastina y de colágena macroscópica y microscópica en un modelo de estenosis traqueal en ratas con y sin traqueoplastía.

5. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

a) En ratas con estenosis traqueal y anastomosis termino-terminal postresección de un segmento traqueal cervical estenosado determinar el efecto del tratamiento de CPVP tópica y SC, MC tópica y PIRFE VO sobre los cambios macroscópicos y microscópicos que se producen en la estenosis y en la cicatriz traqueal.

b) Determinar el efecto del tratamiento de CPVP tópica y SC, MC tópica y PIRFE VO sobre la expresión del TGF- β 1 y depósitos de colágena en la estenosis y en la cicatriz traqueal.

c) Determinar el efecto del tratamiento de CPVP tópica y SC, MC tópica y PIRFE VO sobre la producción de fibronectina y elastina en la estenosis y en la cicatriz traqueal.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

Se realizó un estudio experimental y longitudinal.

El financiamiento de este estudio fue otorgado por el INERICV y participaron los investigadores y técnicos del Departamento de Investigación en Cirugía Experimental del INER-ICV, quienes proporcionaron 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 el proyecto planteado. Además, participaron el personal de Bioterio del mismo instituto quienes proporcionaron los animales de esta investigación. También intervino el personal del Departamento de Investigación en Morfología del INERICV, quienes procesaron las muestras de los tejidos obtenidos del estudio.

6.1 Animales de experimentación.

Se utilizaron 50 ratas Wistar (cepa Hsd:WI) clínicamente sanas, sexo indistinto, con rango de edad de 12 semanas y peso de 250-350 gramos, las cuales fueron

manejadas de acuerdo a las especificaciones técnicas para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana y la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of USA (67,68) y aceptado por el SICUAE de la FMVZ, UNAM.

El tamaño de la muestra fue calculado para una población finita con un intervalo de confianza del 95% teniendo como resultado 33 ratas por grupo, ya que las normas oficiales nacionales e internacionales para el uso y manejo de los animales de laboratorio no permiten el uso excesivo de los mismos y recomiendan que las investigaciones realizadas en animales se lleven a cabo bajo la ley de las tres Rs (reemplazo, reducción y refinamiento) (69), la cantidad de sujetos experimentales se redujo al mínimo, para que se alcanzaran diferencias estadísticas.

Criterios de inclusión.

Se incluyeron ratas Wistar clínicamente sanas, sin antecedentes de alguna enfermedad respiratoria durante su estancia en el bioterio del INER-ICV, 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 lo descrito por The Rat Grimace Scale (70) 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 (67).

6.2 Grupos de estudio.

En todos los animales se produjo estenosis traqueal (ET), veinticinco animales se dejaron con la ET y recibieron únicamente tratamiento farmacológico (Tratamiento A) y los otros veinticinco animales recibieron tratamiento quirúrgico (traqueoplastía) más farmacológico (Tratamiento B) según su grupo de estudio:

Grupo I A (n=5): ET tratada con solución salina fisiológica (SSF) vía SC.

Grupo II A (n=5): ET tratada con 2.5 mg/kg de CPVP SC por 4 semanas.

Grupo III A (n=5): ET con aplicación tópica extra-luminal de 1.2 mg/kg MC.

Grupo IV A (n=5): ET tratada con 40 mg/Kg/día VO de PIRFE durante 4 semanas.

Grupo V A (n=5): ET tratada con 2.5/kg de CPVP SC y 40 mg/Kg/día VO de Pirfe durante 4 semanas.

Grupo I B (n=5): Resección de anillos afectados por la ET y anastomosis termino-terminal del segmento reseado (traqueoplastia) con aplicación tópica extraluminal de SSF.

Grupo II B (n=5): Traqueoplastia más aplicación tópica extra-luminal de 2.5 mg de CPVP durante la cirugía.

Grupo III B (n=5): Traqueoplastia más aplicación tópica extra-luminal de 1.2 mg MC.

Grupo IV B (n=5): Traqueoplastia con administración VO de 40 mg/Kg/día de PIRFE durante 4 semanas.

Grupo V B (n=5): Traqueoplastia con aplicación tópica extraluminal de 2.5 mg CPVP y 40 mg/Kg/día VO de Pirfe durante 4 semanas.

6.3 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 (71). Durante la cirugía y la recuperación anestésica, por medio de un monitor de signos vitales (Datascop Passport 5 Lead Monitor®, Mindray Medical International, Shenzhen, China) se monitorizó la frecuencia cardíaca (FC) frecuencia respiratoria (FR) y saturación de oxígeno (SaO₂).

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, que se sumergieron en una solución que contenía Bleomicina a una concentración de 5 µg/ml durante 1

minuto (para provocar irritación de la mucosa traqueal). Transcurrido este tiempo, el segmento reseado fue anastomosado en su sitio original utilizando surgete continuo con material de sutura no absorbible de 7-0 (Seda 7/0, Ethicon, Sao Paulo, Brasil) y se procedió al cierre convencional (72). Posterior al procedimiento quirúrgico para producir la ET, los animales fueron valorados diariamente para observar su estado clínico. Además, se les realizaron tomografías computadas (TC) antes del procedimiento quirúrgico y cada semana hasta el momento en el que se desarrolló la ET.

6.4 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 researon los anillos afectados por la ET, se aplicaron los tratamientos tópicos e inmediatamente se realizó la anastomosis término-terminal del sitio reseado (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 (surgete 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).

Los procedimientos quirúrgicos se realizaron 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 postoperatorio 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.

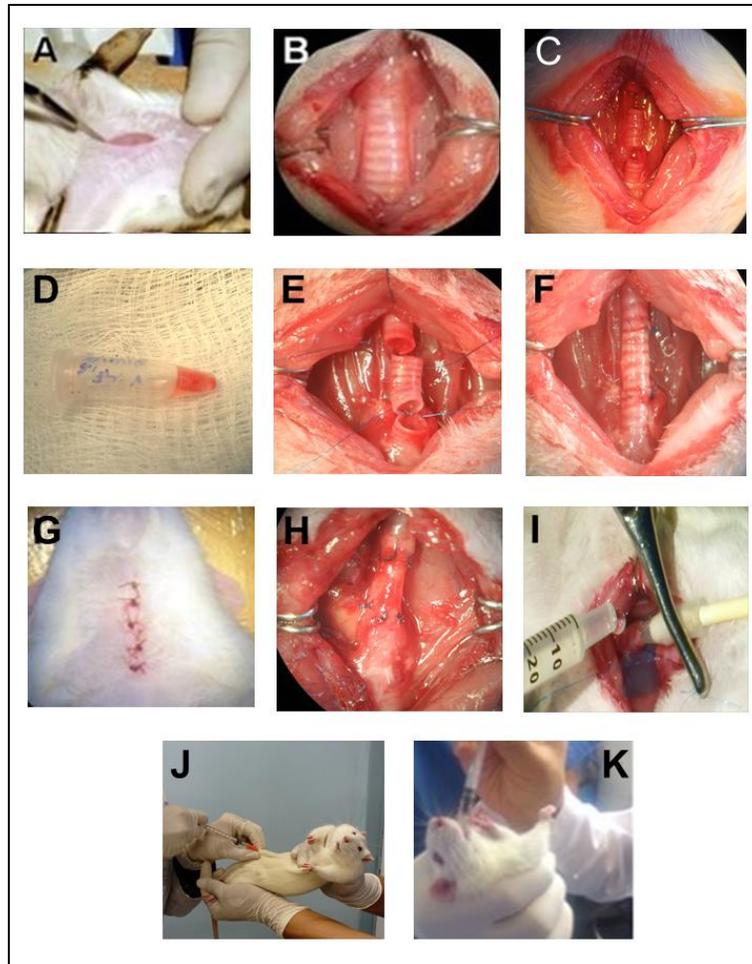


Figura 1. Técnica quirúrgica utilizada para la producción de la ET y la traqueoplastía, así como la aplicación de los tratamientos. A) Incisión cervical media, B) Exposición y disección de la tráquea cervical, C) Sección de anillos traqueales, D) Introducción del segmento a Bleomicina, E) Anastomosis de la porción membranosa, F) Fin de la traqueoplastía, G) Cierre convencional, H) Segmento estenosado, I) Aplicación tópica del tratamiento B sobre los bordes del segmento resecaado, J) Aplicación SC la SSF o CPVP y K) Aplicación de PIRFE VO.

6.5 Tratamiento

En los grupos del tratamiento B (tratamiento quirúrgico más farmacológico), éste 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 resecaar el segmento estenosado, se aplicó tópicamente el fármaco por cinco minutos, al concluir este tiempo la tráquea fue lavada con

SSF (73). En el grupo I se aplicó 0.5 ml de SSF SC cada semana durante 4 semanas y en el grupo II se instilaron 0.5 ml de SSF. En los grupos II A, II B, V A y V B las ratas recibieron 2.5 mg de CPVP tópica y SC (dosis utilizada para los problemas de piel, tendones y experimentalmente en estenosis traqueales crónicas) (Figura 1K) (38), además se les aplicó semanalmente la misma dosis, pero vía SC. Mientras que en los grupos III A y III B se aplicaron 1.2 mg de MC (dosis utilizadas para las estenosis traqueales) (73). Las ratas de los grupos IV A, IV B, V A y V B recibieron cada 24 horas 40 mg/kg de peso de PIRFE vía oral (Figura 1M) (51).

6.6 Evaluación

El estudio tuvo una duración de 46 días totales, en los primeros 28 días se indujo la ET y en los 28 días restantes los animales recibieron el tratamiento según el grupo de estudio. Durante este tiempo se realizó evaluación clínica y tomográfica. Al finalizar el tiempo de estudio se realizaron las evaluaciones macroscópica, morfométrica, microscópica, cuantificación de colágena de neoformación por gramo de tejido, así como el análisis de la expresión de TGF- β 1, fibronectina y elastina mediante inmunohistoquímica.

Evaluación clínica

Se realizó diariamente durante la primera semana post-cirugía y semanalmente el tiempo restante del estudio. 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 facial (70).

Evaluación por Tomografía computada (TC)

Se hicieron 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, así como cada semana hasta que se produjo la ET y cada semana después de haber aplicado los tratamientos.

Evaluación macroscópica de la tráquea

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) (67), se extrajo el segmento anastomosado o el sitio en el que se produjo la ET y se determinó 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, 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. Del tejido obtenido, una porción de la parte membranosa de la tráquea se utilizó para la cuantificación bioquímica de la colágena de neoformación en la cicatriz traqueal y el restante para estudio histológico e inmunohistoquímico para determinar la expresión del TGF- β 1, fibronectina y elastina.

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. (41), 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%.

Evaluación microscópica de la tráquea

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 hicieron cortes seriados de 4µm y se tiñeron con hematoxilina-eosina, así como tinción tricrómica de Massón. La evaluación se realizó en colaboración con un patólogo determinando la presencia de fibrosis, forma y distribución de las fibras de colágena, grado de inflamación. La evaluación de estos parámetros se realizó en toda la circunferencia de la muestra mediante una escala semicuantitativa descrita por Veiga (74), 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 del depósito de colágena de neoformación

La determinación del depósito de colágena de neoformación en la cicatriz traqueal se realizó mediante el ensayo de Sircol (75). Una vez colectadas las muestras fueron pesadas y congeladas a -70°C. Posteriormente se trataron con buffer de lisis (pepsina 0.001g (P7012 Sigma-Aldrich, USA) / 1 ml de ácido acético 0.5 M

(Macron Fine ChemicalsTM, Mex)) y fueron incubadas por 48 horas a 4°C para obtener un lisado del tejido y determinar la concentración de proteínas totales mediante el método de Lowry modificado (76), así como la concentración de colágena de neoformación utilizando el Kit SircolTM (Sircol Kit Pack Standard Assay Kit Product Code: S1000, Biocolor, UK). Las muestras de tejido lisado se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml (Eppendorf Protein Lo Bind 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,). Después, 200 µl de cada muestra fueron colocados en una microplaca Nunc-Immuno Maxi Sorp TM (Sigma-Aldrich, M5785 New Jersey, USA) y se llevó a cabo la lectura del depósito de la colágena de neoformación, 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, fibronectina y elastina mediante Inmunohistoquímica

La determinación de la concentración *in situ* del TGF-β1, fibronectina y elastina 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 5 minutos y posteriormente un minuto hasta Alcohol 96%, después se trataron con buffer de citratos pH 6, el antígeno se recuperó con calor en baño húmedo (Stable Temp®, 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 bloqueó 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 lavó nuevamente. Una vez que se llevaron a cabo los pasos anteriores las secciones de tejido fueron incubadas con anticuerpo policlonal de conejo para TGF-β1 (Abcam ab25121, USA) a una concentración de 5µg/ml, anticuerpo policlonal de conejo para fibronectina (Ab2413, USA) a una concentración de 4µg/ml, anticuerpo policlonal de conejo para elastina (Abcam ab21610, USA) a una concentración de 20µg/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 biotilado 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, se tiñeron con Hematoxilina y para virar el contraste se utilizó una solución saturada de Carbonato de Litio (Fisher Chemical, USA). En los ensayos de todos los grupos se realizaron controles de tejido positivos para cada anticuerpo utilizado y a su vez controles negativos, a los cuales no se les agregó anticuerpo primario.

