

11236



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SUBDIVISIÓN DE ESPECIALIDADES**

CENTRO MÉDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"

**ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO Y ACTIVIDAD DE
METALOPROTEINASA-2 EN LA FASE AGUDA
DE LA ESTENOSIS SUBGLÓTICA
EXPERIMENTAL**

**TESIS DE POSGRADO
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN
OTORRINOLARINGOLOGÍA
P R E S E N T A :
DRA. MARTHA GARCÍA GALLARDO**



**ASESORES DE TESIS:
DR. JOEL CRUZ HERNÁNDEZ
DR. EN C. ARMANDO PÉREZ TORRES**

MÉXICO, D.F.,

2004



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.



[Handwritten signature]

DR. MAURICIO DI SILVIO LOPEZ
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

[Handwritten signature]

DR. RAFAEL NAVARRO MENESES
PROFESOR TITULAR DEL CURSO

[Handwritten signature]

DR. JOEL CRUZ HERNÁNDEZ
ASESOR DE TESIS



SUBDIVISIÓN DE ESPECIALIZACIÓN
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U.N.A.M.

[Handwritten signature]

DR. ARMANDO PÉREZ TORRES
ASESOR EXTERNO DE TESIS

[Handwritten signature]

DRA. MARTHA GARCÍA GALLARDO
INVESTIGADOR

AGRADECIMIENTOS:

M.V.Z. BENJAMÍN LEÓN MANCILLA del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la UNAM, por su invaluable apoyo en el cuidado y manejo quirúrgico de los conejos.

BIOLOGA MARTHA USTARROZ CANO del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM, por su colaboración en la técnica inmunohistoquímica.

HISTOTECNOLOGA VERÓNICA RODRÍGUEZ, jefa del laboratorio de técnica histológica ordinaria del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM, por su experta colaboración en el procesamiento y tinción de las muestras.

SR. FRANCISCO PASOS del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM por su ayuda en el procesamiento de imágenes.

Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM por haber donado los animales para realizar este estudio.

Dr. en C. ARMANDO PÉREZ TORRES jefe del Laboratorio de Inmunología comparada de piel y mucosas del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, por la idea, el diseño y el análisis del trabajo.

MATEMÁTICO GALICIA del CMN "20 de Noviembre" por su apoyo en el análisis estadístico.

INDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Planteamiento del problema	7
Justificación	7
Hipótesis	7
Objetivos	7
Tipo de estudio	7
Material y Métodos	9
Resultados	12
Figura 2	13
Figura 3	14
Figura 4	15
Figura 5	17
Figura 6	18
Figura 7	18
Figura 8	20
Análisis estadístico	22
Gráficas	22- 31
Discusión	32
Conclusiones	36
Perspectivas	36
Apéndice	37
Referencias	43

RESUMEN

Introducción. La estenosis laríngea (EL) es un estrechamiento completo o parcial de la endolaringe que afecta tanto a la población pediátrica como a la adulta. La causa más frecuente de la estenosis subglótica adquirida es la intubación orotraqueal prolongada. Los modelos experimentales de EL señalan a la lesión del cartilago como el factor más importante en el desarrollo de la estenosis. Sin embargo, no se conoce la fisiopatología subyacente. Las metaloproteinasas son enzimas que degradan la matriz extracelular y su activación excesiva se acompaña de una respuesta de reparación que lleva a la fibrosis. Por lo anterior, es posible que participen en el desarrollo de la EL experimental y iatrogénica.

Objetivos. El objetivo del presente trabajo es demostrar la expresión de metaloproteinasa 2 (MMP-2) y estudiar los cambios histopatológicos en un modelo experimental de estenosis subglótica en el conejo.

Material y Métodos. A 24 conejos se les produjo una lesión subglótica directa que desarrolla estenosis. El sitio de la lesión se estudió a los 3, 6 y 30 días, macroscópicamente para determinar el grado de estenosis y microscópicamente, después de procesarlas con diferentes técnicas de tinción y con inmunohistoquímica para determinar los cambios tisulares y de expresión de la MMP-2. El sitio contralateral a la lesión se utilizó como testigo y la región subglótica de 6 conejos en los que no se realizó la lesión, como grupo control. Para el análisis estadístico se aplicó análisis de varianza para comparar las respuestas promedio de las variables estudiadas. El valor significativo de $p < .0005$.

Resultados. Los animales experimentales mostraron estenosis grado I (promedio 15.5 y 13.1%) en el grupo de 3 y 6 días y estenosis grado II (promedio 55.5%) en el grupo de 30 días. En los primeros 6 días posteriores a la lesión hay una respuesta tisular caracterizada por la pérdida del epitelio normal y reepitelización con metaplasia escamosa o con un epitelio similar al respiratorio pero sin células calciformes ni células ciliadas; por cambio del tejido conjuntivo fibroso laxo a tejido conjuntivo areolar de la lámina propia y de la submucosa con mayor vascularización y reparación con fibrosis temprana; por la presencia de un infiltrado eosinofílico de la lámina propia y del epitelio, con trans migración hacia la luz; por pérdida de los adenomeros mucoserosos; por pericondritis y por inmunorreactividad a la MMP-2, localizada en eosinófilos, fibroblastos y condrocitos. A los 30 días de la lesión, la respuesta tisular está representada por una notable fibrosis vascularizada que sustituye la lámina propia y la submucosa normales y donde no hay positividad a MMP-2.

Discusión. En el presente trabajo se demuestra por primera vez la expresión de MMP-2 y la presencia de eosinofilia tisular, infiltrado epitelial y trans migración de eosinófilos, eventos que podrían ser fundamentales en la magnitud del daño tisular inicial. Por otro lado, las nuevas atribuciones funcionales de los eosinófilos relacionadas con la promoción de la inducción de la mitosis y mayor síntesis de matriz extracelular por los fibroblastos, coloca a éstas células en el centro de la fisiopatología de la estenosis experimental y podría abrir nuevas posibilidades terapéuticas y de prevención de estenosis subglótica.

Conclusión. En la estenosis subglótica experimental, la activación temprana de los eosinófilos *in situ*, con la expresión de MMP-2 determinan parcialmente la magnitud del daño a la matriz extracelular. Al mismo tiempo, los eosinófilos podrían promover la reparación de la lesión al estimular la activación y síntesis de matriz por parte de los fibroblastos.

ABSTRACT

Introduction. Pediatric and adult population can be affected by a laryngeal stenosis (LS) that represent a partial or complete narrowness of larynx. An extended orotracheal intubation is the more frequent cause of subglottic stenosis. According to experimental models observations, cartilage disturb is the more important event to develop stenosis. However, many physiopathological events associated to this process are unknown. Metalloproteinases (MMPs) are zinc-dependent extracellular matrix degradating enzymes, whose excessive activation is accompanied by tissue inhibition and then by fibrosis. Thus, it is possible that MMPs have a central role in experimental and iatrogenic LS.

Objectives. Induce LS in the rabbit to study the histopathological changes and demonstrate the expression of MMP-2.

Material and Methods. Experimental group were 24 rabbits which were studied at 3, 6, and 30 days after subglottic injury. Stenosis grade was evaluated macroscopically and different histological stain techniques and immunohistochemistry to MMP-2 were used to study histological changes. Wound opposite side and normal subglottis of 6 animals of control group was analyzed to compare the results. Comparisons of mean responses between groups were performed with an analysis of variance. The differences were considered significant when the $P < 0.0005$.

Results. A subglottic stenosis grade I was observed in experimental animals at 3 and 6 days after injury, whereas a grade II was identified at 30 days. Injury produce among the onset and 6 days after, a loose of normal epithelia, connective tissue in lamina propria and submucosa had an areolar aspect, increase in blood vessels, and evidences of perichondritis. Simultaneously, repair of the wound was observed, characterized by re-epithelization and early fibrosis. However, the most prominent finding was the presence of lamina propria and epithelial infiltration by eosinophils, which were MMP-2 positive as well as fibroblast and chondrocytes. At 30 days of injury, a prominent vascularized fibrosis was observed among epithelia and cartilage.

Discussion. In the present work we demonstrated for the first time the presence of an intense infiltrate of eosinophils at injury subglottic of rabbit, that express MMP-2, as well as other cells like fibroblast and chondrocytes. We propose and discuss that eosinophils play an important role in degradation of extracellular matrix but also in the repair of wound. New therapeutic approaches to prevent or treatment of subglottic stenosis are possible with this information.

Conclusion. We concluded that eosinophils and MMP-2 expression might increase the damage in experimental LS, but also these cells could be relevant in the repair process, stimulating mitosis and extracellular matrix by fibroblasts.

INTRODUCCIÓN

La estenosis laríngea (EL) es un estrechamiento completo o parcial de la endolaringe que afecta tanto a la población pediátrica como a la adulta. Se puede presentar en la supraglotis, la glotis o en la subglotis. Esta última es la más común y la de más difícil tratamiento. La etiología de la estenosis laríngea puede ser dividida en dos grupos: la congénita y la adquirida. ⁽¹⁾

Estenosis laríngea congénita

La EL congénita es secundaria a una inadecuada recanalización de la luz laríngea después de una completa fusión epitelial normal al final del tercer mes de gestación. ^(2,3) La estenosis congénita subglótica se encuentra dentro de un continuo de alteraciones que incluyen atresia laríngea, estenosis y membranas. ^(4,5,6) La estenosis subglótica congénita puede ser membranosa y cartilaginosa ^(7,8) y debido a que es menos severa que la adquirida, el tratamiento es más conservador.

Estenosis laríngea adquirida

La EL adquirida tiene diversas causas dentro de las que destacan la intubación orotraqueal prolongada, la infección, la inhalación de sustancias tóxicas y las enfermedades inflamatorias sistémicas o locales y neoplasias. ⁽⁹⁾ La forma adquirida más frecuente es de origen iatrogénico y es el resultado de una intubación prolongada o de intervención quirúrgica. ⁽¹⁰⁾ Antes de la era moderna de la resucitación neonatal, la mayoría de las estenosis subglóticas eran de origen congénito, pero después de los años 60 casi el 92% son del tipo adquirido secundario a intubación orotraqueal. ⁽⁹⁾ El rango de incidencia de estenosis subglótica después de intubación prolongada en neonatos varía desde 1% hasta el 8%. ⁽¹¹⁻¹³⁾ En la población adulta la incidencia de estenosis subglótica postintubación va de 4% al 14%.

Fisiopatología de la estenosis subglótica adquirida

La fisiopatología de la estenosis subglótica adquirida está parcialmente entendida. La presión ejercida por la cánula endotraqueal en las primeras horas o días provoca edema y eritema de la mucosa a nivel del cricoides. ^(1,5,15) Con la persistencia del trauma, aparecen ulceraciones y tejido de granulación con exposición del pericondrio, seguida de condritis, la cual empeora si hay infección bacteriana agregada. ^(16,17) Lo anterior conduce a la necrosis y destrucción del cartílago subyacente y, por lo tanto, del soporte de la luz subglótica. Cuando la fuente del trauma es removida, la pared inicia una cicatrización con formación de tejido fibroso y producción de colágena.

El depósito de colágena inicia a los 5 ó 6 días después del trauma y alcanza un máximo entre los 14 y 35 días. Los fibroblastos presentes se contraen y traccionan circunferencialmente los bordes de la cicatriz, disminuyendo la luz laríngea y traqueal. ^(1,5)

Los sitios más dañados son la región subglótica en los niños y la endolaringe posterior en los adultos.^(18,19) En los niños, la región subglótica es especialmente proclive al daño por intubación endotraqueal.^(20,21) Los factores implicados son: daño directo a la mucosa subglótica por intubación traumática o intentos repetidos; acción abrasiva del tubo en contra de la mucosa durante la deglución; características físicas del tubo endotraqueal, acción de "pistón" del ventilador mecánico, coexistencia con tubos nasogástricos, factores sistémicos y el tiempo de intubación, que para muchos autores es el factor más importante.

Es aceptado que la intubación es mejor tolerada en pacientes jóvenes que en viejos debido a la relativa inmadurez del cartílago laríngeo de los neonatos, caracterizado por una mayor celularidad con escasa matriz cartilaginosa, lo que lo hace más flexible y resistente a la presión. Así como la localización más alta de la laringe neonatal, con una inclinación posterior y su forma de embudo.⁽¹⁷⁾

Los niños prematuros pueden ser intubados por más de 4 a 5 meses, pero los adultos por un máximo de 2 a 3 semanas antes de pensar en una vía aérea alternativa. Sin embargo, no hay un lineamiento exacto para la duración de intubación en función de la edad.⁽¹⁰⁾ Varios estudios en adultos han mostrado que un periodo de 7 a 10 días es aceptable, después del cual la intubación prolongada presenta mayor incidencia de complicaciones.

Clasificación de la estenosis laríngea

Uno de los sistemas de clasificación de la EL más comúnmente usado es el propuesto por Cotton en 1984,⁽²²⁾ modificado subsecuentemente por Cotton *et al* en 1989.⁽²³⁾ El porcentaje de obstrucción y la localización anatómica de la lesión están determinados por evaluación endoscópica y se otorga de grado I al IV. (Tabla 1)

Tabla 1. Escala de gradiente para estenosis laríngea

Grado	Obstrucción de la luz laríngea
I	<50%
II	51-70%
III	71-99%
IV	obstrucción completa

Tratamiento de la estenosis laringotraqueal

El tratamiento de la EL adquirida continua siendo un gran reto. El éxito del tratamiento requiere establecer una adecuada vía aérea mientras se preservan las funciones laríngeas de protección, fonación y cierre glótico sostenido para incrementar la presión intratorácica. En los casos más leves se recomienda una conducta expectante. Los casos moderados pueden ser tratados con procedimientos endoscópicos con dilatación o uso de láser.⁽²⁴⁾ Los tratamientos quirúrgicos abiertos son variados y pueden utilizar o no diversas férulas o injertos. En éstos se debe procurar el mínimo trauma quirúrgico hacia la vía aérea para reducir la cantidad de tejido fibroso. Sin embargo, en todos se ha observado un

apreciable rango de reestenosis, probablemente por una continuación del proceso inflamatorio crónico inicial o secundario al daño sufrido durante el manejo.