La cuantificación de la expresión del TGF- β 1, fibronectina y elastina fue realizada empleando el software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), desarrollado por el National Institute of Health (NIH) y el plugin IHC Profiler. Se tomaron imágenes de microscopía en formato digital de diez campos aleatorios por laminilla , 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 la misma intensidad de luz. Una vez que se obtuvieron las imágenes se clasificó a cada imagen en un rango de intensidad del color que se dividió por cuatro zonas dentro de la escala del color de 0-255; alto positivo, positivo, bajo positivo y negativo, asimismo, se determinó el número de pixeles positivos de acuerdo al número de pixeles por zona y el total del número de pixeles por imagen (77) reportando la intensidad del cromógeno en pixeles.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los hallazgos clínicos, macroscópicos y microscópicos se llevó a cabo con la prueba de Kruskal-Wallis, mientras que para los hallazgos

tomográficos bioquímicos e inmunohistoquímicos, se realizaron mediante las pruebas de ANDEVA, Dunnett y Tukey. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

7. RESULTADOS.

7.1 Hallazgos clínicos.

Todos los animales sobrevivieron al procedimiento quirúrgico realizado para producir la ET, así como para resecar el segmento estenosado, pero no al tiempo establecido para finalizar el estudio. En todos los animales, la ET se produjo en la cuarta semana post-quirúrgica, la cual fue confirmada por los estudios clínicos e imagenológicos. La presencia de estridor se observó en el 50% de los casos en la segunda semana post-cirugía y en el 80% de los animales al concluir la tercera semana.

En el grupo I A, los cinco (100%) animales tuvieron que ser sometidos a eutanasia una semana después de haberse diagnosticado la ET y haberse iniciado la aplicación de SSF SC por mostrar disnea severa. En el grupo I B, que combinó la traqueoplastía con la SSF extra-luminal, dos animales presentaron 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.

Los animales tratados con CPVP SC (grupo II A) mostraron estridor similar al que presentaron al hacerse el diagnóstico de la ET; mientras que los animales tratados con traqueoplastía más CPVP (grupo II B), un animal mostró estridor severo al concluir la primera semana post-cirugía y disnea leve al concluir la segunda, el resto de los animales del grupo tuvieron una evolución clínica sin complicaciones.

Del grupo III A (MC tópica) tres ratas (60%), presentaron estridor y disnea severa al final de la primera semana post-aplicación de la MC tópica y fueron sometidas a fin de estudio. Así mismo, en el grupo III B (Traqueoplastía más MC), dos (40%) animales presentaron estridor severo en la segunda semana después de la cirugía y disnea severa en la tercera semana por lo que sometieron a eutanasia, los animales restantes no mostraron este signo.

Los animales tratados con PIRFE sin cirugía (grupo IV A) presentaron estridor similar al que presentaron al hacerse el diagnóstico de la ET y continuó de la misma forma hasta el final del estudio; en cambio, los tratados con traqueoplastía y PIRFE (grupo IV B), presentaron una evolución clínica sin complicación alguna.

En el grupo tratado con CPVP SC + PIRFE VO (grupo V A) tres animales mostraron estridor hasta la segunda semana después de aplicar el tratamiento y dos hasta finalizar el tiempo de estudio; mientras que los tratados con traqueoplastía más CPVP tópica y PIRFE su evolución clínica se presentó sin complicaciones.

Al comparar entre grupos la presencia de estridor, disnea y la sobrevida, observamos que los animales tratados con CPVP, PIRFE y CPVP + PIRFE mostraron menor presencia de estridor y disnea ($p = 0.001$ Kruskal-Wallis) y mayor sobrevida a la observada en los grupos de SSF y MC ($p = 0.001$ Chi cuadrada) (Cuadro 1).

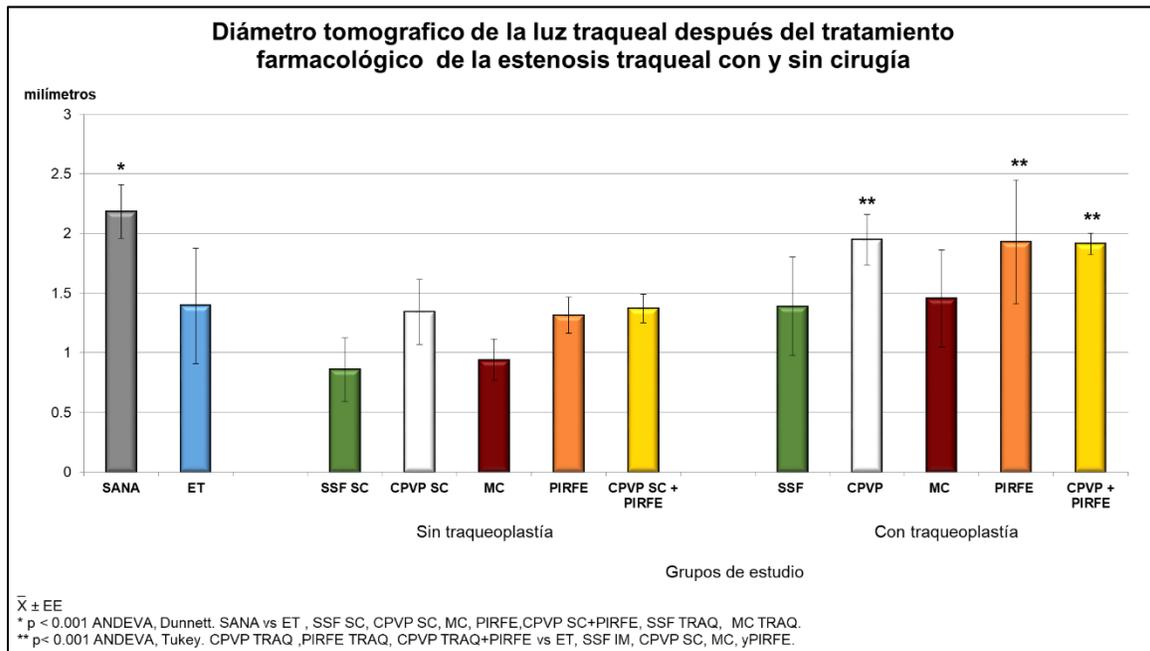
Número de animales con signos clínicos y sobrevida en cada grupo de estudio.			
	Estridor	Disnea	Sobrevida
Tratamiento A			
SSF (n=5)	5	5**	0***
CPVP (n=5)	5	0	5
MC (n=5)	3	3**	2***
PIRFE (n=5)	5	0	5
CPVP+PRIFE (n=5)	2	0	5
Tratamiento B			
SSF (n=5)	2	2	3
CPVP (n=5)	1*	0	5
MC (n=5)	2	2	3
PIRFE (n=5)	0*	0	5
CPVP+PRIFE (n=5)	0*	0	5
* <i>p</i> = 0.001 <i>Kruskal-Wallis</i> ** <i>p</i> = 0.001 <i>Kruskal-Wallis</i> *** <i>p</i> = 0.001 <i>Chi cuadrada</i>			

Cuadro 1. Presencia de estridor y disnea, así como la sobrevida mostrada en cada grupo de estudio.

7.2 Hallazgos tomográficos.

En el tratamiento A se observó una progresión en la disminución de la luz traqueal en los animales de los grupos de SSF ($0.85 \pm 0.26\text{mm}$) y MC ($0.93 \pm 0.17\text{mm}$); mientras que en los tratados con CPVP ($1.34 \pm 0.27\text{mm}$), PIRFE ($1.31 \pm 0.15\text{mm}$) y la mezcla CPVP+PIRFE ($1.37 \pm 0.11\text{mm}$) esta mantuvo valores similares a los del momento de realizar el diagnóstico de ET (Gráfica 1) (Figura 2, 3). En todas las ratas del tratamiento B el tamaño de la luz traqueal incrementó después de

realizar la cirugía en comparación al mostrado en la ET; al final del estudio el incremento solo fue significativo en los grupos de CPVP ($1.94 \pm 0.21\text{mm}$), PIRFE ($1.93 \pm 0.51\text{mm}$) y la combinación de CPVP+PIRFE ($1.91 \pm 0.09\text{mm}$) en comparación con el de la ET y el de todos los grupos después del tratamiento farmacológico ($p < 0.001$ ANDEVA, Tukey) (Gráfica 1) (Figura 4).



Gráfica 1. Diámetro de la luz traqueal después de la producción de la ET, postratamiento farmacológico y con cirugía combinado con el tratamiento farmacológico.

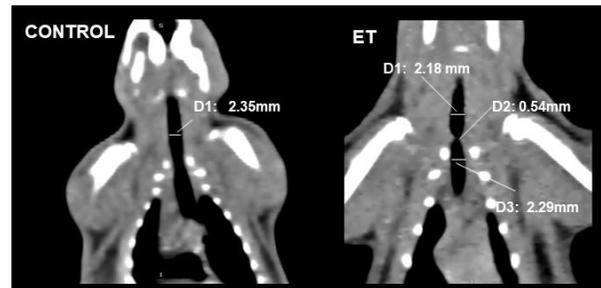


Figura 2. Corte coronal de TC en el que se observa el diámetro de la luz en un animal antes de producir la ET y una vez formada la ET.

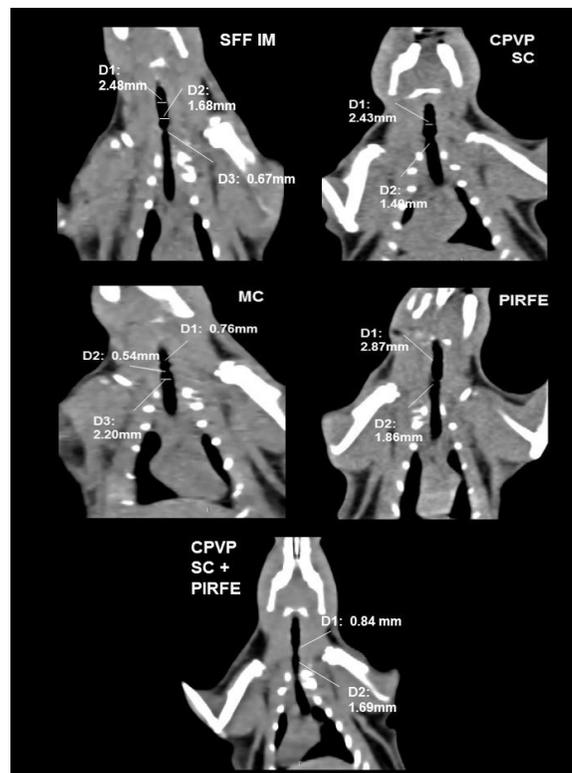


Figura 3. Corte coronal de TC en el que se observa el diámetro de la luz en un animal de cada grupo de estudio después del tratamiento farmacológico.

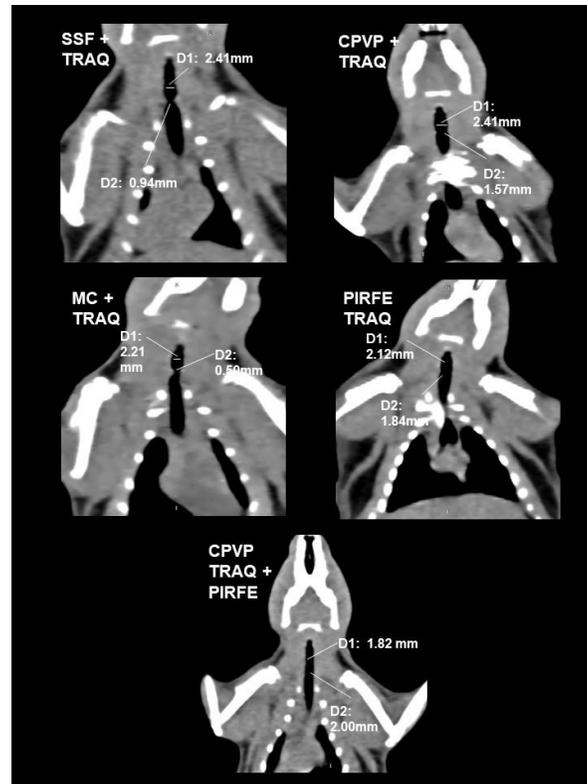


Figura 4. Corte coronal de TC en el que se observa el diámetro de la luz en un animal de cada grupo de estudio después de realizar la traqueoplastia combinada con el tratamiento farmacológico.

7.3 Hallazgos macroscópicos

En ningún caso se observó presencia de dehiscencia, infección o la formación de fístulas, pero sí se produjo ET. Además, en todos los casos en los que se aplicó el tratamiento A, el sitio de la anastomosis se observó inflamado y fibrótico; mientras que después del tratamiento B solo mostraron inflamación y fibrosis los grupos de SSF (I B) y MC (III B) (Figura 5 y 6).

Macroscópicamente el rango de estenosis observado en los 50 animales fue de grado 2 a 3 de acuerdo a la escala de Freitag. Posterior al tratamiento, los animales tratados con SSF SC (I A) y SSF combinado con cirugía (I B) mostraron ET grado 4 y 3 (respectivamente), lo cual fue significativo en comparación con los tratados con CPVP y PIRFE así como con los tratados con CPVP más PIRFE con

y sin traqueoplastía ($p = 0.001$ Kruskal Wallis). Los animales tratados con MC con y sin cirugía mostraron ET entre grado 2 y 3 ($p > 0.05$ Kruskal Wallis) (Cuadro 2) (Figura 6).



Figura 5. Se observa la estenosis traqueal en forma de reloj de arena, a las 4 semanas post aplicación de Bleomicina.

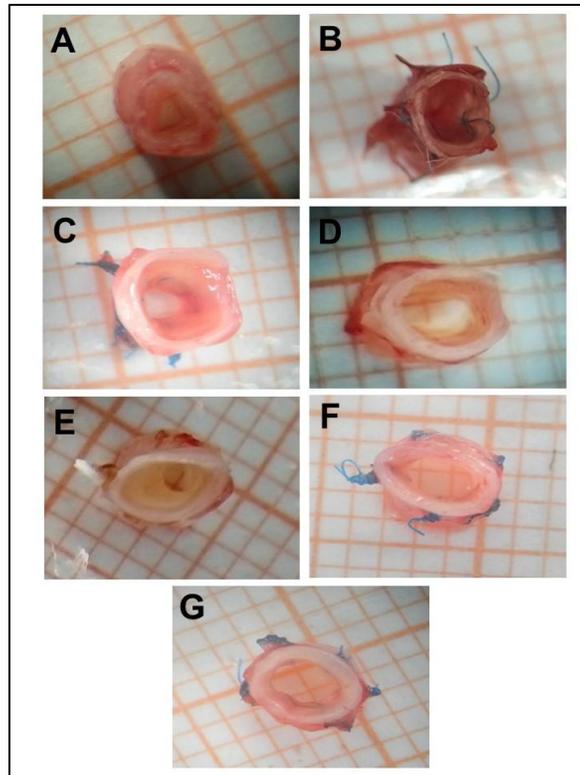


Figura 6. A) Estenosis traqueal sin tratamiento. Estenosis traqueal al final del estudio en los grupos tratados con: B) SSF SC, C) SSF con traqueoplastía, D) CPVP con traqueoplastía, E) MC con traqueoplastía, F) PIRFE con traqueoplastía y E) CPVP más PIRFE con traqueoplastía.

Grado de estenosis en cada grupo de estudio.						
	Grado 0: Sin estenosis	Grado 1: <25%	Grado 2: 25-50%	Grado 3: 50-75%	Grado 4: 75-90%	Grado 5: 100%
ET	0	0	20	30	0	0
Tratamiento A						
SSF	0	0	0	0	5	0
CPVP	0	4	1	0	0	0
MC	0	0	3	2	0	0
PIRFE	0	3	1	1	0	0
CPVP-PRIFE	0	3	2	0	0	0
Tratamiento B						
SSF	0	2	2	1	0	0
CPVP	0	*5	0	0	0	0
MC	0	1	2	2	0	0
PIRFE	0	*5	0	0	0	0
CPVP-PRIFE	0	*5	0	0	0	0
<i>*p= 0.0001 Kruskal-Wallis</i>						

Cuadro 2. Muestra el grado de ET macroscópico observada al final del estudio después del tratamiento con los diferentes moduladores de la cicatrización con y sin cirugía

7.4 Hallazgos microscópicos

Al realizar el diagnóstico de ET, los animales mostraron inflamación severa en comparación con los otros grupos de estudio ($p < 0.001$ Kruskal Wallis) (Figura 7B y 8B). Al finalizar la aplicación del tratamiento, los animales tratados con SSF (con y sin cirugía) presentaron inflamación de moderada a severa (Figura 7C y 8C); mientras que los tratados solo con CPVP (Figura 7D y 8D), PIRFE (Figura 7F y 8F) y la mezcla de CPVP Y PIRFE (Cuadro 3) sin cirugía, presentaron inflamación moderada. El tratamiento quirúrgico combinado con el farmacológico mostró que las ratas tratadas con CPVP desarrollaron inflamación leve ($p < 0.001$ Kruskal Wallis), las tratadas con PIRFE en su mayoría no presentaron inflamación

($p < 0.001$ Kruskal Wallis) al igual que las tratados con CPVP + PIRFE. En los grupos tratados con MC se observó que con y sin cirugía desarrollan inflamación severa ($p < 0.001$ Kruskal Wallis) (Cuadro 3) (Figura 7E y 8E).

Cantidad de animales con cambios en el grado de inflamación en cada grupo de estudio.				
	Grado 1: Ausente (0-10%)	Grado 2: Leve (11-25%)	Grado 3: Moderado (26-50%)	Grado 4: Severo (51-100%)
ET	0	0	1	4
Tratamiento A				
SSF	0	0	2	*3
CPVP	0	2	*3	0
MC	0	0	1	*4
PIRFE	0	2	*3	0
CPVP+PRIFE	0	*3	2	0
Tratamiento B				
SSF	0	1	2	2
CPVP	1	*4	0	0
MC	0	0	2	*3
PIRFE	*4	1	0	0
CPVP+PRIFE	*3	2	0	0
<i>*p= 0.001 Kruskal-Wallis</i>				

Cuadro 3. Grado de inflamación microscópica antes y después de la aplicación de los tratamientos.

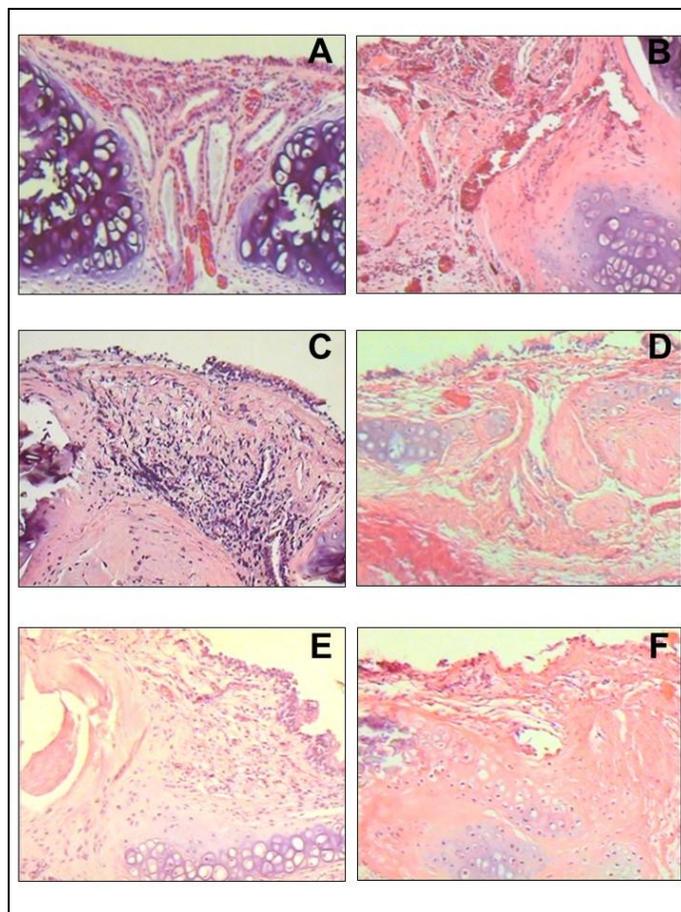


Figura 7. Micrografías que muestran el grado de inflamación en la cicatriz traqueal en los animales que solo recibieron tratamiento farmacológico (Tratamiento A). A tráquea sana B (ET), C (SSF IM) y E (MC) se observa la inflamación severa. D y F inflamación moderada en los animales tratados con CPVP y PIRFE. (H-E 40x).

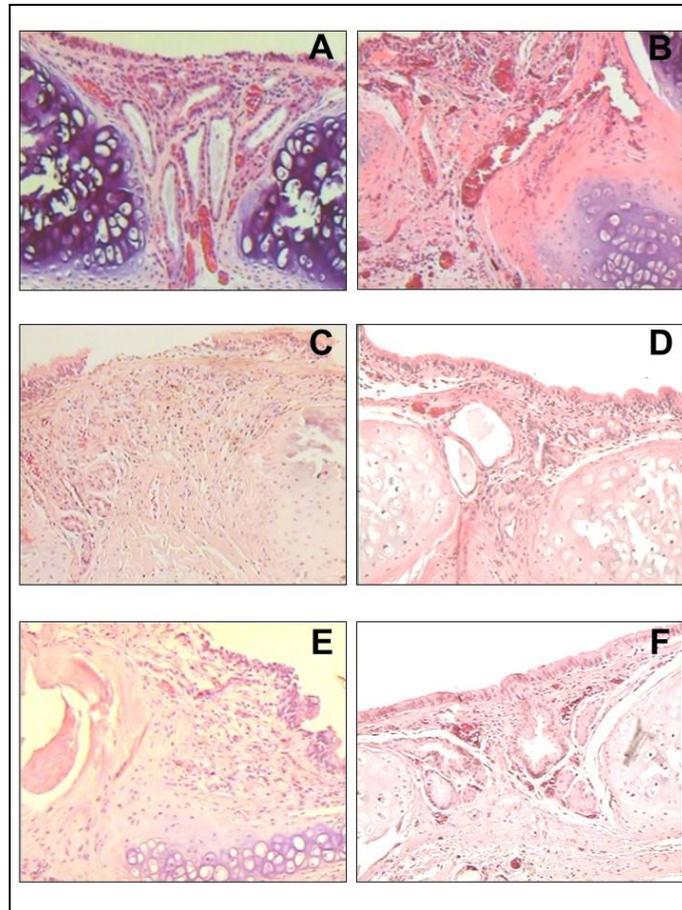


Figura 8. Micrografías que muestran el grado de inflamación en la cicatriz traqueal en los animales que se combinó el tratamiento quirúrgico con el farmacológico (Tratamiento B). A tráquea sana B (ET), C (SSF TRAQ) y E (MC TRAQ) se observa la inflamación severa. D y F inflamación leve en los animales tratados con CPVP TRAQ y PIRFE TRAQ. (H-E 40x).

En las muestras de ET, SSF y MC sin cirugía traqueal se observó fibrosis severa; mientras que en los grupos tratados con CPVP y PIRFE sin cirugía fue de moderada a severa con fibras de colágena gruesas y desorganizadas. Después del procedimiento quirúrgico las ratas tratadas con SSF y MC desarrollaron fibrosis moderada con el mismo tipo de fibras de colágena y leve los tratados con CPVP y PIRFE ($p < 0.001$, 001 Kruskal Wallis) con fibras de colágena delgadas y organizadas (Cuadro 4) (Figura 9 y 10).

Cantidad de animales con cambios en el grado de fibrosis en cada grupo de estudio.				
	Grado 1: Ausente (0-10%)	Grado 2: Leve (11-25%)	Grado 3: Moderado (26-50%)	Grado 4: Severo (51-100%)
ET	0	0	0	5
Tratamiento A				
SSF	0	0	0	*5
CPVP	0	0	1	*4
MC	0	0	0	*5
PIRFE	0	0	2	3
CPVP+PRIFE	0	0	2	3
Tratamiento B				
SSF	0	0	5	0
CPVP	0	5	0	0
MC	0	0	*5	0
PIRFE	0	5	0	0
CPVP+PRIFE	0	5	0	0
<i>*p= 0.001 Kruskal-Wallis</i>				

Cuadro 4. Grado de fibrosis histológica en todos los grupos durante los diferentes tipos de tratamientos.

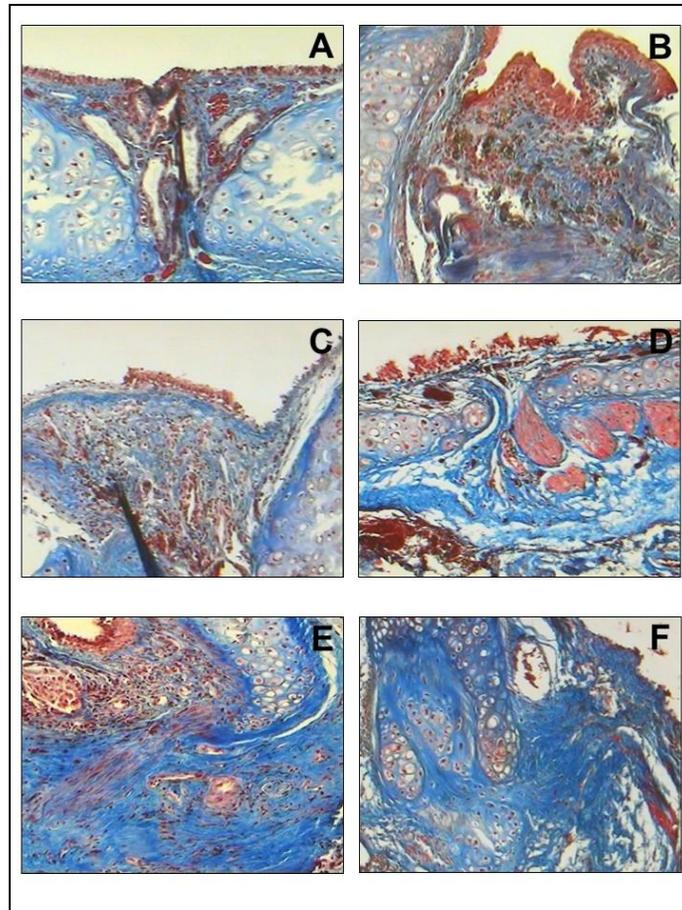


Figura 9. Micrografías que muestran el grado de fibrosis severa durante la ET y después del tratamiento con los diferentes MDC. A) Sana, B) ET, C) SSF IM, D) CPVP SC, E) MC y F) PIRFE. (Masson 40x).