El uso de diversos agentes farmacológicos para mejorar los resultados de los procedimientos quirúrgicos es otra estrategia. Se han probado esteroides sistémicos combinados con antibióticos; agentes laticígenos^(5,27) que interfieren con el proceso de formación de enlaces cruzados de la colágena y otros, sin resultados concluyentes⁽²⁶⁾ que aún no tienen un impacto significativo en la práctica^(16,25) y esta claro que no existe un tratamiento óptimo.

Modelos experimentales de estenosis laríngea

Recientemente, se ha enfocado la atención hacia la fisiopatología de la estenosis subglótica adquirida secundaria a intubación endotraqueal prolongada, así como a su prevención y tratamiento. Sin embargo, ha sido difícil estudiar los factores responsables de este daño y probar tratamientos en estudios clínicos controlados. En consecuencia, muchos investigadores han propuesto modelos animales para estudiar la respuesta de la región subglótica hacia un daño bien definido y probar diversas opciones terapéuticas.

El modelo canino ha sido utilizado por varios años, pero tiene diversas limitaciones de procedimientos, morbi-mortalidad y altos costos.⁽²⁸⁾ El modelo de conejo ha sido utilizado en múltiples estudios de estenosis subglótica experimental.^(29,30) Se ha utilizado en inducción de estenosis subglótica vía endoscópica transoral y a través de la realización de laringofisura para ocasionar daño químico o mecánico circunferencial.⁽¹⁰⁾ Se menciona que el conejo resulta un buen modelo por las dimensiones similares a las de la laringe neonatal.

Estenosis laríngea experimental y metaloproteinasas

Las metaloproteinasas (MMPs) son una familia de enzimas endopeptidasas dependientes de zinc y activadas por Ca^{2+} , responsables de la degradación de la matriz extracelular, que desempeñan un papel central en diversos procesos fisiológicos como la morfogénesis, la angiogénesis, la inflamación, la ovulación, la involución uterina, etc.⁽³¹⁾ Las MMPs se pueden clasificar en diferentes subfamilias que incluyen a las colagenasas, gelatinasas, estromelinas y metaloproteinasas "de membrana". La expresión genética de las MMPs está regulada por una variedad de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento, los cuales pueden incrementar o disminuir la síntesis de estas enzimas en una célula específica.⁽³²⁾

Las MMPs también son importantes en el desarrollo de numerosos fenómenos patológicos que incluyen artritis reumatoide, invasión tumoral, enfermedades fibrosantes, enfisema y daño pulmonar agudo, entre otros.⁽³³⁾ Así, el incremento descontrolado de su actividad provoca destrucción tisular, como se observa en el cartílago en la artritis reumatoide, el cual es degradado por colagenasas intersticiales. Por el contrario, en el caso de las enfermedades fibrosantes, como la fibrosis pulmonar, la disminución anormal de la actividad de MMPs favorece el depósito exagerado de moléculas de la matriz, en especial de las colágenas intersticiales en los tejidos afectados.⁽³⁴⁾ Esto último podría ser análogo a lo que ocurre en el desarrollo de procesos estenóticos de estructuras tubulares. Hasta ahora no existen informes de la posible relación entre la estenosis laringotraqueal

experimental o de pacientes y la expresión temporal de MMPs. Si embargo, la participación de estas enzimas en la fisiopatología de la estenosis laringotraqueal es sugerida por los resultados obtenidos de un modelo de tráquea *in vitro*, donde se demostró que los condrocitos secretan MMP-2 y MMP-9. Estas MMPs interfirieron con la proliferación, migración y adhesión del epitelio respiratorio y, por tanto, con la reepitelización luminal.⁽³⁵⁾

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta ahora no se conocen los eventos celulares y moleculares tempranos en las lesiones experimentales y iatrogénicas laringotraqueales que culminan con el desarrollo de estenosis. El conocimiento detallado de aquellos en modelos experimentales podría contribuir al diseño de estrategias de prevención y tratamiento de la estenosis subglótica en humanos.

JUSTIFICACIÓN

Aunque la estenosis subglótica adquirida, principalmente secundaria a intubación prolongada no se presenta en porcentajes muy altos, se ha visto un incremento en su incidencia y tiene un importante impacto en la calidad de vida de los pacientes que la padecen. Por otro lado, aún no existe un tratamiento óptimo por lo que representa un gran reto terapéutico. El conocimiento detallado de la fisiopatología que lleva a la degradación de la matriz y a la reparación o cicatrización excesiva podría abrir camino en el diseño de tratamientos.

HIPÓTESIS

La lesión experimental que induce estenosis subglótica en conejos se relaciona con la expresión aguda de MMP-2.

OBJETIVOS

General

Describir la reactividad tisular y la expresión de MMP-2 a los 3, 6 y 30 días después de la lesión experimental que induce estenosis subglótica en conejos.

Específicos

Provocar una lesión subglótica similar a la que induce estenosis subglótica experimental en conejos.

Estudiar los cambios epiteliales, de la lámina propia y del cartilago en el sitio de la lesión que induce estenosis subglótica en conejos y comparar con el sitio contralateral.

Demostrar por inmunohistoquímica la expresión de MMP-2 en el sitio de la lesión que induce estenosis subglótica y contralateral, en los diferentes tiempos establecidos.

TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio experimental, prospectivo, longitudinal, descriptivo, comparativo y ciego. Se llevo a cabo en el laboratorio de Inmunología comparada de piel y mucosas del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM. El tiempo de realización fue de enero a julio del 2004.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 30 conejos machos Nueva Zelanda libres de patógenos de 3 kg, blancos, mayores de 15 semanas de edad, proporcionados por el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Todos los aspectos de manejo y procedimientos en los conejos se hicieron de acuerdo a lo sugerido en el "Manual de manejo y anestesia en el conejo como modelo quirúrgico en docencia" de la Facultad de Medicina.⁽³⁶⁾ El grupo experimental fue de 24 conejos el cual se dividió en 3 grupos de 8 conejos cada uno. El resto de los animales fueron el grupo control. Todos los animales tuvieron un ayuno preoperatorio de 3 horas.

Procedimiento quirúrgico

Después de la anestesia general por inyección intramuscular de ketamina (20mg/kg) y pentobarbital sódico (40mg/kg) intravenoso, en posición supina con hiperextensión del cuello, se realizó tricotomía de la región anterior del cuello y antisepsia con solución de yodo povidona y se limitó el campo quirúrgico con gasas estériles. Posteriormente, se infiltró xilocaína con epinefrina al 1% y se hizo una incisión longitudinal en la línea media del cuello, desde el cartilago tiroides hasta aproximadamente 1 cm por arriba del esternón.⁽⁹⁾ Se realizó disección roma del tejido subcutáneo, de los músculos pretiroideos en la línea media y de la fascia pretraqueal. Se hizo una incisión horizontal de 3 mm por debajo del cartilago cricoides a través de la cual la mucosa cricoidea fue lesionada posterolateralmente del lado derecho, utilizando una fresa quirúrgica de diamante la cual se hizo girar varias veces con el fin de ocasionar daño profundo que incluyera al cartilago⁽⁹⁾. La fisura y los planos se suturaron con puntos simples de poliglactil 4-0. (Vicryl®) La piel se suturó con nylon 4-0 (dermalon®) con puntos simples. (fig. 1) Al finalizar el procedimiento los animales presentaron respiración espontánea.

Cada grupo de animales correspondió al tiempo en que serían sacrificados y los tiempos fueron: 3, 6 y 30 días. Después del procedimiento todos los animales se mantuvieron con alimento y agua a libre demanda. Los signos vitales se registraron diariamente y se puso especial atención al estado de la herida y a la identificación de datos de dificultad respiratoria. Adicionalmente se buscaron datos de enfisema subcutáneo, hematomas y estado general del conejo.

Grupo control y testigo

La mitad izquierda no lesionada de los conejos experimentales se utilizó como el testigo de la mitad derecha lesionada. Adicionalmente, se incluyeron 2 conejos por cada tiempo de sacrificio, sometidos a todos los procedimientos excepto la lesión subglótica (grupo "sham") Estos 6 animales constituyen el grupo control.

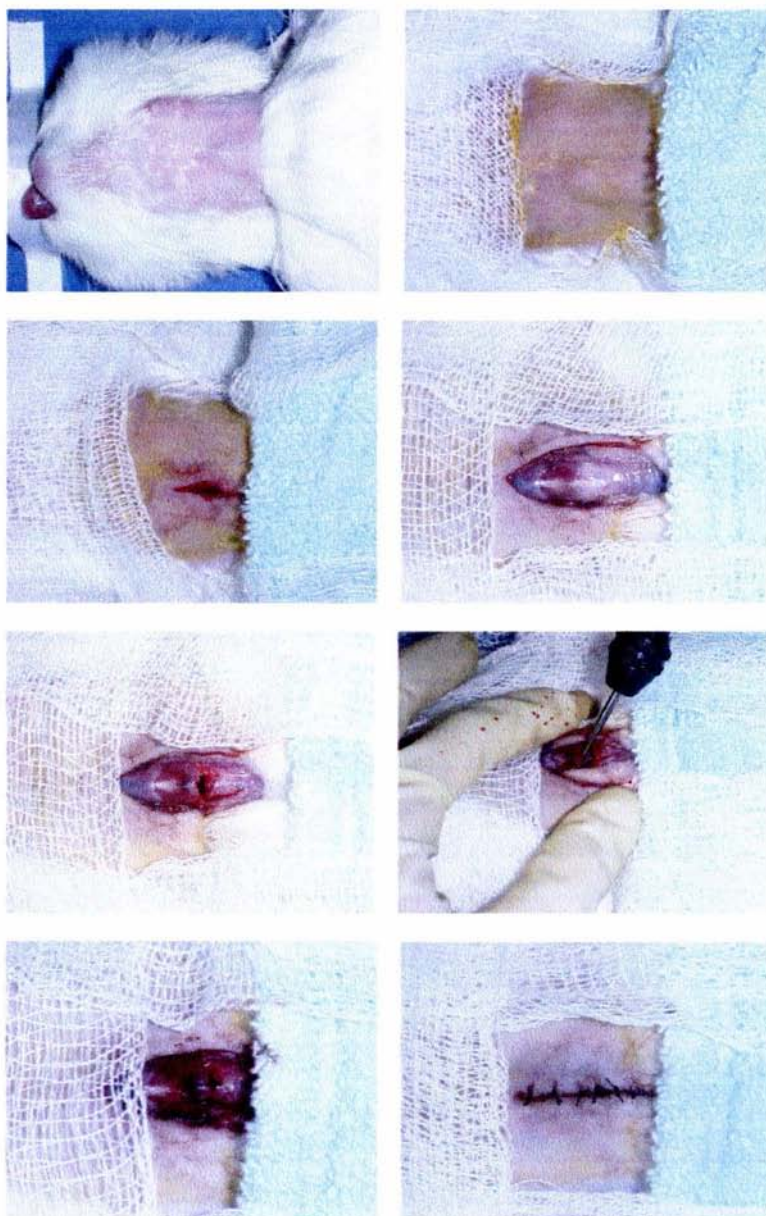


Figura 1. Procedimiento quirúrgico para lesión subglótica del conejo

Criterios de inclusión

Conejos machos Nueva Zelanda de 3 kg y libres de patógenos de 15 semanas de edad, sanos y donados por el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Criterios de exclusión

Se excluyeron todos aquellos conejos clínicamente enfermos. Así como a conejos hembras o de menor peso o no donados por el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Criterios de eliminación.

Conejos que fallecieran durante el estudio. Que presentaran infección o enfermedad durante el desarrollo del estudio o que tuvieran alguna otra complicación.

Obtención de las muestras

Los animales fueron sacrificados por sobreeanestesia con 10 mL de pentobarbital sódico intraperitoneal a los 3, 6 y 30 días después de la lesión subglótica. Se obtuvo la laringe y se realizaron cortes transversales de 3 mm con navaja Gillette®. El sitio de la lesión se dividió en dos partes. Una se destinó para la identificación de MMP-2 y fue incluida en O.C.T. compound (Tissue-Tek, Sakura®) y congelada a -70 °C en un ultracongelador (REVCO, Inc.) hasta la realización de los cortes por congelación. La otra fue fijada en formol al 10% en amortiguador de fosfatos, durante 24 h y procesada para inclusión y corte en parafina.

Como testigo se utilizó la zona no lesionada del mismo corte y como controles se emplearon cortes del área subglótica de conejos a los que se les realizaron todos los procedimientos excepto la lesión (grupo "sham") y que se procesaron como los experimentales

Técnicas histológicas (ver apéndice)

Los cortes, de 6 µm de grosor, fueron teñidos con las técnicas de Hematoxilina-Eosina (H-E) para histología general; PAS para lámina basal y glucoproteínas; tricrómico de Masson para fibras de colágena; Wilder para fibras reticulares; azul alciano a pH 2.5 para glucosaminoglucanos (GAGs) sulfatados débilmente ácidos, sialomucinas y ácido hialurónico; y azul alciano a pH 0.4 para GAGs sulfatados fuertemente ácidos. Las muestras fueron analizadas por un investigador que desconocía el origen de los cortes (ciego simple). Se tomaron fotomicrografías de los hallazgos representativos.