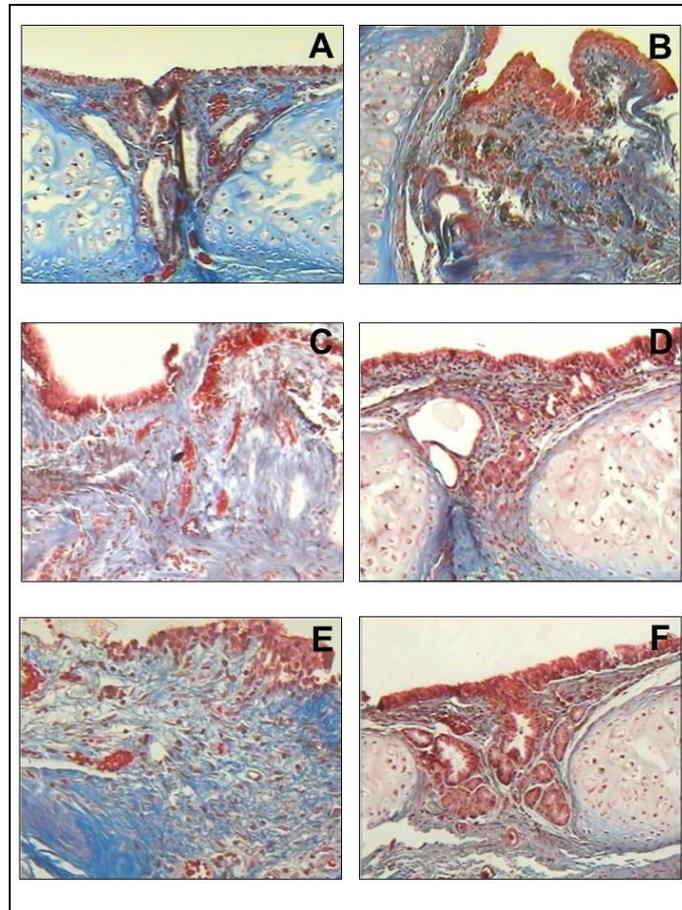
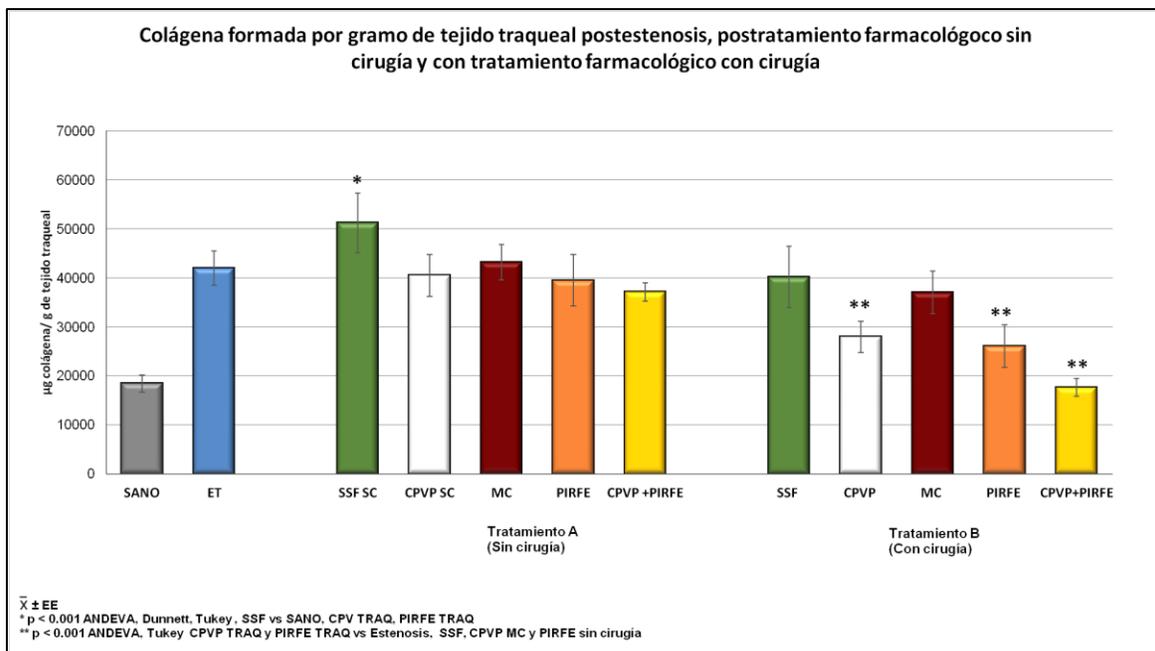


Figura 10. Micrografías que en las que se observa el grado de fibrosis durante la ET y después del tratamiento con los diferentes MDC combinado con la resección y anastomosis termino-terminal del segmento traqueal afectado. A) Sana, B) ET, fibrosis severa, C) SSF y E) MC fibrosis moderada, D) CPVP y F) PIRFE fibrosis leve. (Masson 40x).

7.5 Hallazgos bioquímicos

Al evaluar la cantidad de colágena formada por gramo de tejido traqueal, se observó que durante la estenosis, ésta se incrementó en todos los grupos de estudio de manera importante en comparación con sus anillos controles ($p < 0.001$ ANDEVA, Dunnett). Cuando recibieron el tratamiento farmacológico se observó que en los grupos tratados con SSF se incrementó en comparación con todos los grupos de estudio y con los valores mostrados durante la estenosis, pero este incremento solo fue significativo en comparación con los valores mostrados por los

animales tratados con CPVP y PIRFE ($p < 0.001$ ANDEVA, Tukey). En los animales del grupo de MC, la colágena también se incrementó vs los anillos controles ($p < 0.001$ ANDEVA, Dunnett), pero se mantuvo similar a la mostrada en los anillos con estenosis después del tratamiento sin cirugía y disminuyó después de la cirugía, aunque este incremento no fue significativo ($p > 0.05$ ANDEVA). En los grupos de CPVP y PIRFE se observó que se incrementó en comparación con la colágena observado en los anillos controles ($p < 0.001$ ANDEVA, Dunnett), después del tratamiento con los diferentes MDC sin cirugía ambas se mantuvieron similares a las de la ET. Después del tratamiento quirúrgico combinado con el farmacológico hubo menor depósito de colágena en comparación con los otros grupos de estudio y la ET ($p < 0.001$ ANDEVA, Tukey) (Gráfica 2).

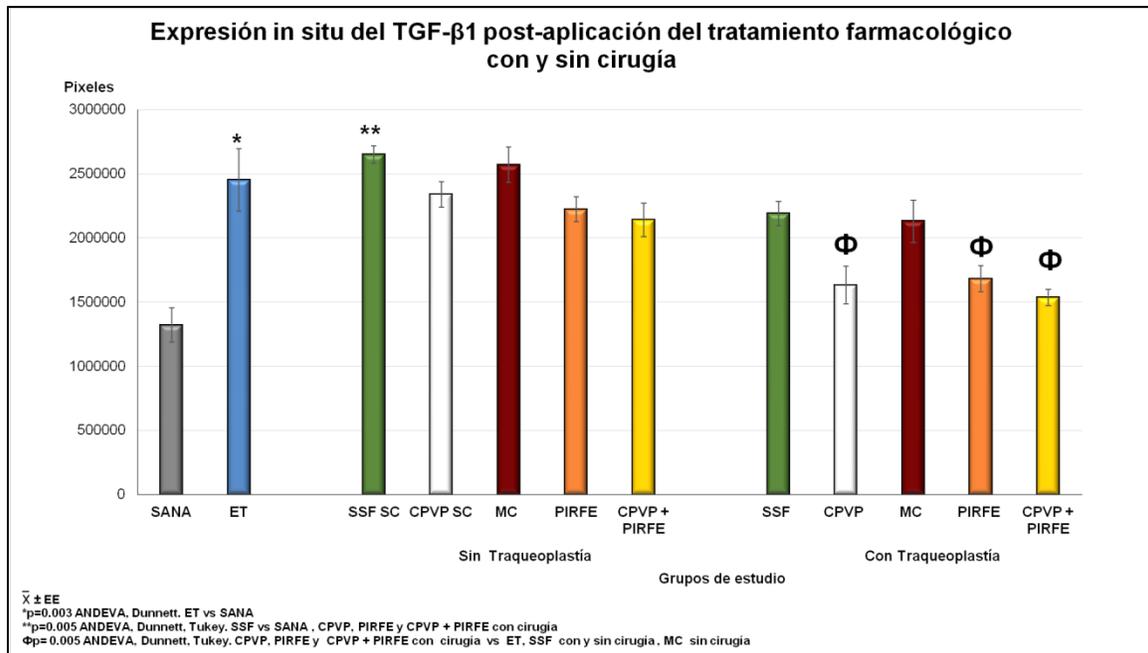


Gráfica 2. Muestra la cantidad de colágena de neoformación formada durante la estenosis y después de la aplicación de los diferentes moduladores de la cicatrización, solos o en combinación con la traqueoplastia.

7.6 Hallazgos Inmunohistoquímicos

Expresión *in situ* del TGF β -1

En todos los grupos de estudio se incrementó la expresión *in situ* del TGF β -1 al producirse la ET ($p < 0.003$ ANDEVA, Dunnett). Después del aplicar el tratamiento farmacológico sin cirugía, en el grupo tratado con SSF se aumentó su producción vs al producido durante la estenosis y después del tratamiento con los diferentes MDC con y sin cirugía, este incremento fue significativo en comparación con el tratamiento de CPVP, PIRFE y CPVP+PIRFE combinado con la cirugía ($p < 0.005$ ANDEVA, Tukey). El grupo de MC después del tratamiento farmacológico sin cirugía presentó valores similares a los mostrados durante la ET y los grupos de CPVP, PIRFE y CPVP+PIRFE sin cirugía ($p > 0.05$ ANDEVA, Tukey), después de la cirugía disminuyó vs la ET y todos los grupos sin cirugía ($p > 0.05$ ANDEVA, Tukey). Los grupos de CPVP, PIRFE y CPVP+PIRFE con traqueoplastía expresaron menos TGF β -1 en comparación con la ET, SSF con y sin cirugía, así como MC sin cirugía ($p = 0.05$ ANDEVA, Tukey) (Grafica 3) (Figura 12y 13).



Gráfica 3. Se observa la expresión *in situ* del TGF β -1 en todos los grupos de estudio, durante la estenosis traqueal y post-tratamiento con los diferentes moduladores de la cicatrización con y combinado con la traqueoplastía.

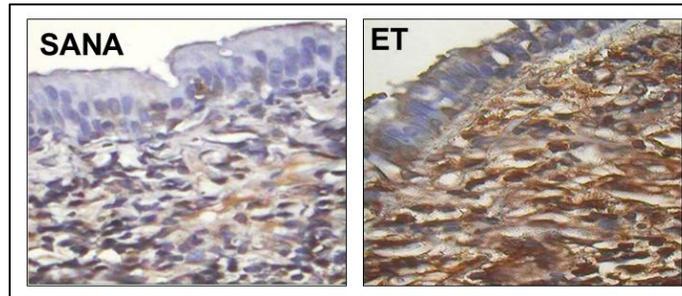


Figura 11. Micrografías de IHQ (40x) de tejido traqueal A) Sana, expresión leve y B) ET, expresión severa.

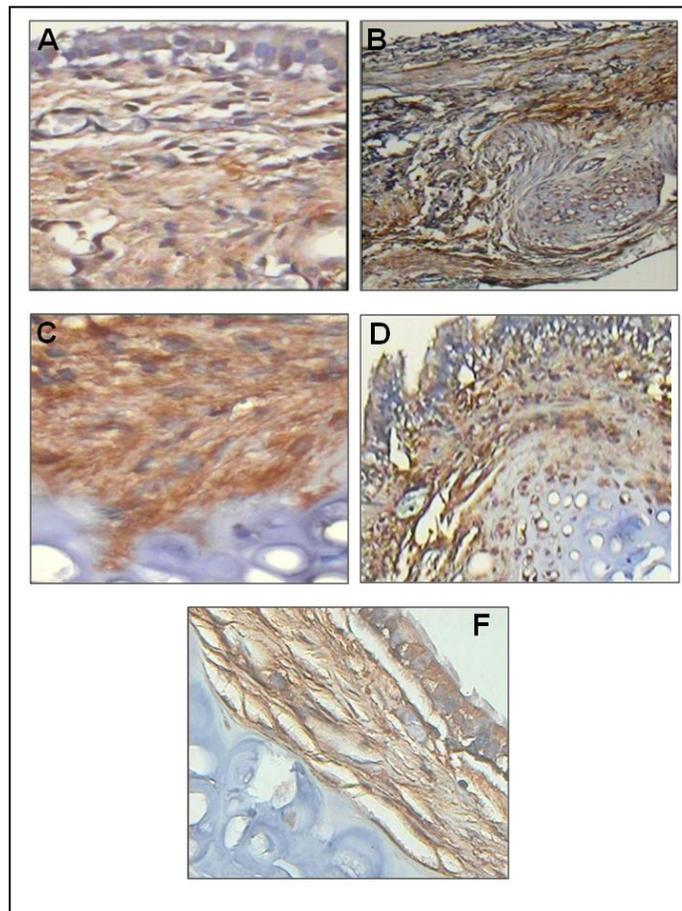


Figura 12. Micrografías de IHQ (40x) de tejido traqueal en un animal de cada grupo en el que solo se aplicó el tratamiento farmacológico después de diagnosticar la ET. Muestra la expresión severa de TGF- β 1 en inmuno-tinción marrón. A) SSF, B) CPVP SC, C) MC, D) PIRFE y F) CPVP + PIRFE.