Inmunohistoquímica (ver apéndice)

Los cortes por congelación fueron procesados con una técnica de inmunohistoquímica indirecta utilizando como reactivos un anticuerpo monoclonal anti- MMP-2 (IgG de ratón) y un anticuerpo secundario biotinilado (Zymed, San Francisco, CA) el cual fue revelado con el sistema avidina-biotina-peroxidasa (Dako, Inc. Carpintería, CA). El control de la técnica se hizo utilizando, en cada tipo de corte (experimental y control), suero normal de ratón como anticuerpo primario.

Descripción macroscópica y grado de estenosis

Todos los especímenes que obtenidos se examinaron macroscópicamente y se determinó el porcentaje de estenosis de acuerdo a la clasificación de Cotton. (grado I al IV) Se realizó un registro fotográfico representativo de los cortes transversales macroscópicos de los especímenes.

Análisis estadístico

El análisis estadístico aplicado a los resultados se hizo a través del análisis de varianza para comparar las respuestas promedio de cada variable. Se tomó como significativa una $p < 0.0005$. En las variables histopatológicas por tratarse de números planos no se logró obtener grado de significancia.

RESULTADOS

En todos los conejos se observó cicatrización de la herida sin datos de infección, hemorragia, hematoma y no se presentó enfisema subcutáneo en ningún caso. Los signos vitales se encontraron dentro de parámetros normales en todos los conejos. En cuanto a los datos de dificultad respiratoria sólo 5 conejos (20.8%) de grupo experimental presentaron estridor leve y taquipnea durante los primeros 2 días postoperatorios. Lo anterior cedió espontáneamente y se pensó que fue secundario a edema agudo de la mucosa. Después, ningún conejo presentó datos de dificultad respiratoria y se mantuvieron en buen estado general y tolerando la vía oral normalmente. Ningún conejo falleció durante la realización del estudio.

Grado de estenosis

Los especímenes de los animales que se sacrificaron a los 3 y 6 días presentaron estenosis subglótica grado I, promedio = 15.5% y 13.1%, respectivamente (**fig. 2a**). En los animales sacrificados a los 30 días de la lesión, la estenosis fue de grado II, promedio 55.6% (**fig.2b y gráfica 1**). Estos cambios fueron dependientes del lado derecho, que fue el sitio lesionado. El sitio contralateral a la lesión y la subglotis del grupo "sham" no mostraron ningún grado de estenosis.

Descripción macroscópica

Los especímenes del día 3 de sacrificio mostraron erosión de la mucosa, hiperemia intensa y disminución de la luz del cricoides del lado derecho del anillo. Los especímenes del día 6 mostraron los mismos cambios, pero en una intensidad menor. En lo que respecta a los especímenes del día 30 se encontró disminución de la luz del cricoides, dependiente del lado derecho incluso con convexidad hacia la luz. El lado izquierdo de los especímenes no mostró cambios macroscópicos evidentes. Los especímenes del grupo "sham" (control) que correspondieron al día 3 y al día 6, mostraron cambios en los músculos pretraqueales y en el sitio de incisión del cartílago, consistentes en hiperemia y ligero edema, el cual no se extendía hacia la luz del cricoides. En los del día 30 no se encontraron cambios macroscópicos evidentes.

Histopatología (Gráficas 2 a 9)

Conejos con 3 días de lesión

Zona de lesión. Se encontró hemorragia acompañada de áreas de desepitelización. La lámina propia mostró un aspecto areolar con pérdida de la lámina elástica y congestión de los vasos (**fig.3b**). Fue notable la ausencia de unidades glandulares y la disminución de las fibras reticulares. En algunos sitios con infiltrado inflamatorio en la lámina propia, éste se extendía hasta el cartílago y se observaron sitios de pericondritis (**fig. 3c**).

Zona cercana a la lesión. En algunos sitios se observaron intentos de reepitelización con metaplasia escamosa, epitelio cúbico estratificado o epitelio pseudoestratificado sin cilios y sin células caliciformes (**figs. 4b, d; 5a, b**). Un

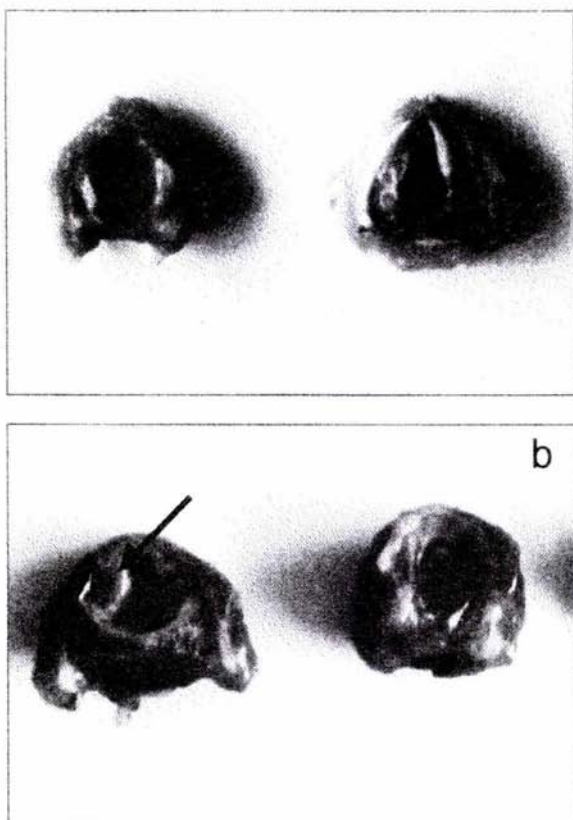


Figura 2. Aspecto macroscópico de la estenosis subglótica experimental en conejos. El grado I de estenosis subglótica se observó a los 3 días de la lesión (a). A los 30 días de la lesión se observó un grado II de estenosis (b, flecha).

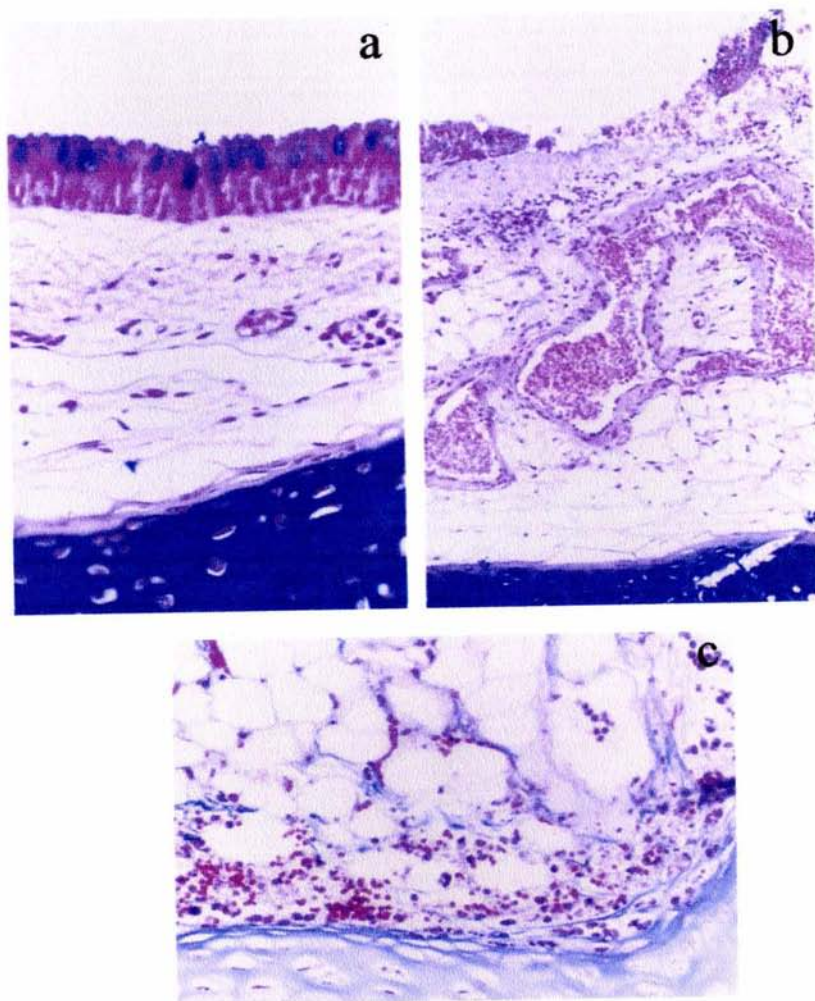


Figura 3. Fotomicrografías de la subglotis de conejo a los 3 días de la lesión. En el sitio de la lesión se observó pérdida del epitelio, hemorragia, aspecto areolar y engrosamiento de la lámina propia, aumento del calibre y de la congestión vascular (b). Algunos sitios del pericondrio mostraron infiltrado inflamatorio (c). Compárese con el aspecto de la pared subglótica contralateral a la lesión (a). Azul alciano (a,b); tricrómico de Masson (c). X200: a y c; X100: b.

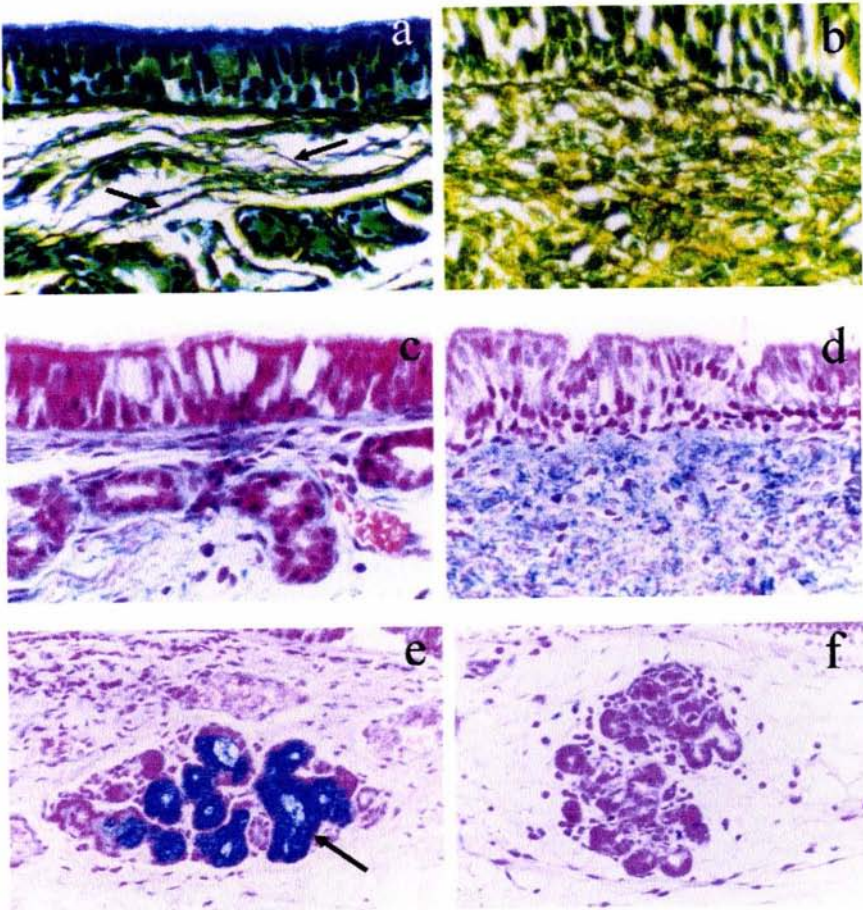


Figura 4. Cambios representativos a los 3 días en la zona cercana a la lesión subglótica del conejo y en la zona contralateral. La lámina propia presenta sitios con mayor densidad de fibras de colágena (b,d), ausencia de fibras reticulares (b), observadas en la zona contralateral en color negro (a, flechas). El epitelio es similar al observado en la zona contralateral (c) pero carece de células caliciformes y hay pocas células ciliadas (d). Los adenomeros observados en los sitios con tejido areolar de la zona cercana a lesión carecen de células productoras de moco (f), lo que contrasta con la zona contralateral (e, flecha Wilder (a,b); tricrómico de Masson (c,d); azul alciano (e,f). X200, todas las figuras

hallazgo importante fue la presencia de un infiltrado notable de eosinófilos, localizado en la lámina propia y dentro del epitelio, los cuales mostraron trans migración hacia la luz de la subglotis (**fig.5a-c**). En el límite con la zona contralateral a la lesión se observó un claro gradiente en el infiltrado epitelial de eosinófilos (**fig. 5a**). Los pocos adenómeros presentes no contenían células caliciformes (**fig. 4f**). En la lamina propia hay una mayor densidad de fibras de colágena sin recuperación de las fibras reticulares (**fig. 4b,d**) así como un aumento de fibroblastos aislados o en cúmulos con eosinofilia. Fue difícil distinguir el límite entre la lámina propia y la submucosa.

Zona contralateral. La zona contralateral a la lesión prácticamente no mostró cambios histológicos y estuvo caracterizada por la presencia de un epitelio cilíndrico estratificado ciliado con células caliciformes, con una lámina propia de tejido conjuntivo laxo con finas fibras reticulares, con adenómeros mixtos submucosos y vasos de pequeño calibre (**figs. 3a; 4a, c, e**).

Conejos con 6 días de lesión

Zona de lesión. Se siguen observando áreas con pérdida del epitelio o con intentos de reepitelización. La lámina propia continúa con aspecto areolar y reaparecen las fibras reticulares. Es frecuente la presencia de un infiltrado de células mononucleares, probablemente formado por monocitos y linfocitos, y abundantes macrófagos espumosos (**fig.6d**). En la periferia de la zona de lesión se observan haces de fibras de colágena dentro de la lámina propia, la cual posee vasos sanguíneos de mayor calibre que en los sitios de tejido areolar (**fig. 6e**). Persiste la ausencia de unidades glandulares y en algunos sitios hay pericondritis.