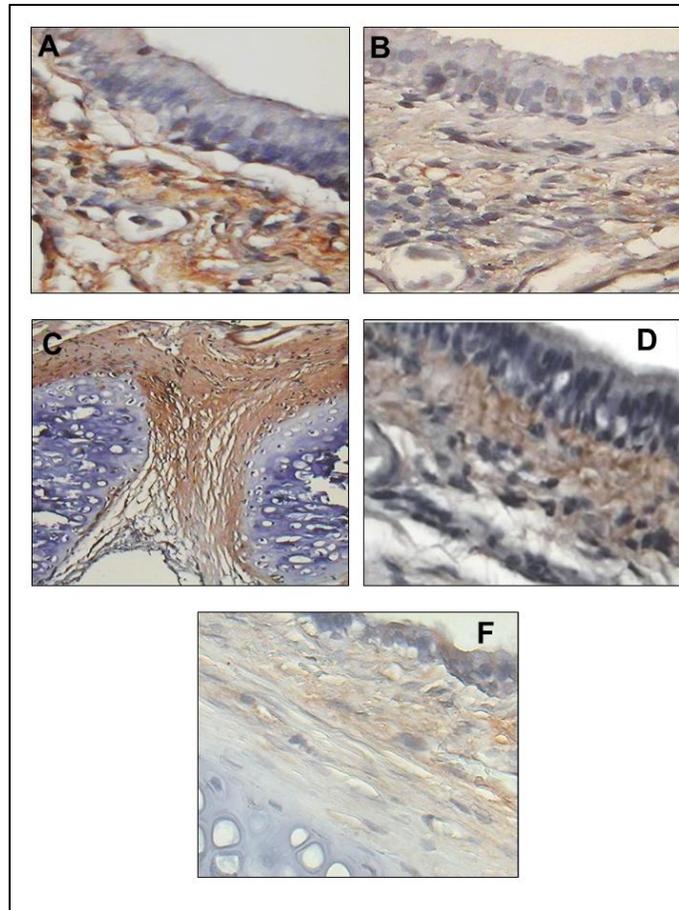


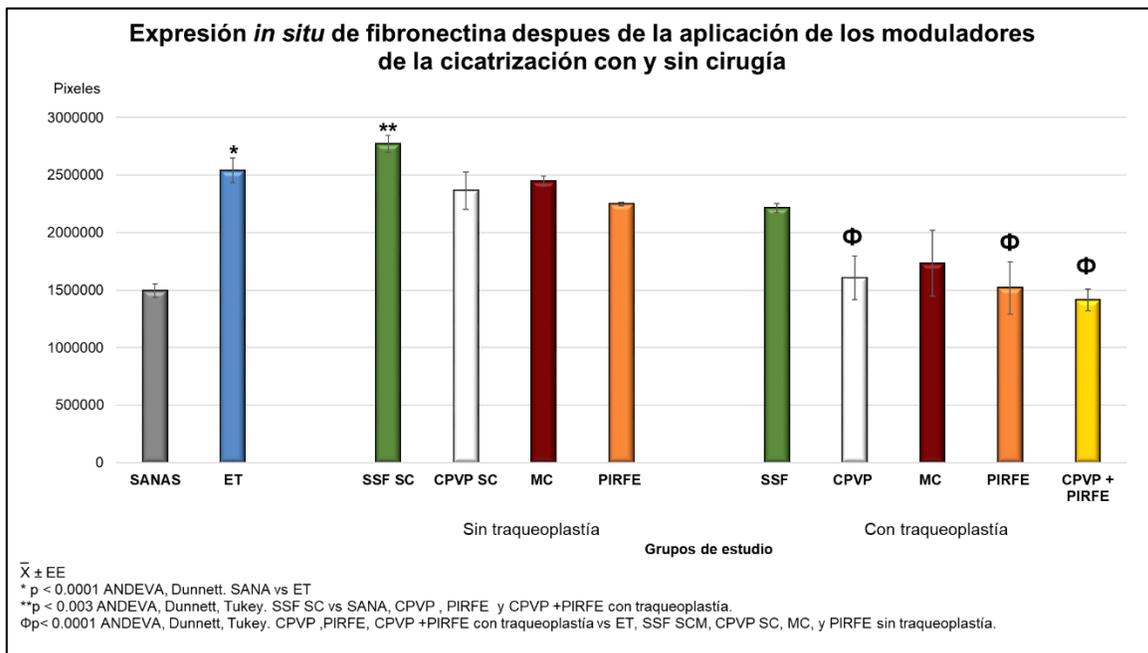
Figura 13. Micrografías de IHQ (40x) de tejido traqueal en un animal de cada grupo, después de realizar la traqueoplastia combinada con el tratamiento farmacológico después de diagnosticar la ET. Muestra la expresión de TGF- β 1 en inmuno-tinción marrón. A) SSF TRAQ, expresión severa, B) CPVP TRAQ, expresión leve, C) MC TRAQ expresión moderada, D) PIRFE TRAQ, expresión leve y F) CPVP + PIRFE TRAQ expresión leve.

Expresión *in situ* de fibronectina

Al evaluar la expresión *in situ* de la fibronectina, se observó un incremento al momento de producir la ET ($p < 0.0001$ ANDEVA, Dunnett). Una vez que se administró únicamente el tratamiento farmacológico, en el grupo de SSF ésta aumentó su producción en comparación con el diagnóstico de la ET y los otros grupos de estudio; sin embargo, este aumento sólo fue significativo en comparación con los grupos tratados con CPVP, PIRFE y la combinación de CPVP más PIRFE con traqueoplastia. ($p < 0.003$ ANDEVA, Tukey). En los grupos

tratados con MC, CPVP SC y PIRFE sin traqueoplastía los niveles expresados de fibronectina fueron similares al de la ET ($p > 0.05$ ANDEVA, Tukey).

En todos los grupos tratados en combinación con la cirugía, la expresión disminuyó en comparación con la ET; pero, estos solo fueron significativos en los grupos tratados con CPVP, PIRFE y CPVP más PIRFE ($p = 0.0001$ ANDEVA, Tukey) (Grafica 4) (Figura 15 y 16).



Gráfica 4. Se observa la expresión *in situ* de fibronectina en todos los grupos de estudio, durante la estenosis traqueal y post-tratamiento con los diferentes moduladores de la cicatrización con y combinado con la traqueoplastía.

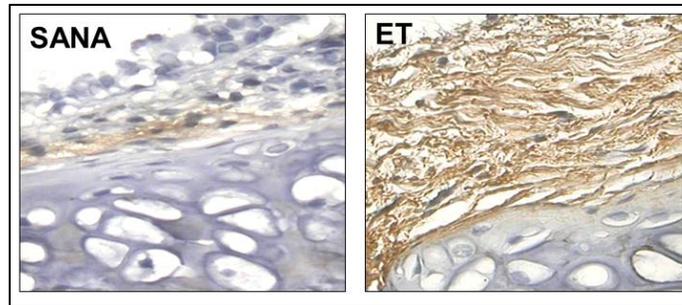


Figura 14. Micrografías de IHQ (40x) de tejido traqueal A) Sana, expresión leve y B) ET, expresión severa.

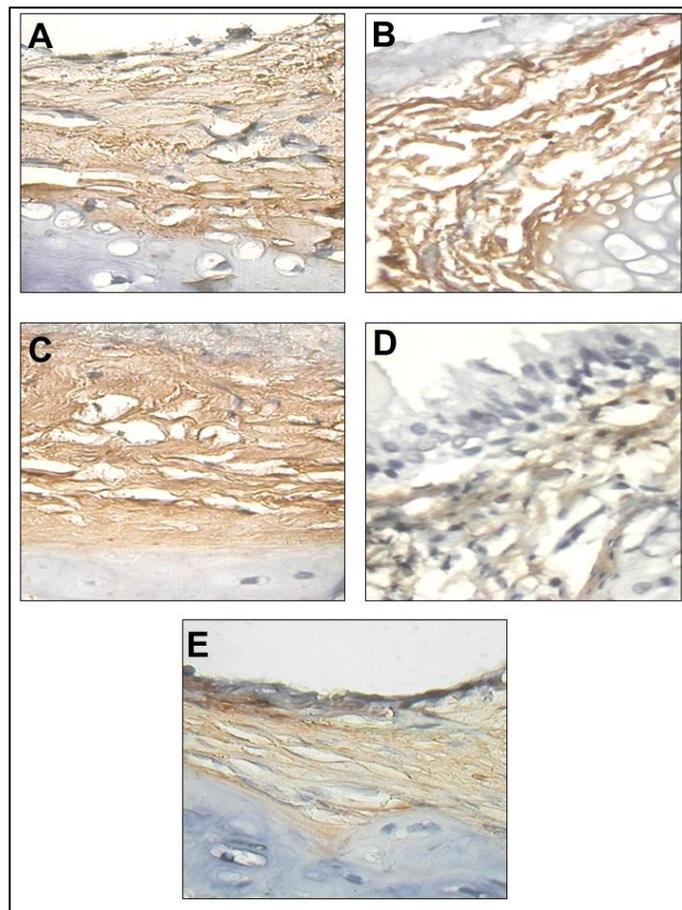


Figura 15. Micrografías de IHQ (40x) de tejido traqueal en un animal de cada grupo en el que solo se aplicó el tratamiento farmacológico después de diagnosticar la ET. Muestra la expresión severa de fibronectina en inmuno-tinción marrón. A) SSF, B) CPVP SC, C) MC, D) PIRFE y E) CPVP SC + PIRFE .

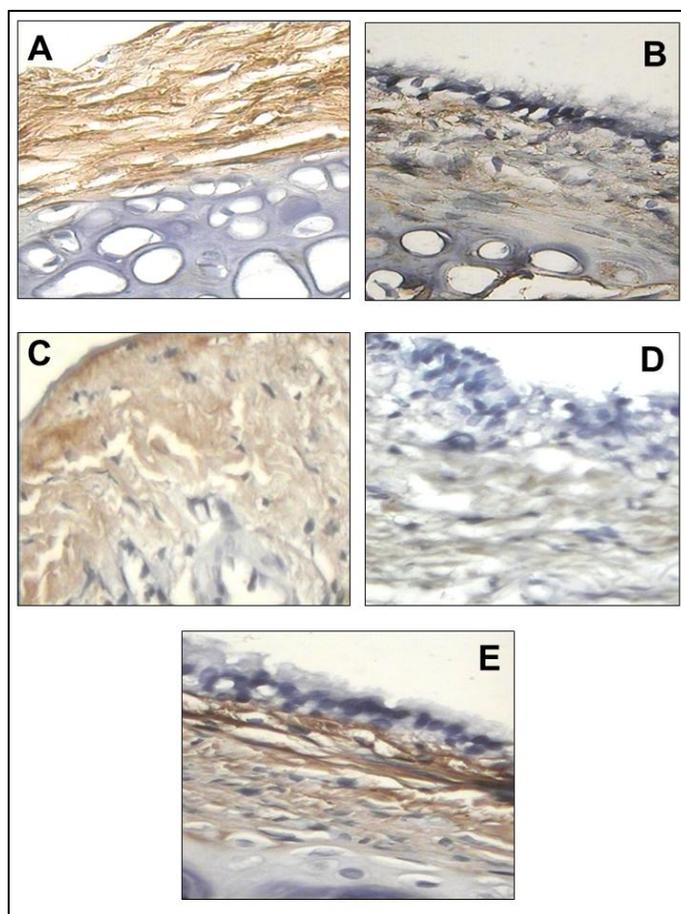
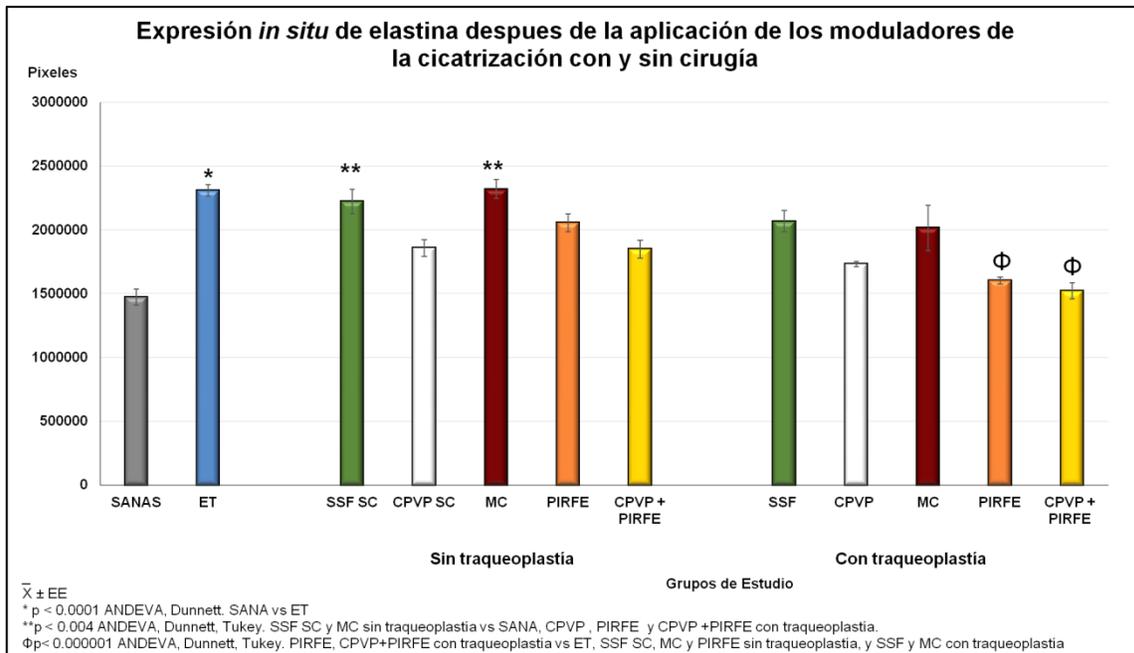


Figura 16. Fotomicrografías de IHQ (40x) de tejido traqueal en un animal de cada grupo, después de realizar la traqueoplastia combinada con el tratamiento farmacológico. Muestra la expresión de fibronectina en inmuno-tinción marrón. A) SSF TRAQ, expresión severa, B) CPVP TRAQ, expresión leve, C) MC TRAQ expresión moderada y expresión moderada en D) PIRFE TRAQ y E) CPVP TRAQ + PIRFE.