Zona cercana a la lesión. Los sitios reepitelizados de la mucosa mostraron metaplasia escamosa o epitelio pseudoestratificado con pocos cilios y pocas células caliciformes (**figs. 6a-c**). Persiste la eosinofilia "in situ" y la trans migración de eosinófilos (**fig.6b**). La lámina propia tuvo un aspecto fibroso, carecía de unidades glandulares y presentó un gran celularidad, probablemente formada por fibroblastos (**fig. 6a**).

Zona contralateral. No mostró cambios histológico destacables. De hecho, sus características fueron como las descritas en la zona contralateral a los 3 días de la lesión. La presencia de tejido linfoide asociado a la mucosa fue un hallazgo común, y fue similar a lo observado en los cortes de los animales control.

Conejos con lesión de 30 días

Zona de lesión. El epitelio observado era muy similar al típico "epitelio respiratorio". Sin embargo, en algunos sitios hubo disminución de células caliciformes y ciliadas. La lámina propia y la submucosa fueron sustituidas por una capa gruesa de fibrosis, con disposición circunferencial y transversal de las fibras de colágena y una nueva trama de fibras reticulares (**fig. 7b**). No se recuperaron las unidades glandulares y persiste la presencia de numerosos vasos sanguíneos. El infiltrado de eosinófilos disminuyó notablemente. El cartilago adyacente se

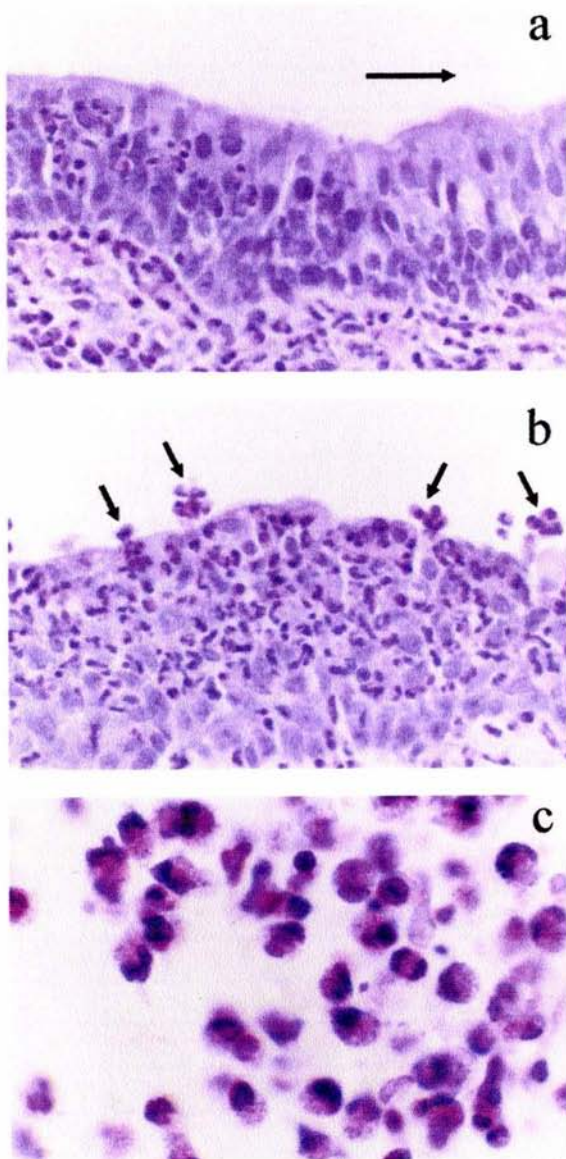


Figura 5. Fotomicrografías del sitio cercano a la lesión subglótica en el conejo a los 3 días de evolución. Es notable la eosinofilia tisular y la transmigración epitelial de eosinófilos (a,b) hasta la superficie epitelial (b, flechas) quedando libres en la luz subglótica (c). Nótese que hacia el epitelio casi normal (a, flecha) no hay evidencia de la trasmigración de eosinófilos. H-E. X400 (a,b); X1000 (c).

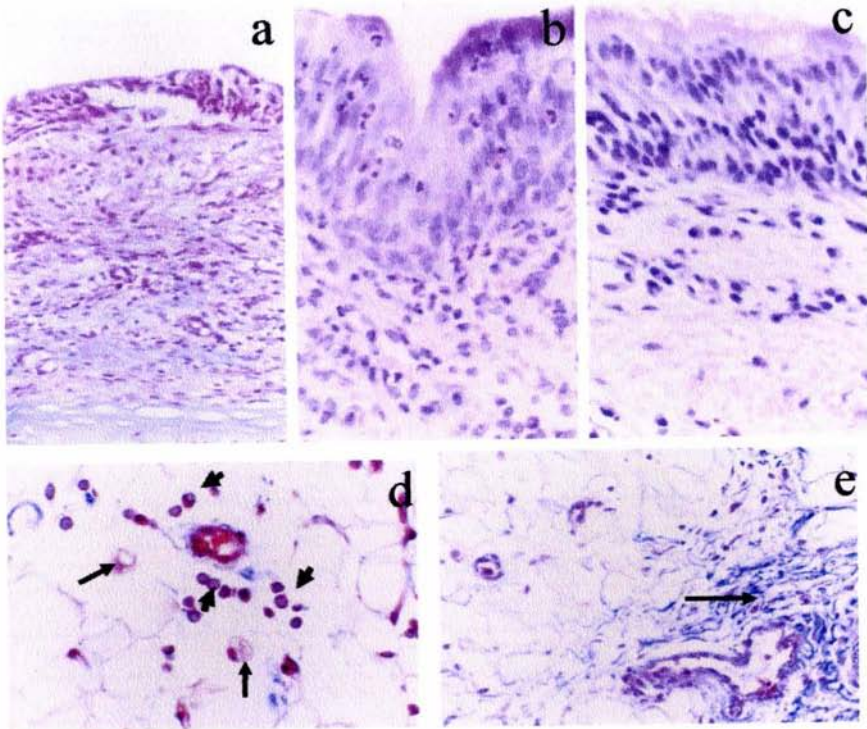
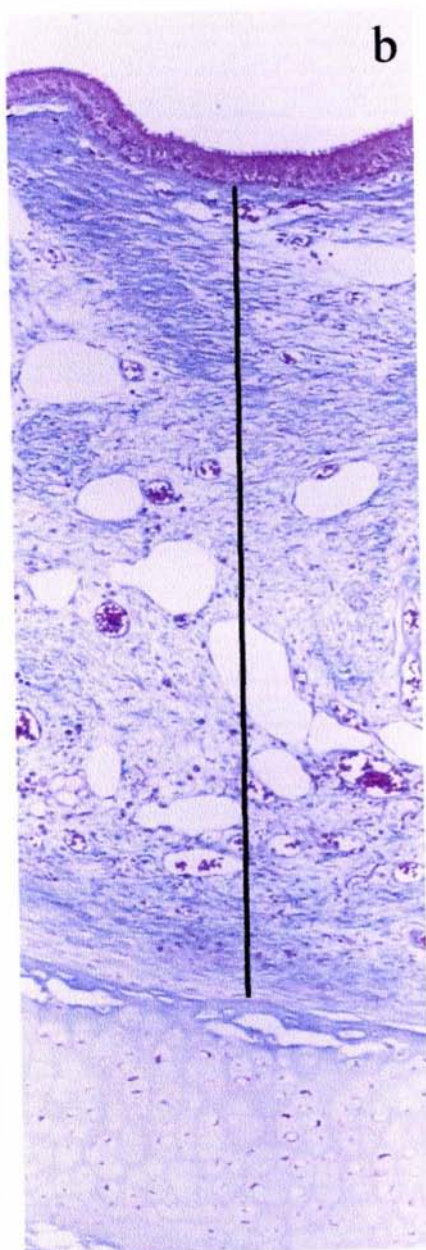
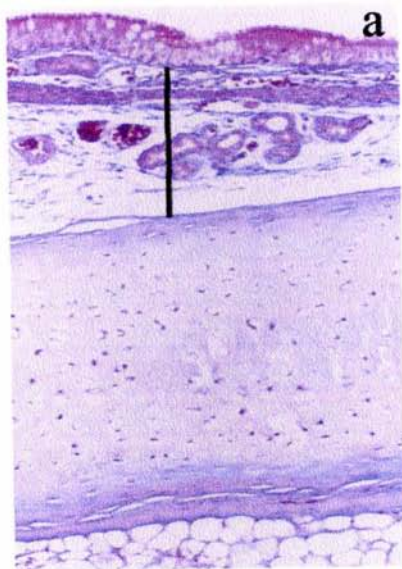


Figura 6. Fotomicrografías del sitio cercano (a,b) y de lesión subglótica (d,e) en el conejo a los 6 días de evolución. Se observan intentos de reepitelización, fibrosis y pérdida de adenómeros en la vecindad de la lesión (a), así como persistencia de la eosinofilia tisular y de la trans migración de eosinófilos y neutrófilos en zonas con metaplasia escamosa (b). La mucosa contralateral a la lesión no es completamente normal, ya que presenta alteraciones epiteliales y eosinófilos fácilmente visibles (c). En el sitio de la lesión predomina el tejido de aspecto areolar con vasos de pequeño calibre, fibras reticulares, macrófagos espumosos (d, flechas) e infiltrado mononuclear (d, cabezas de flecha), probablemente correspondiente a monocitos y linfocitos. Hacia la zona cercana a la lesión se observa el cambio de tejido areolar a fibroso (e, flecha), frecuentemente con vasos de mayor calibre y sin recuperación de los adenómeros. Tricrómico de Masson (a,d,e); H-E (b,c). X400 (a-d); X200 (e).

Figura 7. Fotomicrografías de la zona contralateral (a) al sitio de lesión subglótica en el conejo (b), a 30 días de evolución. En ambas, el aumento es el mismo (X100) y es evidente la diferencia de grosor (líneas) entre la lámina propia y submucosa del sitio no dañado (a) y el sitio de la fibrosis (b) que condicionó la disminución de la luz subglótica como se observa en la figura 2b (flecha). La estructura histológica se ha perdido y predominan el tejido fibroso y los vasos. El cambio es más evidente si consideramos que la imagen b resulta de la fusión de dos fotomicrografías. El cartilago vecino a la fibrosis se observa adelgazado. Tricrómico de Masson



encontró adelgazado o formando por islotes de diferente tamaño unidos entre sí por tejido conjuntivo denso.

Zona contralateral. El aspecto histológico de las capas de la laringe fue normal (fig. 7a), similar al observado en los cortes de los animales control, aunque se observaron algunos eosinófilos en la lámina propia

Inmunohistoquímica (gráfica 10)

Conejos con 3 días de lesión

Zona de lesión. La inmunorreactividad a MMP-2 se localizó en células presentes en la lámina propia de aspecto areolar y en el pericondrio, que pueden corresponder a fibroblastos (fig. 8a). Algunos sitios del cartílago presentaron condrocitos periféricos positivos así como condrocitos hipertróficos del centro del cartílago (fig. 8b).

Zona cercana a la lesión. Los fibroblastos y eosinófilos de la lámina propia e intraepiteliales MMP-2 resultaron positivos. Los condrocitos hipertróficos también fueron positivos (fig. 8c).

Zona contralateral. Algunos fibroblastos fueron débilmente positivos. Los condrocitos fueron negativos (fig. 8g).

Conejos con 6 días de lesión

Zona de lesión. La inmunorreactividad a MMP-2 en la zona de lesión fue similar a la descrita a los 3 días pero fue más intensa, sobre todo en donde persiste el tejido de aspecto areolar (fig. 8d). Los condrocitos superficiales no mostraron positividad como a los 3 días (fig. 8e) pero los grupos isogénicos de condrocitos hipertróficos fueron fuertemente positivos (fig. 8f).

Zona cercana a la lesión. En la zona cercana a la lesión se observaron eosinófilos y fibroblastos con mayor inmunorreactividad a MMP-2.

Zona contralateral. Resultó prácticamente negativa.

Conejos con 30 días de lesión

Zona de estenosis. Característicamente, el sitio de fibrosis careció de inmunorreactividad a MMP-2. Algunos condrocitos fueron débilmente positivos.

Zona contralateral. Ocasionalmente se observaron células débilmente positivas a MMP-2, que pueden corresponder a fibroblastos.

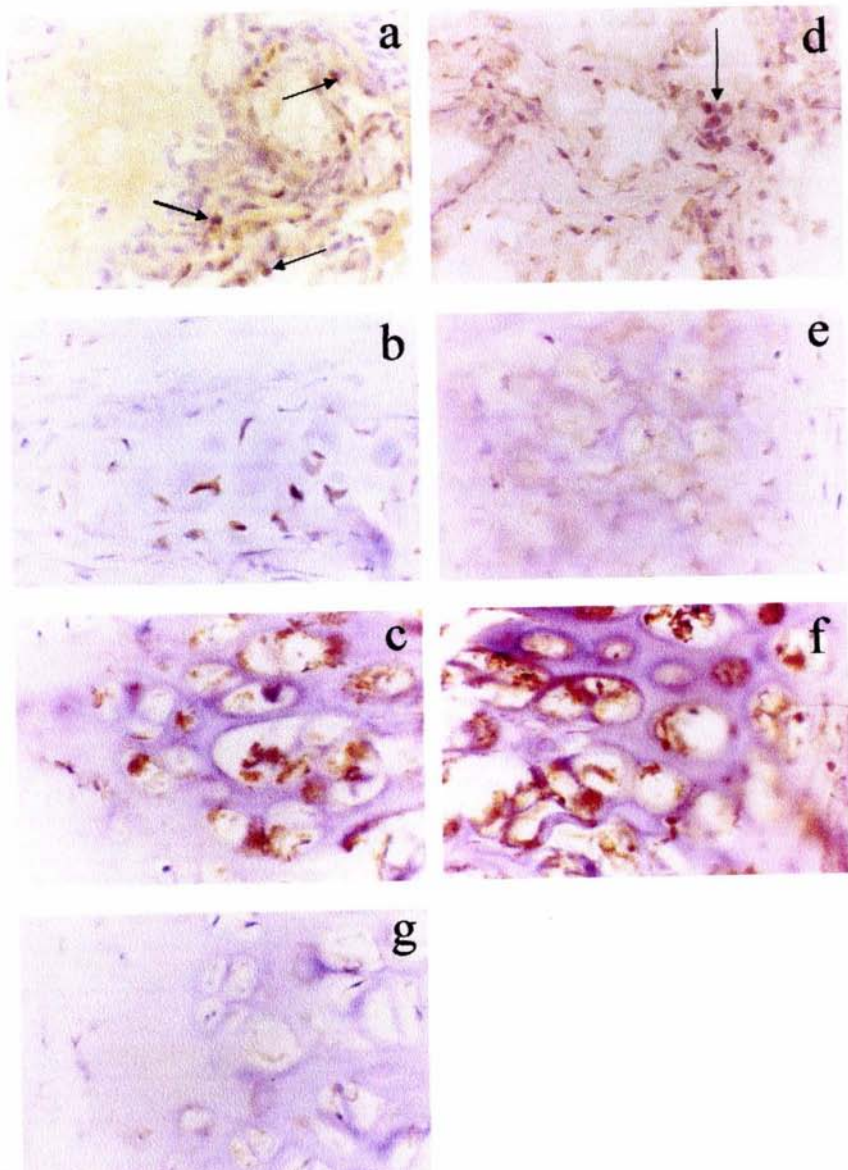
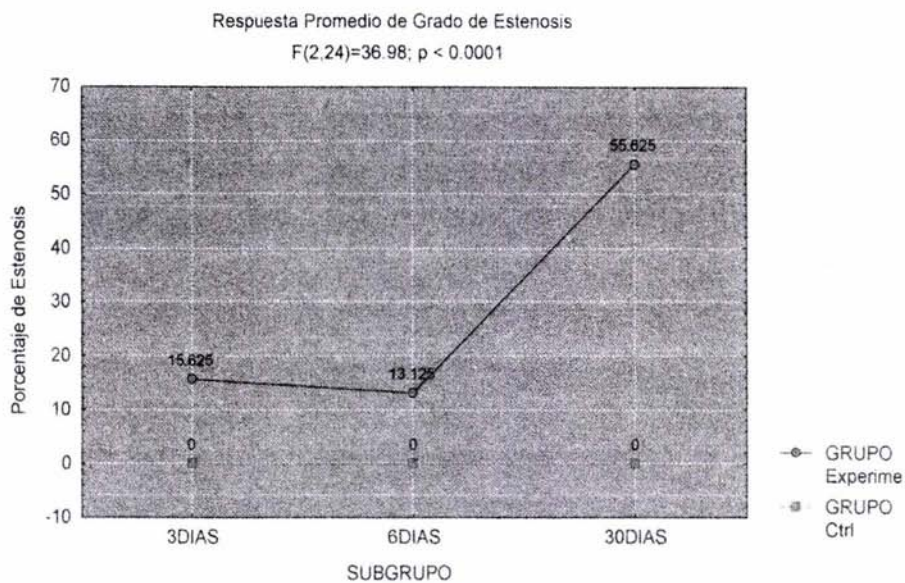


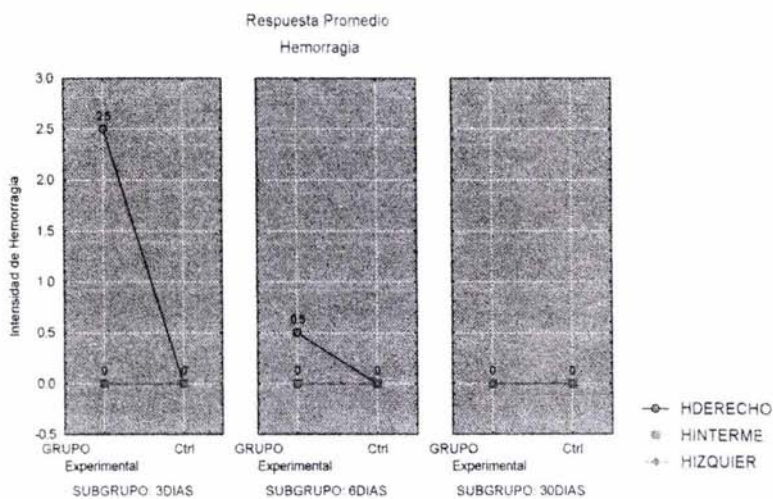
Figura 8. Inmunohistoquímica para metaloproteinas 2 (MMP-2) en el sitio de lesión subglótica del conejo, a los 3 (a-c) y 6 (d-f) días de evolución. Los fibroblastos y eosinófilos de la lámina propia (a,d, flechas) y los grupos isogénicos de condrocitos (c,f) fueron MMP-2 positivos, sobre todo a los 6 días de la lesión. Los condrocitos cercanos al periostio mostraron inmunorreactividad a los 3 días (b) pero no a los 6 días (e). El cartilago contralateral (g) y el control fueron negativos. X400.

Conejos control (grupo "sham"). El análisis histológicos de los cortes de subglotis en los animales del grupo control no identificó cambios anormales. La inmunohistoquímica reveló muy escasas células MMP-2 positiva en la lámina propia que por su morfología podrían corresponder a fibroblastos.

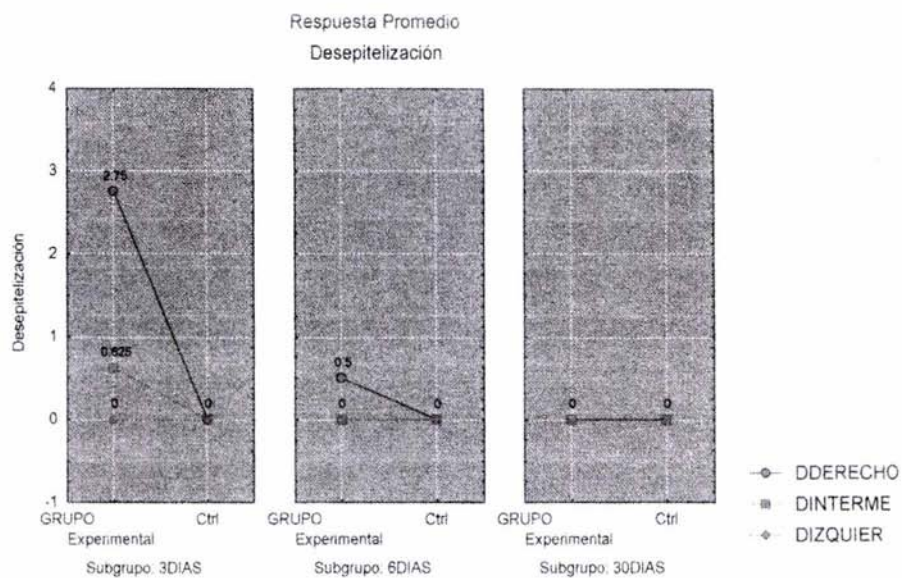
ANÁLISIS ESTADÍSTICO



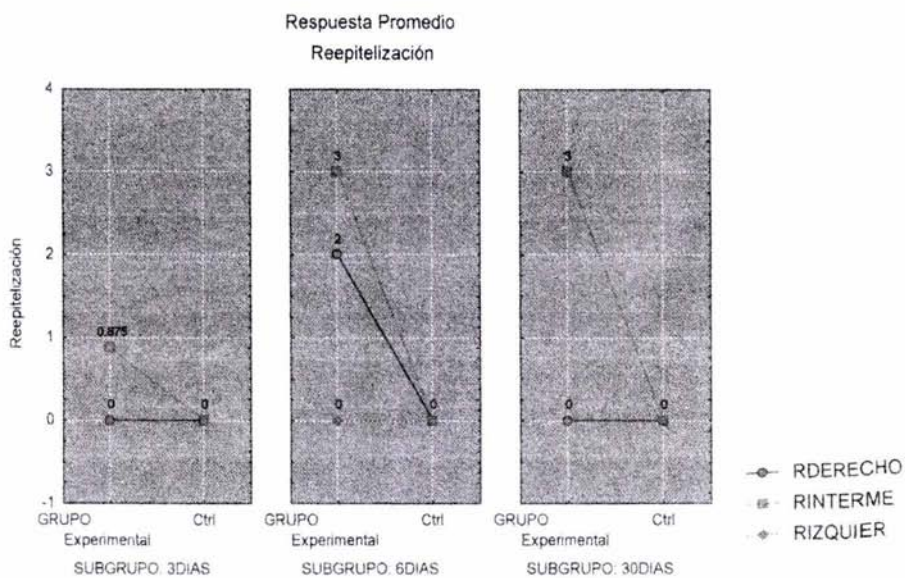
GRÁFICA 1. Se observa que el mayor grado de estenosis a los 30 días es estadísticamente significativa comparada con el grado menor de estenosis presentado a los 3 y 6 días después de la lesión. Nótese que entre 3 y 6 días no hay diferencia significativa.



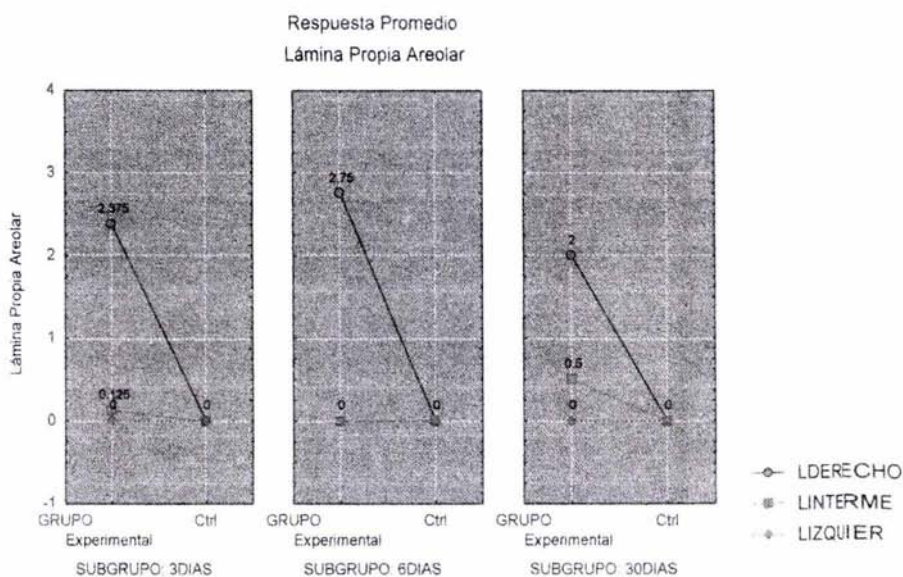
GRAFICA 2. El lado derecho lesionado mostró mayor hemorragia en los animales de 3 días de lesión, menor en el grupo de 6 días y no hubo en el grupo de 30 días. El lado no lesionado (izquierdo) nunca presentó hemorragia.



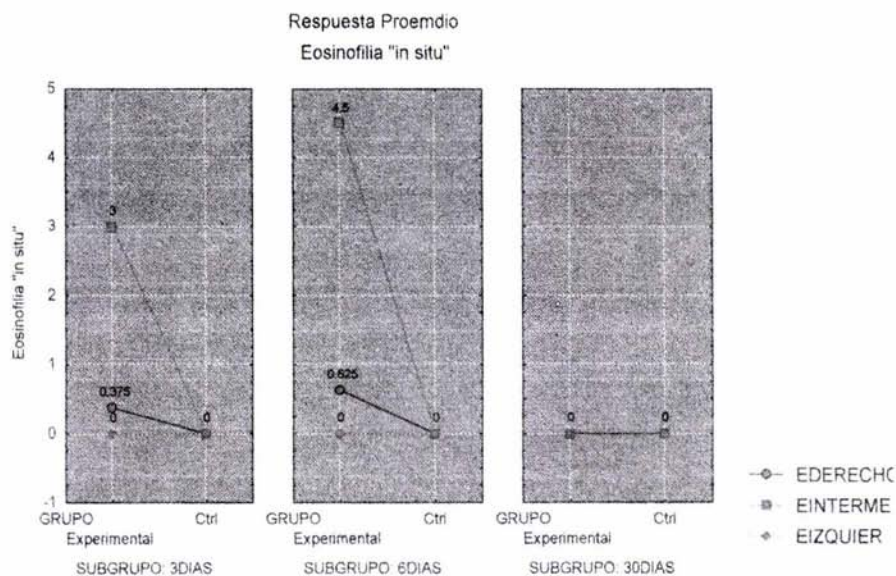
GRAFICA 3. La deseptelización es mayor en el sitio de lesión (derecho) del grupo de 3 días, disminuye en el grupo de 6 y no se presentó en el grupo de 30 días. El sitio cercano a la lesión (intermedio) hubo una discreta deseptelización en el grupo de 3



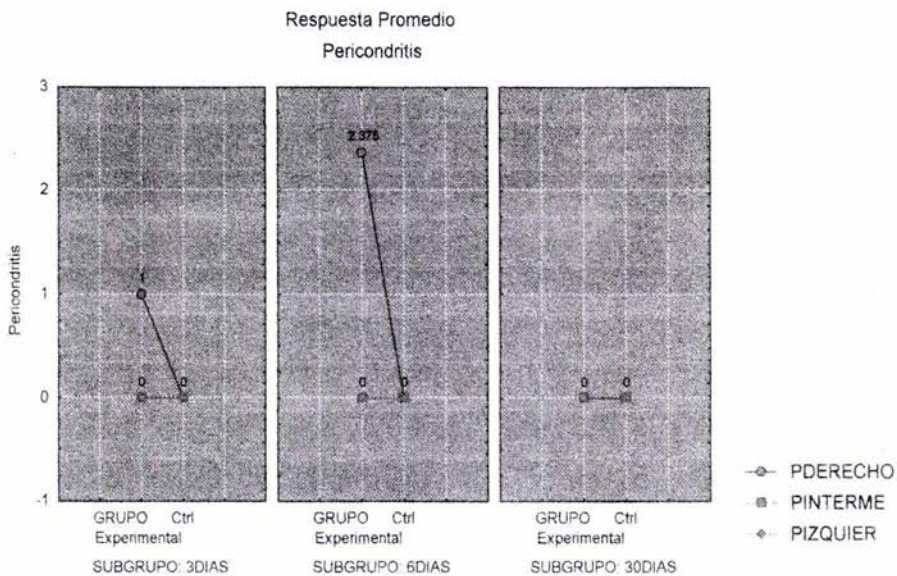
GRAFICA 4. Los grupos de 6 y 30 días mostraron un grado similar de reepitelización en sitio cercano a la lesión. En el sitio de la lesión, sólo el grupo de 6 días mostró reepitelización en menor grado.