Expresión *in situ* de elastina

Los hallazgos inmunohistoquímicos de la expresión *in situ* de elastina mostraron un aumento durante la ET ($p < 0.0001$ ANDEVA, Dunnett) (Figura 17). En el tejido de los animales del tratamiento A se observó que la cantidad de elastina expresada en los grupos tratados con SSF y MC fue similar a la del momento de la ET ($p < 0.004$ ANDEVA, Tukey), mientras que en los grupos tratados con CPVP, PIRFE y CPVP + PIRFE se mostró una disminución sin que esta fuera

estadísticamente significativa. Con el tratamiento B observamos que en todos los grupos hubo una disminución de la expresión en comparación con la ET; sin embargo, esta solo fue significativa en los grupos tratados con PIRFE y PIRFE+CPVP ($p < 0.0001$ ANDEVA, Tukey) (Grafica 5) (Figura 18 y 19).



Gráfica 5. Se observa la expresión *in situ* de elastina en todos los grupos de estudio, durante la estenosis traqueal y post-tratamiento con los diferentes moduladores de la cicatrización sin y con traqueoplastía.

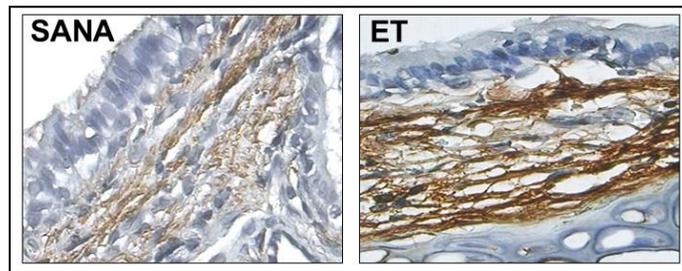


Figura 17. Micrografías de IHQ de elastina (40x) de tejido traqueal A) Sana, expresión leve y B) ET, expresión severa.

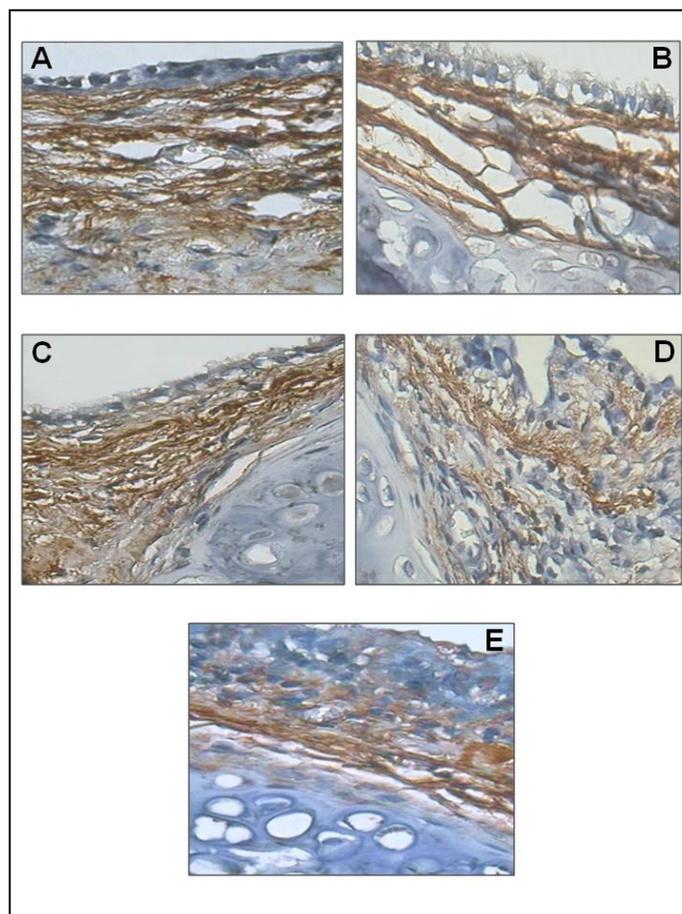


Figura 18. Micrografías de IHQ (40x) de tejido traqueal en un animal de cada grupo en el que solo se aplicó el tratamiento farmacológico después de diagnosticar la ET. Muestra la expresión severa de elastina en inmuno-tinción marrón. A) SSF, B) CPVP SC, C) MC, D) PIRFE y E) CPVP SC + PIRFE .

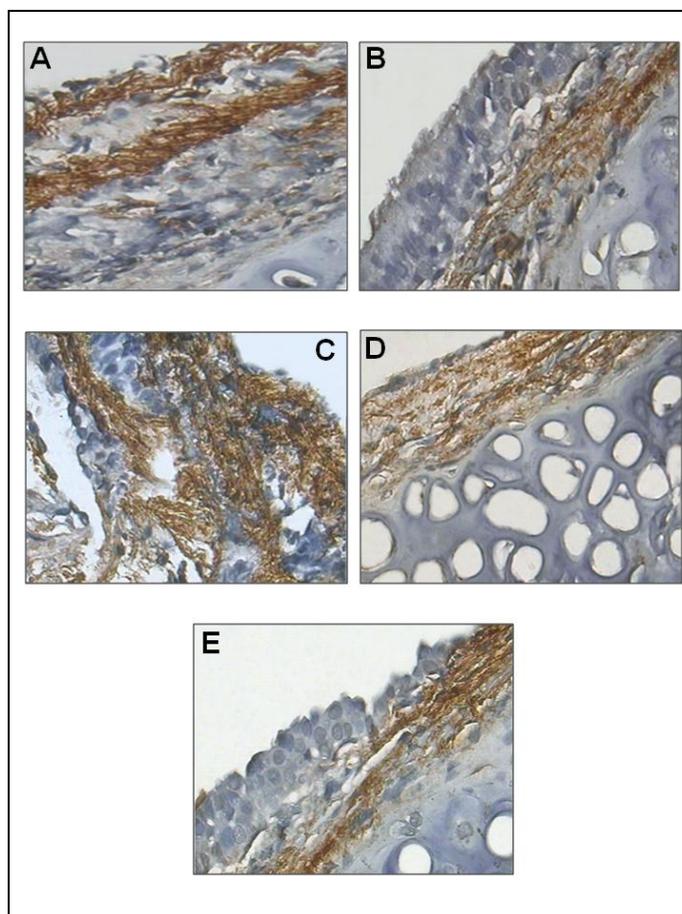


Figura 19. Micrografías de IHQ (40x) de tejido traqueal en un animal de cada grupo, después de realizar la traqueoplastía combinada con el tratamiento farmacológico. Muestra la expresión de elastina en inmuno-tinción marrón. A) SSF TRAQ, expresión severa, B) CPVP TRAQ, expresión leve, C) MC TRAQ expresión moderada y expresión moderada en D) PIRFE TRAQ y E) CPVP TRAQ + PIRFE.

8. DISCUSIÓN.

En la actualidad existen diferentes opciones terapéuticas para el manejo de las ET, los cuales se emplean 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. La resección y anastomosis término terminal del segmento traqueal estenosado, es la mejor opción terapéutica y definitiva en la mayoría de los casos; sin embargo, una de las complicaciones de este tipo de cirugías es la re-estenosis traqueal, la cual es consecuencia de una respuesta inflamatoria intensa, que provoca formación excesiva de tejido de granulación y fibrosis del sitio anastomosado. Por este motivo, en los últimos años se ha intentado emplear 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 (44-46, 78) y otros fármacos moduladores de la cicatrización como la CPVP y la PIRFE para evitarla. La CPVP ha mostrado buenos resultados en modelos de cicatrización traqueal en animales, pero requiere de 4 aplicaciones intratraqueales por traqueoscopia. Por otro lado, la PIRFE clínica y experimentalmente ha funcionado para el tratamiento de fibrosis pulmonar, hepática y cicatrices fibróticas en piel; sin embargo, su uso no se ha probado en un modelo de estenosis traqueal. Por esta razón el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de aplicación tópica y SC de CPVP, MC tópica y PIRFE VO sobre la producción de TGF- β 1, fibronectina,

elastina y de colágena macroscópica y microscópica en un modelo de estenosis traqueal en ratas con y sin traqueoplastía.

Todos los animales de este estudio desarrollaron ET, debido a que se produjo un efecto quimiomecánico, en el que la isquemia producida por la sección de la tráquea, así como la irritación producida por la bleomicina estimularon la producción de infiltrado inflamatorio que promovió los depósitos de colágena, que con el tiempo evolucionó a fibrosis de la cicatriz (79), como lo descrito por Hillel *et al* (72) quienes desarrollaron un modelo experimental de ET en ratones utilizando bleomicina y cepillado de la mucosa traqueal.

Clínicamente, la presencia de estridor observada en todos los grupos de estudio durante la primera y tercera semana después de haber producido la ET y post-traqueoplastía fue porque el procedimiento quirúrgico ocasionó una lesión, la cual estimuló 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 causó la presencia de este signo (1). Mientras que la disnea severa observada en los animales que no concluyeron el tiempo de estudio como en el caso de los grupos I A, I B y III A, fue provocada porque la inflamación prolongada produjo fibrosis en el sitio quirúrgico y la obstrucción al paso de aire (80).

Por otro lado, en el grupo III B, la permanencia del estridor por 2 semanas y disnea severa a la segunda semana fue debida a que la MC no tiene efecto anti-inflamatorio e incluso a los 2 meses de su aplicación, causa irritación del sitio lesionado, acumulación de detritus fibrinoides, tejido de granulación, así como

prevalencia de la inflamación y por lo tanto la acumulación de tejido cicatrizal inmaduro en el sitio de la anastomosis favoreciendo la reducción de la luz del órgano. Estos resultados coinciden con lo observado por otros autores que han estudiado las complicaciones provocadas por la aplicación tópica de MC en las lesiones traqueales (3, 73, 81). Mientras que en los grupos II B, IV B y V B se presentó una mejor evolución clínica debido a que ambos fármacos tienen actividad antiinflamatoria y fibrinolítica (39,52,54). 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 (38) y también coinciden con lo observado por Zhou *et al.* (82), quienes en un modelo murino de trasplante heterotópico traqueal observaron que los animales tratados con PIRFE desarrollaron menor inflamación y fibrosis luminal.

Los hallazgos tomográficos, macroscópicos y morfométricos confirmaron que la isquemia producida por el trauma quirúrgico y la irritación de la blemocina promueven la fibrosis del sitio traqueal lesionado y la ET (72,83). En todos los casos de los animales tratados solo medicamente, la ET no se revirtió, pero en los que fueron tratados con CPVP y PIRFE la ET se mantuvo y no evolucionó probablemente porque ambos medicamentos ejercieron sus efectos antiinflamatorios y evitaron la progresión de la fibrosis como se ha observado en los estudios de piel (52,54) y artritis reumatoide (84). Sin embargo, en este estudio los mejores resultados se presentaron a las cuatro semanas, que a diferencia de otros estudios éstos se observaron a los dos o tres meses (respectivamente. Por otro lado, en los animales tratados quirúrgicamente en combinación con CPVP y PIRFE sus efectos evitaron la re-estenosis. Además, en los grupos de SSF y MC

se observó que la reducción de la luz traqueal fue mayor porque ninguno de los dos medicamentos tiene efectos antiinflamatorios y el proceso de cicatrización siguió su curso normal y la ET evolucionó de manera importante, lo cual concuerda con lo observado por otros autores que han estudiado las complicaciones provocadas por la aplicación tópica de MC en las lesiones traqueales (3, 73,81).

Histologicamente, el daño quirúrgico y la irritación ocasionada por la bleomicina promovieron la producción de diferentes citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento profibróticos que desencadenaron la fibrosis de la lesión traqueal (6,25). Por otro lado, el mayor desarrollo de fibrosis y mala organización de las fibras de colágena en los animales que recibieron el tratamiento farmacológico con SSF y MC sin cirugía, posiblemente fue originado por que no tienen propiedades anti-fibróticas y además la aplicación de la MC, también 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 (85), mucosa mastoidea (86), ojo (87) y tráquea (88). En los grupos tratados con CPVP, PIRFE y la combinación de CPVP más PIRFE sin cirugía, en los que la ET no evolucionó y se mostró similar a la del momento en que se diagnosticó, probablemente fue originado porque ambos fármacos tienen propiedades antifibróticas como lo han observado en estudios experimentales y clínicos de piel en donde la CPVP permite que se recupere la arquitectura del tejido con menor inflamación y fibrosis (89), mientras que los animales tratados con PIRFE mejoraron debido a que las propiedades del fármaco hacen que los procesos fibróticos se detengan y no evolucionen como se ha observado en

estudios de fibrosis de piel (60,61). Así mismo, una fibrosis moderada con una mejor organización de las fibras de colágena fue observada en los grupos II-A, IV-A, y V-A. Esto se atribuye a que, tanto la CPVP como la PIRFE inhibieron a las citosinas proinflamatorias y profibrogénicas, lo cual reduce la fibrosis y promueve la formación de fibras de colágena organizadas como en los tejidos normales (54,89). En lo que se refiere a los depósitos de colágena en el tejido cicatrizal post-estenosis traqueal y post-tratamiento farmacológico en los animales tratados con SSF SC y MC (85-87) fue mayor porque persistió el proceso inflamatorio y la producción de colágena, mientras que en los tratados con CPVP (52, 54) y PIRFE (60,62-66,90) la producción de colágena se detuvo debido a las propiedades fibronolíticas y anti-fibróticas que tienen estos fármacos. Además, en el tratamiento quirúrgico combinado con algún MDC, los animales tratados con SSF y MC mostraron mayor cantidad de colágena que los de CPVP y PIRFE, debido a que estos últimos provocan cambios en el metabolismo celular y reduce la producción de citocinas pro-inflamatorias, así como pro-fibrogénicas (91).

En las ET, que son cicatrices fibróticas, la expresión de TGF- β 1 incrementó como consecuencia de la prolongación y/o exageración de la fase inflamatoria de la cicatrización, en la que el incremento de las citocinas proinflamatorias promueve la expresión de este factor de crecimiento pro-fibrogénico (1,34,36,92,93). Después del tratamiento farmacológico en todos los grupos y el tratamiento combinado en los grupos de SSF y MC, la producción del TGF- β 1 se mantuvo probablemente porque en las cicatrices hipertróficas no solo hay mayor expresión de TGF- β 1, sino que además, tienen una expresión prolongada de los receptores del mismo, en comparación con las cicatrices normales. Esto sugiere que la expresión de este

factor de crecimiento se mantiene por más tiempo en comparación con la cicatrización normal, en las que la expresión de sus receptores disminuye durante la fase de remodelación, como lo describió Penn *et al* (24), en su revisión del papel de la familia del TGF- β en la cicatrización en quemaduras. Por otro lado, la similar expresión de TGF- β 1 observada al momento del diagnóstico de la ET y después del tratamiento farmacológico, así como la menor expresión del mismo en los grupos tratados con CPVP probablemente fue ocasionada porque este fármaco disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias y pro-fibrogénicas (91). Estos hallazgos coinciden con lo descrito por Krötzsch *et al* (54) quienes evaluaron la expresión *in situ* de TGF- β 1 por inmunohistoquímica en biopsias de piel normal, con cicatriz hipertrófica y cicatrices hipertróficas tratadas con inyección intradérmica por 8 semanas de CPVP y encontraron que la expresión de este factor de crecimiento pro-fibrogénico disminuyó en las cicatrices tratadas con CPVP comparadas con las no tratadas. Nuestro estudio coincide parcialmente con lo descrito por ellos, ya que solo se aplicó el tratamiento por 4 semanas de forma SC. Los hallazgos de este trabajo también concuerdan por lo observado por Furuzawa *et al* (59) quienes aplicaron CPVP en piel con cicatrices hipertróficas, así como con esclerodermia y reportaron que la expresión *in situ* de TGF- β 1 y los depósitos de colágena disminuyen con su aplicación. Por otro lado, con el uso de MC no existen estudios en tráquea en los que se haya evaluado la producción del TGF- β 1; pero en un estudio realizado *in vitro* en cultivos de fibroblastos dérmicos humanos se describió que este fármaco inhibe la expresión del mismo y disminuye la expresión de colágena (94). Sin embargo, no coincide con lo observado en este estudio debido a que no inhibió la producción del mismo. En los grupos tratados

con PIRFE se observó menor expresión de TGF- β 1 porque es un fármaco que tiene propiedades anti-oxidantes, anti-inflamatorias y anti-fibróticas que evitan la inflamación prolongada, permiten la regulación de la expresión de citocinas pro-inflamatorias y pro-fibrogénicas, 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 (95,96). Solo existe un estudio realizado en tráquea, en donde en un modelo de cicatrización traqueal en ratas observaron que tanto la CPVP, MC y PIRFE disminuyen la producción de este factor de crecimiento (51). Hasta la fecha no se han realizado estudios en donde se evalúe el efecto del tratamiento combinado de CPVP y PIRFE; sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio posiblemente se debieron a que ambos fármacos tienen propiedades anti-inflamatorias y anti-fibróticas, las cuales, en conjunto, regulan la expresión de este factor durante la ET y después de realizar la cirugía.

Por otro lado, el aumento en la expresión de fibronectina en las ET de todos los grupos de estudio, se debió a que la prolongación de la inflamación durante el proceso de cicatrización predispuso a la sobreproducción de fibroblastos, fibronectina, condroitin sulfato, depósitos de colágena y fibrosis, como lo han descrito varios autores que han estudiado la cicatrización fibrótica de las heridas en diferentes órganos (97-99). Mientras que el incremento en la producción de elastina posiblemente se presentó porque al estar aumentado el TGF- β 1, éste inhibió la síntesis de la MMPs, las cuales son las encargadas de degradar a la colágena y elastina como lo describieron Almine *et al* (21) y Sproul *et al* (22) al estudiar las citocinas que regulan la formación y degradación de la elastina durante el proceso de reparación de heridas. Además de que los fibroblastos de

las cicatrices queloides también producen altos niveles de elastina (100). En los grupos que fueron tratados con SSF con y sin cirugía, se observó mayor expresión de fibronectina y elastina como resultado de un proceso inflamatorio no controlado que se presentó en estos animales. Por otro lado, en los animales que recibieron CPVP SC o tópica durante la traqueoplastia, así como los que recibieron PIRFE y la mezcla de ambos fármacos, la producción de estas fue similar a la observada durante la ET y menor después de la cirugía, posiblemente porque el efecto antiinflamatorio de la CPVP reguló la expresión de citocinas proinflamatorias y fibrogénicas (IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1, PDGF), células T y moléculas de adhesión (ELAM-1, VCAM-1) (53,54), mientras que en los de PIRFE, esta actuó bloqueando factores de crecimiento como el TNF- α y TGF- β (60-66) y en los de la mezcla posiblemente los fármacos hicieron sinergia. Finalmente, en los animales tratados con MC, la expresión de fibronectina y elastina se incrementó durante el tratamiento farmacológico de la ET porque, aunque tiene efecto sobre los fibroblastos, al no tener propiedades antiinflamatorias no evitó la producción de mediadores químicos proinflamatorios y profibrogénicos lo que favoreció el desarrollo de colágena y de estas proteínas como lo han observado otros autores que han evaluado su uso en la cicatrización traqueal experimental (101). Posterior al tratamiento quirúrgico la expresión de ambas proteínas disminuyó porque se retiró el segmento estenosado y se inició un proceso inflamatorio más leve en el que probablemente el efecto antiproliferativo que tiene la MC sobre los fibroblastos a través de la reticulación del ADN, impidió la síntesis de ARN dependiente del DNA y redujo la proliferación fibroblástica (102), así como la expresión de fibronectina y elastina; como lo describió Lee al estudiar los efectos de la MC

sobre las propiedades tensiles de los conductos lacrimales de conejos a los que les realizó una lesión con bisturí y observó en la cicatriz la formación de fibras de colágena desorganizadas y pérdida de las fibras elásticas (103).

9 CONCLUSIÓN.

Con los resultados de este estudio pudimos demostrar que el uso de CPVP, PIRFE y su mezcla detienen la evolución de la ET, disminuyendo la expresión de TGF- β 1, fibronectina, elastina y colágena durante la ET y postraqueoplastía en un modelo de ET en ratas.

REFERENCIAS.

- 1.- Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 2004; 9: 283-289.
- 2.- Salem C, Vidal A, Mariangel P, Concha M. Cicatrices hipertróficas y queloides. *Cuad. Cir.* 2002; 16: 77-86.
- 3.- 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. Universidad Nacional Autónoma de México. 2016.
- 4.- Elicora A, Liman ST, Yegin BA, Akgül AG, Eroglu H, Yildiz K, et al. Effect of locally applied transforming growth factor beta 3 on wound healing and stenosis development in tracheal surgery. *Respir Care.* 2014; 59: 1281-1286. doi: 10.4187/respcare.02357
- 5.- 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. doi: 10.1098/rstb.2004.1475.
- 6.- Rahban SR, Garner WL. Fibroproliferative scars. *Clin Plast Surg.* 2003; 30: 77-89.
- 7.- Pardo Semo A, Selman Lama M. Matriz Extracelular. En Jiménez García LF, Merchant Larios H editores. *Biología celular y molecular.* México: Pearson Educación; 2003. p 515-541.
- 8.- Naranjo TA, Noguera-Salva R, Fariñas-Guerrero F. Extracellular matrix: morphology, function and biotensegrity (part 1). *Rev Esp Patol* 2009; 42: 249-261.
- 9.- Sottile J, Shi F, Rublyevska I, Chiang HY, Lust J, Chandler J. Fibronectin-dependent collagen I deposition modulates the cell response to fibronectin. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 293: C1934-1946. doi: 10.1152/ajpcell.00130.2007.
- 10.- Maquart FX, Monboisse JC. Extracellular matrix and wound healing. *Pathol Biol.* 2014; 62: 91-95. doi: 10.1016/j.patbio.2014.02.007.
- 11.- Halper J, Kjaer M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 802: 31-47. doi: 10.1007/978-94-007-7893-1_3.
- 12.- Hansen NU, Genovese F, Leeming DJ, Karsdal MA. The importance of extracellular matrix for cell function and in vivo likeness. *Exp Mol Pathol.* 2015; 98: 286-294. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.01.006.

13.- Nyström, A. Collagens in wound healing. In Agren MS editor. Wound Healing Biomaterials. Denmark: Woodhead Publishing. 2016; p 171-201.

14.- Lucena S, Arocha Piñango CL, Guerrero B. Fibronectin. Structure and functions associated to hemostasis. Review. Invest Clin. 2007; 48: 249-262.

15.- Xu J, Mosher D. Fibronectin and Other Adhesive Glycoproteins. In: Mecham R editors. The Extracellular Matrix: an Overview. Biology of Extracellular Matrix. Berlin, Heidelberg. Springer. 2011. p 41-75.

16.- Lenselink EA. Role of fibronectin in normal wound healing. Int Wound J. 2015; 12: 313-316. doi: 10.1111/iwj.12109.

17.- Iwasaki A, Sakai K, Moriya K, Sasaki T, Keene DR, Akhtar R, et al. Molecular Mechanism Responsible for Fibronectin-controlled Alterations in Matrix Stiffness in Advanced Chronic Liver Fibrogenesis. J Biol Chem. 2016; 291:72-88. doi: 10.1074/jbc.M115.691519.

18.- Reddel CJ, Weiss AS, Burgess JK. Elastin in asthma. Pulm Pharmacol Ther. 2012; 25: 144-153. doi: 10.1016/j.pupt.2012.02.001.

19.- Pellicoro A, Aucott RL, Ramachandran P, Robson AJ, Fallowfield JA, Snowdon VK, et al. Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis. Hepatology. 2012; 55: 1965-1975. doi: 10.1002/hep.25567.

20.- Minardi S, Taraballi F, Wang X, Cabrera FJ, Van Eps JL, Robbins AB, et al. Biomimetic collagen/elastin meshes for ventral hernia repair in a rat model. Acta Biomater. 2017; 50: 165-177. doi: 10.1016/j.actbio.2016.11.032.

21.- Almine JF, Wise SG, Weiss AS. Elastin signaling in wound repair. Birth Defects Res C Embryo Today. 2012; 96: 248-257. doi: 10.1002/bdrc.21016.

22.- Sproul EP, Argraves WS. A cytokine axis regulates elastin formation and degradation. Matrix Biol. 2013; 32: 86-94. doi: 10.1016/j.matbio.2012.11.004.

23.- Senties-Gómez MD, Gálvez-Gastélum FJ, Meza-García E, Armendáriz-Borunda J. Fibrosis Hepática. El papel de las metaloproteinasas y de TGF- β . Gac Méd Méx 2005; 141: 315-322.