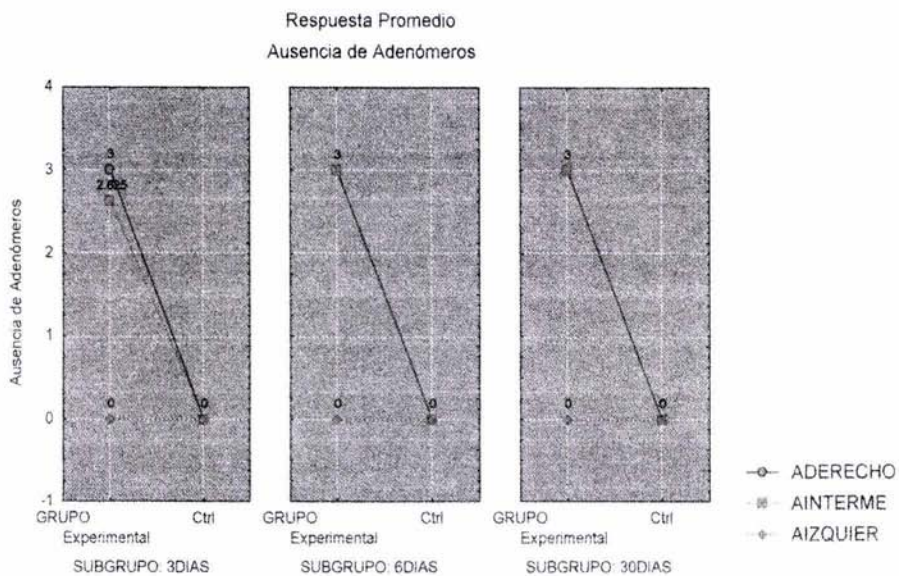
GRÁFICA 5. La lámina propia de aspecto areolar se presentó en los 3 grupos experimentales en el sitio de la lesión. En el sitio cercano (intermedio) a la lesión lo anterior se observó levemente a los 30 días.



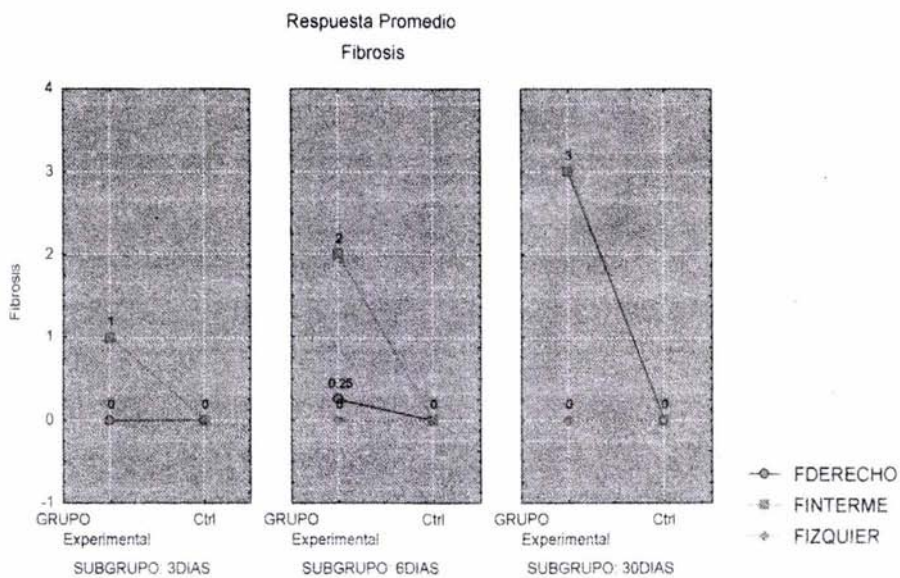
GRÁFICA 6. Es notable la presencia de eosinofilia tisular en los grupos de 3 y 6 días en el sitio cercano a la lesión (intermedio), mientras que en el sitio de lesión es marcadamente menor. A los 30 días, no hay eosinofilia.



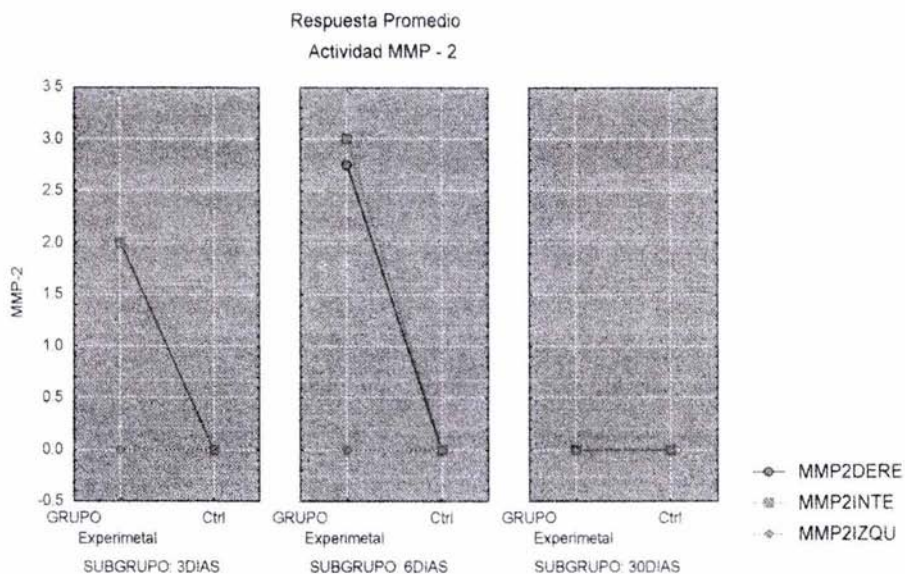
GRAFICA 7. La pericondritis se presentó en el sitio de lesión en el grupo de 3 y 6 días, pero más intensa en este último. En el grupo de 30 días, y en el sitio contralateral y cercano no se presentó



GRÁFICA 8. La ausencia de adenómeros se presentó en los tres grupos tanto en el sitio de lesión y en el cercano a la lesión.



GRÁFICA 9. La fibrosis se presentó en los 3 grupos, en un principio en el sitio cercano a la lesión y a los 30 días también en el sitio de lesión, lo cual se comenzó



GRÁFICA 10. La actividad de MMP-2 se encontró tanto en el sitio de lesión como en el cercano a la lesión en los grupos de 3 y 6 días, siendo más intensa en este último. A los 30 días no hubo actividad de MMP-2, ni en el grupo control ni en el sitio contralateral.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se observó que en los primeros 6 días posteriores a la lesión experimental de la subglotis del conejo hay una respuesta tisular caracterizada por la pérdida del epitelio normal y reepitelización con metaplasia escamosa o con un epitelio similar al respiratorio pero sin células caliciformes ni células ciliadas; por cambio del tejido conjuntivo fibroso laxo a tejido conjuntivo areolar de la lámina propia y de la submucosa con mayor vascularización y reparación con fibrosis temprana; por la presencia de un infiltrado eosinofílico de la lámina propia y del epitelio, con trans migración hacia la luz; por pérdida de los adenomeros mucoserosos; por pericondritis y por inmunorreactividad a la MMP-2, localizada en eosinófilos, fibroblastos y condrocitos. A los 30 días de la lesión, la respuesta tisular está representada por una notable fibrosis vascularizada que sustituye la lámina propia y la submucosa normales y donde no hay positividad a MMP-2. El grado I de estenosis subglótica se observó en los primeros 6 días (promedio =15.5% a los 3 días y 13.1% a los 6 días) y el grado II a los 30 días del estudio (promedio =55.6%).

Hasta ahora, existen pocos informes relacionados con la descripción de los cambios histopatológicos asociados con el desarrollo de estenosis subglótica. Los estudios publicados al respecto enfatizan la importancia de los cambios en el anillo cartilaginoso del cricoides y los señalan como el origen de la estenosis subglótica con la concomitante fibrosis submucosa.^(19,20) La observación histológica del cartílago dañado sugiere que las alteraciones del cricoides pueden ser debida a una combinación de inflamación dentro del cartílago con muerte de condrocitos y reemplazo de cartílago por fibrosis, con pérdida del soporte estructural y alteración en la forma del anillo.⁽¹⁰⁾ Adicionalmente, se ha demostrado en humanos que la pérdida de colágena I y del proteoglicano Agregan podría ser la causa de la disminución de la matriz cartilaginosa y de la sustitución de ésta por tejido fibroso.⁽³⁷⁾ En el presente trabajo demostramos que en los primeros 3 días y, sobre todo, a los 6 días de la lesión subglótica, algunas células fusiformes, probablemente fibroblastos, y eosinófilos presentes en la lámina propia así como los condrocitos expresan MMP-2. Esta es una enzima que degrada matriz extracelular y podría ser la responsable del daño cartilaginoso, del daño a la lámina propia y a la submucosa observada en los conejos estudiados por nosotros.

Estudios *in vitro* han sugerido que el balance entre la desepitelización, la degradación de la matriz extracelular y el daño al cartílago podría determinar si el daño es limitado o severo.⁽³⁵⁾ En este sentido, en el presente trabajo demostramos que en los primeros 6 días de la lesión subglótica hay una desepitelización notable con intentos de reepitelización y datos de pericondritis. Pensamos que la lesión no sólo se debe al trauma mecánico infligido sino que se suma la respuesta celular representada por el infiltrado y trans migración de eosinófilos, que junto con los fibroblastos y condrocitos, fueron MMP-2 positivos. Lo relevante de esto es que MMP-2 también interfiere con la proliferación, migración y adhesión del epitelio respiratorio.⁽³⁵⁾ El retraso en la reepitelización luminal, favorecería la instalación de un daño mayor a la matriz extracelular de la lámina propia y la submucosa con la

consecuente exposición del cartílago. Lo anterior condicionaría a una reparación excesiva por fibrosis y a la instalación de un grado mayor de estenosis en el sitio de la lesión. Interesantemente, la abolición de la actividad de MMP con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) o con el inhibidor GM6001, parece favorecer el crecimiento y la adhesión del epitelio respiratorio a una matriz formada por colágena tipo I.⁽³⁵⁾ Es probable que la reepitelización rápida y temprana contribuiría a detener el depósito de colágena y con ello, disminuir las probabilidades de estenosis.

Los estudios mencionados y los resultados aportados por nosotros son congruentes con lo observado en humanos. Gould y Young⁽²¹⁾ estudiaron laringes de niños de 22 a 40 semanas de gestación que habían sido intubados y quienes sobrevivieron desde unas pocas horas hasta más de 300 días. El daño agudo siempre se presentó y el 100% del epitelio de la subglotis se perdió en las primeras horas de intubación. La cicatrización de las úlceras inició después de unos pocos días, rápidamente progresó por el día 10 y, en muchos casos, se completó después de 30 días. Es interesante que la dinámica de reepitelización en estos niños sea muy similar a la de los conejos estudiados en el presente trabajo. Adicionalmente, debe mencionarse que en los niños, la región subglótica es especialmente proclive al daño por intubación endotraqueal por varias razones: el cartílago cricoides es el único sitio en la vía aérea superior que tiene un anillo cartilaginoso circular completo, previniendo la extensión hacia fuera de un edema traumático pero favoreciéndolo hacia la luz; el epitelio que delimita esta región es delicado y tiende al deterioro bajo el stress de un tubo; la submucosa subglótica contiene tejido areolar laxo que permite la instalación rápida y fácil de edema y, finalmente, la región subglótica es la porción más estrecha de la vía aérea pediátrica.^(20,21)

En nuestro estudio, es destacable la identificación de una eosinofilia tisular, localizada en la lámina propia y en el epitelio, así como la transmigración de eosinófilos hacia la luz. Hasta donde sabemos, esta reactividad de los eosinófilos no ha sido considerada como parte de la fisiopatología de la estenosis experimental en modelos animales o iatrogénica en el humano. La infiltración prominente de eosinófilos en las vías aéreas se considera como signo patognomónico del asma. El reclutamiento de eosinófilos en otras mucosas, su activación y liberación del contenido de sus gránulos subyace a la patogénesis de numerosas enfermedades alérgicas. Nosotros proponemos que los eosinófilos podrían jugar un papel fundamental en la fisiopatología de las estenosis subglótica experimental y iatrogénica, ya que se sabe que las células epiteliales de las vías aéreas, sobre todo cuando han sido dañadas, establecen una compleja red de mediadores como colágena tipo I y IV, TNF- α , IL-4 y eotaxina que promueve la infiltración y transmigración de eosinófilos.⁽³⁸⁾ La activación de los eosinófilos *in situ* podría incrementar el daño epitelial debido a la capacidad citotóxica de la proteína básica principal, de la peroxidasa del eosinófilo y de la proteína catiónica, contenidas en sus gránulos citoplásmicos.⁽³⁹⁾ Esto sugiere que uno de los efectos iniciales de la presencia de los eosinófilos en la subglotis de los conejos estudiados sería el retrasar la reepitelización, con las consecuencias antes mencionadas. El daño epitelial se ve favorecido, además, por el hecho de que los

eosinófilos interferirían con la proliferación y adhesión del epitelio respiratorio a la matriz extracelular, a través de la expresión y liberación de MMP-2.