24.- 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.

25.- 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. doi: 10.1111/wrr.12098.

- 26.- 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.
- 27.- 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.
- 28.- Prieto M, Rivas JV, López-Novoa JM, Pérez-Barriocanal F. El TGF- β : síntesis y mecanismo de acción. Nefrología. 2002; 22: 135-143.
- 29.- Hernández CA, Toro AM. Enfoque y manejo de las cicatrices hipertróficas y queloides. Rev Asoc Colomb Dermatol. 2011; 19: 218-228.
- 30.- Rolfe KJ, Grobbelaar AO. A review of fetal scarless healing. ISRN Dermatol. 2012;2012:698034. doi: 10.5402/2012/698034.
- 31.- Zheng Z, Nguyen C, Zhang X, Khorasani H, Wang JZ, Zara JN, et al. Delayed wound closure in fibromodulin-deficient mice is associated with increased TGF- β 3 signaling. J Invest Dermatol. 2011; 131: 769-778. doi: 10.1038/jid.2010.381.
- 32.- Cordeiro MF. Beyond mitomycin: TGF- β and wound healing. Prog Retin Eye Res. 2002; 21:75-89.
- 33.- 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. doi: 10.1016/j.ijporl.2005.03.028.
- 34.- Hirshoren N, Eliashar R. Wound-healing modulation in upper airway stenosis-myths and facts. Head Neck; 2009; 31:111-126. doi: 10.1002/hed.20925.
- 35.- Liberman M, Cassivi SD. Bronchial Stump Dehiscence: Update on Prevention and Management. Semin Thorac Cardiovasc Surg. 2007; 19: 366-373. doi: 10.1053/j.semtcvs.2007.11.002.
- 36.- Grillo HC. Development of tracheal surgery: A historical review. Part 2: Treatment of tracheal diseases. Ann Thorac Surg. 2003; 75: 1039-1047.
- 37.- Iñiguez MA. Tipificación de la colágena producida en la cicatrización traqueal postraqueoplastia después de la aplicación de diferentes moduladores de la cicatrización en la anastomosis traqueal. Estudio experimental. Tesis de Especialidad en Cirugía Cardiotorácica. Universidad Nacional Autónoma de México. 2011.
- 38.- Olmos-Zuñiga JR, Hernández-Jimenez C, Díaz-Martinez E, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, Gaxiola-Gaxiola M. Wound healing modulators in a tracheoplasty

canine model. *J Invest Surg.* 2007; 20: 333-338. doi: 10.1080/08941930701772140.

39.- 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. Universidad Nacional Autónoma de México. 2013.

40.- McCaffrey TV. Management of laryngotracheal stenosis on the basis of site and severity. *Otolaringol Head Neck Surg,* 1993; 109: 468-473. doi: 10.1177/019459989310900313.

41.- 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. doi: 10.1183/09031936.00132804.

42.- Sarper A, Ayten A, Eser I. Tracheal stenosis after tracheostomy or intubation: review with special regard to cause and management. *Tex Heart Inst J.* 2005; 32: 154-158.

43.- Weymuller EA. Laryngeal injury from prolonged endotracheal intubation. *Laryngoscope* 1988; 98 Suppl 45, Part 2: 1-15.

44.- Cortés de Miguel S, Cabeza Barrera J, Gallardo Medina M, Cassini Gómez de Cádiz LF, Salmerón-García A, et al. Mitomicina C tópica endotraqueal como terapia complementaria al tratamiento endoscópico de la estenosis laringotraqueal fibrótico-cicatricial recurrente. *Farm Hosp.* 2011; 35: 32-35. doi: 10.1016/j.farma.2010.04.002.

45.- Barros Casas D, Fernández-Bussy S, Folch E, Flandes Aldeyturriaga J, Majid A. Non-Malignant Central Airway Obstruction. *Arch Bronconeumol.* 2014; 50: 345-354. doi: 10.1016/j.arbr.2014.06.002

46.- 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 de Especialista en Cirugía General. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. 2015.

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

48.- 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. doi: 10.1186/1749-8090-8-35

- 49.- 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.
- 50.- 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. doi:10.1016/j.otohns.2004.03.001
- 51.- Olmos-Zuñiga JR, Silva-Martínez M, Jasso-Victoria R, Baltazares-Lipp M, Hernández-Jiménez C, Buendía-Roldan I, et al. 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. *BioMedResearch Int*. Volume 2017 (2017), Article ID 6471071, 10 pages <https://doi.org/10.1155/2017/6471071>.
- 52.- Rodríguez R, Furuzawa J, Corchado A, Kröttsch F. Collagen-polyvinylpyrrolidone promotes human wound healing through cytokine down modulation. *Wound Rep Reg*. 2001; 9: 166.
- 53.- 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.
- 54.- Kröttsch E, Díaz de León E, Furuzawa GJ, Marquez R, Quiroz E, Citokine expresión is down regulated by collagen-polivinilpirrolidone in hyperthrophic scars. *J Invest Dermatol*. 1998; 111: 828-834. doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00329.x.
- 55.- Loyola U. Respuesta Terapéutica A La Colágeno-Polivinil Pirrolidona En Un Modelo Experimental De Estenosis Traqueal Canino. Tesis Especialidad de Cirugía Torácica. Universidad Nacional Autónoma de México. 2001.
- 56.- Santillán A. Efecto de diferentes moduladores cicatrizales en la traqueoplastía. Tesis Especialidad de Otorrinolaringología, Cirugía de Cabeza y Cuello. Universidad Nacional Autónoma de México. 2006.
- 57.- 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.
- 58.- 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. doi: 10.1111/j.1365-2230.2004.01691.x
- 59.- 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. doi: 10.1111/j.1365-2230.2004.01691.x.

60.- 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.

61.-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. doi: 10.1016/S0022-2143(98)90127-5.

62.- Selman M, Navarro MC, Gaxiola M. Fibrosis pulmonar idiopática: en busca de un tratamiento eficaz. Arch Bronconeumol. 2005;41:15-20. doi: 10.1016/S0300-2896(05)70763-8.

63.- Oku H, Shimizu T, Kawabata T, Nagira M, Hikita I, Ueyama A, et al. 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. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.06.046.

64.- Nakayama S, Mukae H, Sakamoto N, Kakugawa T, Yoshioka S, Soda H, et al. Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF- β 1-stimulated human lung fibroblasts. Life Sci. 2008; 82: 210-217. doi: 10.1016/j.lfs.2007.11.003.

65.- García L, Hernández I, Sandoval A, Salazar, García J, Vera J, et al. Pirfenidone affectively reverses experimental liver fibrosis. J Hepatol. 2002; 32: 797-805.

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

67.- 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.

68.- 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.

69.- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. PLoSBiol. 2010; 8: e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412.

70.- 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. doi: 10.1186/1744-8069-7-55.

71.- 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.

72.- Hillel AT, Namba D, Ding D, Pandian V, Elisseeff JH, Horton MR. An in situ, in vivo murine model for the study of laryngotracheal stenosis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014; 140: 961-6. doi: 10.1001/jamaoto.2014.1663.

73.- Rahbar R, Shapshay SM, Healy GB. Mitomycin: Effects on laryngeal and tracheal stenosis, benefits and complications. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001; 110:1-6. doi: 10.1177/000348940111000101.

74.- Veiga A, Rendal M, Matheu G, Andi3n C. S3nchez J, Segura R. Cambios histopatol3gicos en arterias humanas sometidas a procesos de isquemia fr3a y criopreservaci3n. *Angiolog3a*. 2004; 56: 97-105. doi.org/10.1016/S0003-3170(04)74854-3.

75.- Mungu3a A. Tesis: Comparaci3n de dos m3todos para la determinaci3n del contenido de col3gena en pulm3n de rat3n. Tesis de Maestr3a en Ciencias. Universidad Nacional Aut3noma de M3xico. 2007.

76.- Garza M. Tesis: Evaluaci3n de una t3cnica de aglutinaci3n simple para la detecci3n de entamoeba histolytica schaudinn, 1903 (protozoarendamoebidae). Tesis Maestr3a en Ciencias. Universidad Aut3noma de Nuevo Le3n. 1996.

77.- 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. *PlosOne*. 2014; 9: 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0096801.e96801.

78.- Anton-Pacheco J, Usategui A, Mart3nez I, Garc3a-Herrero CM, Gamez AP, Grau M et al. TGF- β Antagonist Attenuates Fibrosis But Not Luminal Narrowing in Experimental Tracheal Stenosis. *Laryngoscope*, 2017; 127: 561-567. doi: 10.1002/lary.26402.

79.- Roh JL, Lee YW, Park HT. Subglottic wound healing in a new rabbit model of acquired subglottic stenosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006; 115: 611-616. doi.org/10.1177/000348940611500807.

80.- 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. doi: 10.1016/j.otohns.2006.09.012.

81.- Roh JL, Koo BS, Yoon YH, Rha KS, Park CI. Effect of topical mitomycin C on the healing of surgical and laser wounds: a hint on clinical application. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 133:851-856x|. doi:10.1016/j.otohns.2005.09.004.

82.- 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. doi: 10.1016/j.healun.2004.11.002.

83.- Charous SJ, Ossoff RH, Reinisch L, Davidson JM. Canine subglottic stenosis as a model for excessive fibrosis: a pilot histologic and immunohistochemical analysis. *Wound Repair Regen.* 1996; 4:444-453. doi.org/10.1046/j.1524-475X.1996.40408.x.

84.- Furuzawa-Carballeda J, Lima G, Llorente L, Nuñez-Alvarez C, Ruiz-Ordaz BH, Echevarría-Zuno S, et al. 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.

85.- NaderPour M, Moghaddam YJ, Peirovifar A, Mollajavadi R, Abbasi 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. doi: 10.1016/j.ijporl.2011.04.013.

86.- Ozturk L, Kaygusuz I, Akpolat N, Keles E, Karlidag T, Alpay HC, et al. Histopathologic changes in guinea pig mastoid mucosa after topical mitomycin C application followed by mastoidectomy. *Am J Otolaryngol.* 2008; 29: 300-304. doi: 10.1016/j.amjoto.2007.09.005.

87.- 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. doi: 10.1167/iovs.10-6240.

88.- Eliashar R, Eliachar I, Esclamado R, Gramlich T, Strome M. Can topical mitomycin prevent laryngotracheal stenosis?. *Laryngoscope.* 1999; 109:1594-1600. doi: 10.1097/00005537-199910000-00009.

89.- 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. doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00250.x

90.- Armendariz-Borunda J, Islas-Carbajal MC, Meza-Garcia E, Rincon AR, Lucano S, Sandoval AS, Garcia L. A pilot study in patients with established advanced liver fibrosis using pirfenidone. *Gut.* 2006; 55: 1663-1665. doi:10.1136/gut.2006.107136.

- 91.- Castro-Alba PJ. Expresión de factor inducible de hipoxia HIF 1 α y VEGF implicados en el síndrome del túnel del carpo y su asociación con la aplicación de colágeno y polivinilpirrolidona in vitro. Tesis Maestría en Ciencias de la Salud. Instituto Politécnico Nacional. 2011.
- 92.- Wang L, Tu L, Zhang J, Xu K, Qian W. Stellate Cell Activation and Imbalanced Expression of TGF- β 1/TGF- β 3 in Acute Autoimmune Liver Lesions Induced by ConA in Mice. *BioMed Research International* Volume 2017 (2017), Article ID 2540540, 12 pages <https://doi.org/10.1155/2017/2540540>.
- 93.- Karagiannidis C, Velehorsch V, Obertriffter B, Macha HN, Linder A, Freitag L. High-level expression of matrix-associated transforming growth factor-1 in benign airway stenosis. *Chest*. 2006; 129: 1298-1304. doi: 10.1378/chest.129.5.1298.
- 94.- 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 UnivSci B*. 2012; 13: 997-1005. doi: 10.1631/jzus.B1200055.
- 95.- 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>.
- 96.- 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. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.06.110.
- 97.- Van de Water L. Mechanisms by which fibrin and fibronectin appear in healing wounds: implications for Peyronie's disease. *J Urol*. 1997; 157: 306-310.
- 98.- To WS, Midwood KS. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2011; 2011, 4:21 doi: 10.1186/1755-1536-4-21.
- 99.- Babu M, Diegelmann R, Oliver N. Fibronectin is overproduced by keloid fibroblasts during abnormal wound healing. *Molecular and Cellular Biology*. 1989; 9: 1642-1650.
- 100.- Shaffer JJ. Keloids scars: A review with a critical look to therapeutic options. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46: S63-97.
- 101.- Briones Torres CD. Expresión de fibronectina en cicatrización post-traqueoplastia con uso de moduladores de la cicatrización. Tesis Especialista en Otorrinolaringología, Cirugía de Cabeza y Cuello. Universidad Nacional Autónoma de México. 2016.

102.- Veen EJ, Dikkers FG. Topical use of MMC in the upper aerodigestive tract: a review on the side effects. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2010; 267: 327-334. doi: 10.1007/s00405-009-1151-0.

103.- Lee JK, Lee MY, Kim MK, Moon NJ. Effect of mitomycin C on the tensile properties of the upper lacrimal canaliculi in a rabbit model. *Exp Eye Res.* 2012; 102: 38-43. doi: 10.1016/j.exer.2012.07.006.
006.