Es ampliamente conocido que muchas enfermedades que cursan con eosinofilia tisular desarrollan fibrosis. El fundamento del proceso fibrótico asociado a los eosinófilos podría ser la capacidad de éstos de incrementar la tasa mitótica de los fibroblastos y la producción de glucosaminoglucanos y colágena.⁽⁴⁰⁾ Lo anterior está en concordancia con algunos resultados del presente trabajo, ya que identificamos una mayor cantidad de colágena, con base a la tinción con la técnica de Masson, desde los 3 días posteriores a la lesión subglótica, misma que se incrementó a los 6 días y, sobre todo, a los 30 días, cuando fue más evidente el desarrollo de estenosis. Más aún, observamos la presencia de células fusiformes aisladas y en cúmulos, que corresponden morfológicamente a fibroblastos. Recientemente, se ha demostrado *in vitro* que los eosinófilos liberan más proteína catiónica eosinofílica cuando se cultivan con fibroblastos y que dicho mediador provoca la contracción de un gel de colágena lo cuál podría ser relevante en la remodelación de la matriz extracelular dañada.⁽⁴¹⁾

La importancia de la interacción entre eosinófilos y fibroblastos en la reparación tisular y el desarrollo de fibrosis ha sido destacada en diversos estudios. La célula blanco y la célula efectora en la remodelación del tejido y la fibrosis son los fibroblastos. Estos son capaces de migrar hacia el área dañada, proliferar, producir matriz extracelular y diferenciarse a miofibroblastos y, finalmente, contraer la herida.⁽⁴²⁾ Los eosinófilos pueden afectar las propiedades de los fibroblastos y por lo tanto modular el proceso de remodelación tisular a través de la liberación de sus distintas proteínas básicas granulares y de una gran cantidad de citocinas.⁽⁴³⁾

La proteína catiónica de los eosinófilos inhibe la degradación de los proteoglicanos e incrementa la acumulación intracelular de glucosaminoglucanos en fibroblastos de pulmón humano.⁽⁴⁴⁾ Otros productos de los eosinófilos tienen propiedades fibrogénicas como la proteína básica principal que actúa sinérgicamente con IL-1 y TGF β para incrementar la producción de IL-6, mientras que la neurotoxina derivada de eosinófilos estimula la producción de fibroblastos.⁽⁴⁵⁾ Más aún, es bien conocido que los eosinófilos almacenan y liberan TGF β , el más potente factor fibrogénico, que cuando se agrega a fibroblastos, estimula su proliferación, la síntesis de colágena y la contracción de la matriz sintetizada.⁽⁴⁶⁾

En un artículo de revisión reciente se establece que los eosinófilos modulan las propiedades de los fibroblastos por otros factores de crecimiento tales como factor de crecimiento de fibroblastos-2, el factor de crecimiento nervioso el factor de crecimiento endotelial vascular.⁽⁴⁷⁾ La expresión de IL-4 e IL-13 por los eosinófilos promueve las funciones de los fibroblastos al estimular la síntesis de quimocinas fibroblásticas y proteínas de la matriz.⁽⁴⁷⁾

Hasta ahora se sabía que los eosinófilos contienen y liberan MMP-9 al ser estimulados por TNF α .⁽⁴⁸⁾ En el presente trabajo se demostró, hasta donde sabemos por primera vez, que los eosinófilos también expresan MMP-2. Por las propiedades enzimáticas de éstas proteínas (gelatinasas y colagenasas), enfatizamos que los eosinófilos participan en la modulación de la degradación y

formación de matriz extracelular y que esto puede ser relevante en el desarrollo de la estenosis subglótica observada en el presente trabajo.

Otro hallazgo constante en el sitio de la lesión y en su vecindad fue la presencia de numerosos vasos sanguíneos. Aunque no tenemos una explicación para este hecho, se ha sugerido que los eosinófilos podrían contribuir a la angiogénesis, fenómeno que tiene un papel central en el cáncer y la embriogénesis, pero que también sería un proceso importante en el establecimiento de la inflamación y en el desarrollo de la reparación tisular y la fibrosis.⁽⁴⁷⁾

Como se ha discutido arriba, en los resultados del presente trabajo destaca la presencia de eosinofilia tisular y de la transmigración de eosinófilos hasta la luz, así como la expresión de MMP-2 en los primeros 6 días después de la lesión experimental de la región subglótica del conejo, lo cual culminó con el desarrollo paulatino de estenosis. Hasta donde sabemos, esto no ha sido estudiado por otros y, por lo tanto, no se ha considerado como parte de la fisiopatología de la estenosis experimental o iatrogénica. La nueva información mencionada acerca de las propiedades funcionales de los eosinófilos, distintas a las de sus roles tradicionales, nos permite proponer que éstos leucocitos pueden actuar no sólo como causantes de daño sino también como células "reparativas". Este concepto requiere futuras investigaciones para entender que puede causar la transición de "reparar" a "dañar" y viceversa.

Por otro lado, el conocimiento más amplio de la modulación farmacológica de la función de los eosinófilos⁽⁴⁹⁾ y su aplicación en modelos experimentales como el del presente trabajo, permitirían descifrar la participación de estas células en los diferentes momentos de la lesión subglótica que lleva a la estenosis. De acuerdo a los resultados presentados, lo anterior sería particularmente importante en la primera semana posterior a la lesión. En ese mismo sentido está la posibilidad de experimentar con la inhibición selectiva de MMPs utilizando fármacos del tipo de las estatinas como marimastat, batimastat y simvastatina, que inhiben a MMP-2 y MMP-9⁽⁵⁰⁾ o doxiciclina, que tiene un efecto similar.

Es evidente que se requiere de mucho trabajo experimental para proponer una posibilidad terapéutica que prevenga o reduzca el desarrollo de estenosis subglótica. Sin embargo, nuestros resultados destacan la posible participación de dos actores no considerados hasta ahora: los eosinófilos y las MMP, los cuales son susceptibles de ser manipulados farmacológicamente, con la intención de reducir el daño proteolítico excesivo de la lámina propia y de la submucosa, independientemente del daño al cartílago, para evitar un desbalance prominente del proceso normal de síntesis y degradación de los componentes de la matriz extracelular, que lleva a un remodelamiento (reparación y fibrosis) excesivo de la matriz extracelular. El tratamiento antiproteasa y/o antieosinófilo debe ser instituido tempranamente en la historia natural de la estenosis subglótica, antes del desarrollo de una destrucción tisular extensa y de la fibrosis, es decir, en la primera semana posterior a la lesión.

CONCLUSIONES

1. El modelo experimental empleado en el presente trabajo fue exitoso en el desarrollo de estenosis subglótica en el conejo. El grado de estenosis provocado en los 3 grupos tuvo una diferencia significativa con un valor de $p < 0.0001$.
2. Los cambios tisulares importantes se observaron en la primera semana posterior a la lesión y se caracterizaron por desepitelización, eosinofilia tisular, trans migración de eosinófilos hacia la luz y pérdida de la histología normal de la mucosa.
3. Degradación temprana de la lámina propia y submucosa con inicio en la formación de fibrosis.
4. Expresión de metaloproteinasa-2 en eosinófilos, fibroblastos y condrocitos.
5. El proceso de fibrosis se acompaña de aumento en la vascularización y cambios epiteliales que no se normalizan hasta el día 30 posterior a la lesión.
6. Creemos que los cambios celulares y de MMP-2 descritos pueden ser más relevantes en el desarrollo de estenosis subglótica, aún cuando no existiera daño al cartílago.

PERSPECTIVAS

1. Los resultados del presente trabajo obligan a diseñar un estudio en el que se evalúe con mayor detalle los cambios más tempranos en la mucosa y el cartílago en la estenosis subglótica experimental.
2. La posible participación destacada de los eosinófilos y sus mediadores, entre ellos las MMPs, plantea posibilidades terapéuticas experimentales y, en un futuro, de aplicación en humanos.

APÉNDICE

Técnicas histológicas

Azul alciano pH 2.5⁽⁵¹⁾

1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
2. Colocar en solución de ácido acético al 3% por 3 minutos.
3. Teñir con solución de azul alciano por 30 minutos.
4. Lavar con agua corriente por 10 minutos.
5. Enjuagar con agua destilada.
6. Contrateñir con solución rojo rápido nuclear filtrado por 5 minutos.
7. Lavar con agua corriente por 1 minuto.
8. Deshidratar y limpiar con alcohol etílico al 95%, alcohol absoluto y xilol, 2 cambios cada uno por 2 minutos cada uno.
9. Montar con resina.

Resultados: mucosubstancias sulfatadas débilmente ácidas, sialomucinas y ácido hialurónico de color azul oscuro; núcleos de color rojo a rosa y citoplasma rosa pálido.

Azul Alciano pH 0.4⁽⁵²⁾

1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
2. Solución de ácido fosfato/hidroclorico por 3 minutos.
3. Teñir con solución de azul alciano por 30 minutos.
4. Lavar con agua corriente por 10 minutos.
5. Enjuagar en agua destilada.
6. Contrateñir con solución roja rápida nuclear por 5 minutos.
7. Lavar con agua corriente por 1 minuto.
8. Deshidratar y aclarar con alcohol etílico al 95%, alcohol absoluto y xilol, 2 cambios cada uno por 2 minutos cada uno.
9. Montar con resina.

Resultados: mucosubstancias sulfatadas fuertemente ácidas en azul; núcleos rosa a rojo y citoplasma rosa pálido.

Método de Wilder para fibras reticulares⁽⁵³⁾

1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
2. Oxidar en solución ácida de fosfomolibdico por 1 minuto.
3. Enjuagar abundantemente con agua corriente hasta desaparecer todos los residuos de solución amarilla.
4. Solución de nitrato uranio al 1% por 1 minuto.
5. Enjuagar en agua destilada por 10 a 20 segundos.
6. Solución de plata amoniacal por 1 minuto.
7. Sumergir rápidamente en alcohol 95%.
8. Solución reductora por 1 minuto.
9. Enjuagar con agua destilada.
10. Contrastar con cloruro de oro al 0.2% por 1 minuto.

11. Enjuagar con agua destilada.
12. Solución de tiosulfato de sodio por 1 minuto.
13. Lavar con agua corriente.
14. Contrateñir con solución rojo rápido nuclear por 5 minutos.
15. Enjuagar bien con agua destilada.
16. Deshidratar y aclarar con alcohol etílico al 95%, alcohol absoluto y xilol 2 cambios cada uno, 2 minutos cada uno.
17. Montar en resina.

Resultados: fibras reticulares en negro, colágena en rosa y otros elementos tisulares en rojo.

Hematoxilina y eosina de Mayer

1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
2. Teñir en hematoxilina de Mayer por 15 minutos.
3. Lavar en agua corriente por 15 minutos.
4. Colocar en agua destilada.
5. Diferenciar en alcohol ácido al 1%.
6. Colocar en agua amoniacal débil.
7. Lavar con agua corriente por 10 minutos.
8. Colocar en alcohol etílico al 80% por 1 a 2 minutos.
9. Contrateñir con solución de eosina por 2 minutos.
10. Deshidratar y aclarar a través de dos cambios cada uno de alcohol etílico al 95%, alcohol etílico absoluto y xilol 2 minutos cada uno.
11. Montar en resina.

Resultados: núcleo en azul, citoplasma rosa a rojo y otras estructuras tisulares rosa a rojo.

Ácido periódico de Schiff (PAS)⁽⁵⁴⁾

1. Desparafinar e hidratar a agua.
2. Oxidar en solución de ácido periodico por 5 minutos.
3. Enjuagar en agua destilada.
4. Colocar en reactivo de Schiff por 15 minutos.
5. Lavar en agua corriente tibia por 10 minutos.
6. Contrateñir con solución de hematoxilina de Mayer por 15 minutos o de Harris por 6 minutos.
7. Lavar en agua corriente por 16 minutos.
8. Deshidratar y aclarar con alcohol etílico al 95%, alcohol absoluto y xilol 2 cambios, 2 minutos cada uno.
9. Montar con resina.

Resultados: glucógeno, mucina y algunas membranas basales en rojo o púrpura; núcleos en azul.

Tricómico de Masson.⁽⁵⁵⁾

1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
2. Tratar con solución de fijación de Bouin si las muestras están fijadas en formol por 1 hora a 56°C o toda la noche a temperatura ambiente. Omitir el paso si los tejidos fueron fijados en solución de Bouin inicialmente.
3. Dejar secar a temperatura ambiente por 10 minutos.
4. Lavar con agua corriente hasta que se aclaren. Enjuagar con agua destilada.
5. Teñir con solución de hematoxilina hierro de Weigert por 10 minutos.
6. Lavar con agua corriente por 10 minutos. Enjuagar con agua destilada.
7. Teñir con solución de fuchsina ácida escarlata Biebrich por 15 minutos. Enjuagar con agua destilada.
8. Diferenciar en solución ácida fosfomolibdic-fosfotungstico por 10 a 15 minutos. Checar para ver que la colágena no está roja.
9. Contrateñir con solución de anilina azul por 5 a 10 minutos o solución verde brillante por 1 minuto. Enjuagar con agua destilada.
- 10a. Si se usa la solución de anilina azul, diferenciar en agua acética al 1% 3 o 5 minutos.
- 10b. Si se uso la solución de verde brillante, diferenciar con solución de ácido fosfotungstico al 5% por 15 minutos.
10. Deshidratar y aclarar con alcohol etílico al 95%, alcohol absoluto y xilol 2 cambios cada uno por 2 minutos cada uno.
11. Montar en resina.

Resultados: músculo, citoplasma y queratina en rojo, colágena azul o verde y núcleos en negro

Inmunohistoquímica para metaloproteinasas 2.

1. Los cortes por congelación de 6 µm de grosor fueron adheridos a portaobjetos Superfrost® (Shandon, Inc., Pittsburg, PA), se dejaron secar al aire durante 20 min y se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 1 h o con acetona absoluta durante 20 min.
2. Se bloqueó la peroxidasa endógena en cada preparación adicionando peróxido de hidrógeno al 1 % en metanol, durante 30 min a temperatura ambiente y en cámara húmeda.
3. Se bloquearon los receptores Fc con IgG normal de ratón (Sigma) y los sitios inespecíficos con PBS 0.1 M/Triton X 100 al 0.1 %/ASB 1 %, 1 h a temperatura ambiente y en cámara húmeda.
4. Se incubaron los cortes durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda con dos diferentes diluciones (1:50 y 1:100) del conjugado monoclonal biotinilado anti-MMP-2 o con el anti-MMP-9 (IgG de ratón (NeoMarkers). Al día siguiente, se lavaron las preparaciones tres veces por 5 min con PBS y se incubaron con el complejo estreptavidina-peroxidasa diluido 1:100 en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron las preparaciones tres veces por 5 min con PBS.
5. Para revelar la unión de los anticuerpos, los cortes se incubaron en una solución de diaminobenzidina (DAB)-peróxido, para lo cual se mezclaron 5

mg de DAB con 10 ml de PBS y se adicionaron 300 μ l de H₂O₂ al 3 %. La incubación en esta solución fue durante 10 min, hasta que se produjo coloración. Posteriormente, se lavaron las preparaciones en agua corriente y se deshidrataron en etanol 95 % con tres cambios de 5 min c/u.

6. Se contratiñeron con hematoxilina de Harris y se montaron con resina Permout.

Histopatología e inmunohistoquímica del sitio de la lesión subglótica experimental en conejos en los diferentes tiempos estudiados

No. De conejo	Días de lesión	Hemorragia	Desepitelización	Reepitelización	Lámina propia areolar	Eosinofilia "in situ"	Pericondritis	Ausencia de adenomas	Fibrosis	+ a MMP2
1	3	++	+++		++		+	+++		++
2	3	+++	+++		+++	+	++	+++		++
3	3	+++	++		+++		+	+++		++
4	3	++	+++		++		+	+++		++
5	3	+++	+++		++	+	+	+++		++
6	3	+++	+++		++	+		+++		++
7	3	++	+++		+++		+	+++		++
8	3	++	++		++		+	+++		++
1	6	+	+	++	+++	+	+++	+++		+++
2	6			++	+++	+	++	+++		+++
3	6	+		++	+++	+	++	+++	+	+++
4	6	+		++	+++		++	+++	+	++
5	6		+	++	++		+++	+++		+++
6	6			++	+++	+	+++	+++		++
7	6	+	+	++	+++		++	+++		+++
8	6		+	++	++	+	++	+++		+++
1	30				++			+++	+++	
2	30				++			+++	+++	
3	30				++			+++	+++	
4	30				++			+++	+++	
5	30				++			+++	+++	
6	30				++			+++	++	
7	30				++			+++	+++	
8	30				++			+++	+++	
1	3 C									
2	3 C									
1	6 C									
2	6 C									
1	30C									
2	30C									

Histopatología e inmunohistoquímica del sitio cercano a la lesión subglótica experimental en conejos en los diferentes tiempos estudiados

No. De conejo	Días de lesión	Hemorragia	Desepitelización	Reepitelización	Lámina propia areolar	Eosinofilia "in situ"	Pericondritis	Ausencia de adenomas	Fibrosis	+ a MMP2
1	3		+			+++		+++	+	++
2	3			+		+++		+++	+	++
3	3			+	+	+++			+	++
4	3			+		+++		+++	+	++
5	3		+	+		+++		+++	+	++
6	3		+	+		+++		+++	+	++
7	3		+	+		+++		+++	+	++
8	3		+	+		+++		+++	+	++
1	6			+++		+++		+++	++	+++
2	6			+++		++		+++	++	+++
3	6			+++		++		+++	++	+++
4	6			+++		++		+++	++	+++
5	6			+++		++		+++	++	+++
6	6			+++		++		+++	++	+++
7	6			+++		++		+++	++	+++
8	6			+++		++		+++	++	+++
1	30			+++	+			+++	+++	
2	30			+++	+			+++	+++	
3	30			+++				+++	+++	
4	30			+++	+			+++	+++	
5	30			+++	+			+++	+++	
6	30			+++				+++	+++	
7	30			+++				+++	+++	
8	30			+++				+++	+++	
1	3 C									
2	3 C									
1	6 C									
2	6 C									
1	30C									
2	30C									

+ = mínimo; ++ = moderado; +++ = intenso. Sin marca = negativo

Debido a que no se identificaron cambios histológicos y de inmunorreactividad a MMP-2 en el sitio contralateral a la lesión en los diferentes tiempos estudiados, no se representan en una tabla.

REFERENCIAS

1. Eliashar R, Eliachar I, Gramlich T, et al. Improved canine model for laryngotracheal stenosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122:84-89.
2. Walander a. The mechanism of origin of congenital malformation of the larynx. *Acta Otolaryngol* 1955;45:426-432.
3. Smith II, Bain AD. Congenital atresia of the larynx: a report of nine cases. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1965;74:338-340.
4. Cotton RT, Richardson MA, Seid AB. Management of combined advanced glottic and subglottic stenosis in infancy and childhood. *Laryngoscope* 1980;91:221-227.
5. Holinger PH, Brown WT. Congenital webs, cyst, laryngoceles and other anomalies of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1967;76:744-.
6. Cotton RT, Myer CM. Contemporary surgical management of laryngeal stenosis in children. *Am J Otolaryngol* 1984;5:360-366.
7. Morimitsu T, et al. Congenital cricoid stenosis. *Laryngoscope* 1981;91:1356-1360.
8. Cotton RT, Richardson MA: Congenital laryngeal anomalies. *Otolaryngol Clin North Am* 1981;14:203-207.
9. Ingrams D, Ashton P, Dhingra J, et al. Slow-release 5-fluorouracil and triamcinolone reduces subglottic stenosis in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109:422-424.
10. Mankarious L, Cherukupally, Adams A. Gross and histologic changes in the developing rabbit subglottis in response to a controlled depth of injury. *Otolaryngol Head Neck Sur* 2002;127:442-447.
11. Nicklaus P, Crysedale W, conley S, et al. Evaluation of neonatal subglottic stenosis: a 3-year prospective study. *Laryngoscope* 1990;100:1185-1190.
12. Jewett B, Cook R, Johnson K, et al. Subglottic stenosis: correlation between computed tomography and bronchoscopy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999;108:837-841.
13. Marshak G, Grundfast KM. Subglottic stenosis. *Pediatr Clin North Am* 1981;28:941-948.
14. Doolin E, Strande L, Tsuno K, et al. Pharmacologic inhibition of collagen in an experimental model of subglottic stenosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1998;107:275-279.
15. Weymuller EA: Laryngeal injury from prolonged endotracheal intubation. *Laryngoscope* 1988;98:1-5.
16. Supance J. Antibiotics and steroids in the treatment of acquired subglottic stenosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1983;92:377-382.
17. Healy G. An experimental model for the endoscopic correction of subglottic stenosis with clinical applications. *Laryngoscope* 1982;92:1103-1115.
18. Whited R. A prospective study of laryngotracheal sequelae in long-term intubation. *Laryngoscope* 1984;94:367-369.
19. Quiney R, Gould S. Subglottic stenosis: a clinicopathological study. *Clin Otolaryngol* 1985;10:315-327.
20. Gould S, Graham J. Long-term pathological sequelae of neonatal endotracheal intubation. *J Laryngol Otol* 1989;103:622-625.

21. Gould S, Young M. Subglottic ulceration and healing following endotracheal intubation in neonates: morphometric study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992;101:815-820.
22. Cotton R. Pediatric laryngotracheal stenosis *J Pediatr Surg* 1984;19:699-704.
23. Cotton R, Gray S, Miller R. Update of the Cincinnati experience in pediatric laryngotracheal reconstruction. *Laryngoscope* 1989;99:111-6.
24. Shapshay S, Beamis J, Hybels et al. Endoscopic treatment of subglottic and tracheal stenosis by radial laser incision and dilation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1987;96:661-664.
25. Livingston G, Schild J. Lathyrogenic agents as therapy for subglottic stenosis- a pilot study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1987;97:446-451.
26. Richards W, Doolin E, Miginsky, et al. Pharmacologic inhibition of scar contracture of intracardiac prosthetic patches *J Surg Res* 1984;37:33-42.
27. Correa A, Reinisch L, Sanders D, et al. Inhibition of subglottic stenosis with mitomycin-c in the canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999;108:1053-1060.
28. Borowiecky B, Croft C. Experimental animal model of subglottic stenosis. *Ann Otol* 1977;86:835-840.
29. Loewen M, Walner D. Dimensions of rabbit subglottis and trachea. *Lab Anim* 2001;35:253-256.
30. Bean J, Verwoerd V, Verwoerd C. Injury- and age-linked differences in wound healing and stenosis formation in the subglottis. *Acta Otolaryngol* 1995;115:317-321.
31. Matrisian L. The matrix degrading metalloproteinases. *BioEssays*.1992;14:455-463.
32. Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J of Cell Biochem*.1993;53:288-95.
33. Selman M, Montaña M, Ramos C, et al. Tobacco smoke-induced lung emphysema in guinea pigs is associated with increased interstitial collagenase. *Am J Physiol*.1996;15:L7434-7443.
34. Pardo A, Selman M. Matrix extracelular. En *Biología Celular y Molecular*. Pearson Educación. 1ª. Edición. 2003 538-540.
35. Sigurdson L, Sen T, Hall L, et al. Possible impedance of luminal reepithelialization by tracheal cartilage metalloproteinases. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:197-200.
36. León M, Villegas A. "Manual de manejo y anestesia en el conejos como modelo quirúrgico en docencia". Facultad de Medicina, UNAM. 2004.
37. Mankarius L, Adams A, Pires V. Patterns of cartilage structural protein loss in human tracheal stenosis. *Laryngoscope* 2002; 112:1025-1030.
38. Kato Y, Fujisawa T, Shibano M et al. Airway epithelial cells promote transmigration of eosinophils in a new three-dimensional chemotaxis model. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:889-897.
39. Frigas E, Motojima S, Gleich GJ. The eosinophilic injury to the mucosa of the airway in the pathogenesis of bronchial asthma. *Eur Respir J Suppl* 1991; 13:123s-135s.

40. Birkland TP, Cheavens MD, Pincus SH. Human eosinophils stimulate DNA synthesis and matrix production in dermal fibroblast. *Arch Dermatol Res* 1994; 286:312-318.
41. Zagai U, Skold CM, Trulsson A, Venge P, Lundahl J. The effect of eosinophils on collagen gel contraction and implications for tissue remodeling. *Clin Exp Immunol* 2004; 135:427-433.
42. Mauch C, Krieg T. Fibroblast-matrix interactions and their role in the pathogenesis of fibrosis. *Rheum Dis Clin North Am* 1990;16:93-107.
43. Smith S, Levi F. Mast cell eosinophil-fibroblast cross-talk in allergic inflammation. In: Robinson DS, editor. *Asthma and allergic diseases*. London: Karger Press, 2000: 81-92.
44. Hernnas J, Sarnstrand B, Lindroth P, et al. Eosinophils cationic protein alters proteoglycan metabolism in human lung fibroblast cultures. *Eur J Cell Biol* 1992; 59:352-363.
45. Rochester C, Ackerman S, Sheng T, et al. eosinophil fibroblast interactions granule major basic protein interacts with interleukin 1 and transforming growth factor -beta in the stimulation of lung fibroblast interleukin 6- type cytokine production. *J Immunol* 1996;156:4449-4456.
46. Levi-Schaffer F, Garbuzenko E, Rubin A, et al. Human eosinophils regulate human lung and skin-derived fibroblast properties in vitro: a role for transforming growth factor-(beta). *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:9660-9665.
47. Munitz A, Levi-Schaffer F. Eosinophils: "new" roles for "old" cells. *Allergy* 2004; 59:268-275.
48. Schwingshackl A, Duszyk M, Brown N, Moqbel R. Human eosinophils release matrix metalloproteinase-9 on stimulation with TNF-(alpha). *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:983-989.
49. Giembycz MA, Lindsay MA. Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol Rev* 1999; 51:213-336.
50. Porter KE, Turner NA. Statins for the prevention of vein graft stenosis: a role for inhibition of matrix metalloproteinase-9. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 120-126.
51. Lev R, Spincer S. Specific staining of sulfate groups with alcian blue at low pH. *J Histochem Cytochem* 1964;12:309.
52. Jonson W, Graham J, Helwig E. Histochemistry of the acid mucopolysaccharides in cutaneous calcification. *J Invest Derm* 1964;42:215.
53. Wilder H. An improved technic for silver impregnation of reticulum fibers. *Amer J Path.* 1935;11:817.
54. McManus J. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain technol.* 1948;23:99.
55. Masson P. Trichrome stainings and their preliminary techniques. *J Tech Met.* 1929;12:75.