

“COMPARACIÓN DEL USO DE LA MEZCLA DE ÁCIDO HIALURÓNICO Y COLÁGENA POLIVINIL PIRROLIDONA CONTRA MITOMICINA C COMO MODULADORES DE LA CICATRIZACIÓN EN EL TRAUMA DE CUERDAS VOCALES DE CONEJO”

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y
CUELLO**

P R E S E N T A:

DR. FERNANDO MANUEL ARREDONDO DEL BOSQUE

**BAJO LA DIRECCIÓN DE
M. C. J. RAUL OLMOS ZUÑIGA**

CO-ASESORES

DR. ROGELIO JASSO VICTORIA

DR. ANTONIO SODA MERHY



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

M. en C. RAÚL OLMOS ZÚÑIGA
ASESOR DE TESIS
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA EXPERIMENTAL INER

DR. ANTONIO SODA-MERHY
CO-ASESOR DE TESIS Y PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE
OTORRINOLARINGOLOGIA INER

DR. ROGELIO JASSO-VICTORIA
CO-ASESOR DE TESIS
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA EXPERIMENTAL INER

DR. MIGUEL GAXIOLA-GAXIOLA
CO-ASESOR DE TESIS
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA EXPERIMENTAL INER

M. en C. AVELINA SOTRES-VEGA
CO-ASESOR DE TESIS
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA EXPERIMENTAL INER

QFB. MATILDE BALTAZARES LIPP
CO-ASESOR DE TESIS
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA EXPERIMENTAL INER

DEDICATORIA

A mi tío David, por todo lo que él sabe que significó. Va por ti.

A mis Padres, que gracias a su comprensión, paciencia y amor me han hecho la persona que hasta el momento soy. Por el ejemplo a seguir que han marcado dentro de mi desarrollo. Gracias por el apoyo que me han dado en todas las decisiones durante mi vida.

A mi hermana, Juan Carlos, María y Rodrigo; al ser parte de mi familia, y continuar siempre estando conmigo en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A todo el equipo de el laboratorio de cirugía experimental en especial a M. en C. Raúl Olmos y al Dr. Rogelio Jasso

A Myriam, por lo que ella sabe que significa.

AL Dr. Antonio Soda Merhy por su dedicación a la enseñanza

Al Dr. Mario Hernández Palestina por el ejemplo a seguir como persona

A todos mis amigos que han formado parte de mi formación como persona y como médico: Pancho, Muñiz, Tiwi, Víctor, Pepin, Hutch, Javier, Teresa, Jessica, María José, Hugo, Lucía, Zermeño, San Miguel, Gamba, Chente, Emanuel y demás.que se pueden haber olvidado sin intención.

A mis compañeros de residencia: Nacho , Luis Pedro, Eloisa, Carlos, Santillán, Leonardo, Yuria, Ivette, Nidia, Rosd Berto, Iohannan, Schobert, Daniel, Mario, Ingeborg, Gabriel, Laura, Karla, Jaime, Karen. A todos los adscritos que han dado su apoyo durante esta formación. Dr. Ramírez, Dr. Dávila, Dr. Tona, Dr. Jiménez, Dra. Sanchez, Dra. Cristerna, Dr. Bravo.

INDICE

DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
RESUMEN	VI
INDICE	1
I. INTRODUCCIÓN	3
II. JUSTIFICACIÓN	6
III. HIPOTESIS	6
IV. OBJETIVOS	6
1. Objetivo general	
2. Objetivo específico	
V. MATERIAL Y METODOS	7
1. Recursos	7
2. Animales de experimentación	8
2.1 Criterios de inclusión	
2.2 Criterios de exclusión	
2.3 Criterios de eliminación	
3. Grupos de estudio	9
4. Anestesia	10
5. Producción de la lesión	11
6. Tratamiento	11
7. Evaluación	12
7.1 Clínica	12
7.2 Endoscópica	12
7.3 Microscópica	13
7.4 Bioquímica	13
VI. RESULTADOS	14
1. Clínicos	14
2. Endoscópicos	15
3. Microscópicos	18
4. Bioquímicos	21
VII. DISCUSIÓN	22
VIII. CONCLUSIÓN	25

IX. CUADROS	26
X. GRÁFICAS	28
XI. FIGURAS	29
XII. BIBLIOGRAFÍA	33

RESUMEN

“Comparación del uso de la mezcla de ácido hialurónico y colágena-polivinil pirrolidona contra mitomicina C como moduladores de la cicatrización en el trauma de cuerdas vocales de conejo”

Introducción. La presencia de sinequias por la formación de fibrosis excesiva durante su cicatrización de las cuerdas vocales, puede afectar el funcionamiento normal de las mismas, por lo que se puede pensar que esta fibrosis se puede evitar con la aplicación de moduladores cicatrizales como la mezcla de ácido hialurónico con colágena-polivinil pirrolidona (AH-CPVP) o mitomicina C (MC) en las cuerdas vocales traumatizadas.

Objetivo. Evaluar los cambios endoscópicos, microscópicos, bioquímicos e inmunohistoquímicos de la cicatrización de las cuerdas vocales traumatizadas de conejo posterior a la aplicación tópica de una mezcla de AH-CPVP o MC en el sitio de la lesión.

Material y métodos. En 42 conejos se produjo un trauma de cuerdas vocales, se les aplicó 3 moduladores de la cicatrización posterior a la realización del trauma y se evaluó sus cicatrización en diferentes tiempos de acuerdo al grupo de estudio: Grupo I (n=6): Grupo control, Grupo II (n=6) Aplicación de Solución Salina Fisiológica (SSF) con fin de estudio al día 10, Grupo III (n=6): SSF y fin de estudio al día 21, Grupo IV (n=6): Aplicación de mitomicina C con fin de estudio al día 10. Grupo V (n=6): Tratamiento con MC y fin de estudio al día 21. Grupo VI (n=6) Tratamiento con AH-CPVP con fin de estudio 10 días. Grupo VII (n=6) AH-CPVP y fin de estudio 21 días. A todos los animales se les evaluó de forma clínica, endoscópica, microscópica y bioquímica su cicatrización.

Resultados. Endoscópicamente los grupos tratados con la mezcla de AH-CPVP mostraron mejor cicatrización y menor formación de sinequias que los otros grupos (ANDEVA, TUKEY, Kruskal-Wallis, $p < 0.01$). Microscópicamente también presentaron menor inflamación y una disposición de fibras de colágena delgadas y organizadas vs los otros grupos de estudio (ANDEVA, TUKEY, Kruskal-Wallis $p < 0.01$) y esto correlacionó con el estudio bioquímico, el cual reveló, que la menor cantidad de colágena por gramo de tejido se presentó en los grupos VI y VII (ANDEVA, TUKEY, $p < 0.01$).

Conclusión. La aplicación de la mezcla de AH-CPVP, inmediatamente después de la producción de un trauma de cuerdas vocales en conejos, mejora su cicatrización, ya que disminuye la inflamación, formación de fibras colágena y de sinequias.

Palabras Clave: Trauma de cuerda vocal, ácido hialurónico (AH), colágena polivinil pirrolidona (CPVP), mitomicina C (MC), concentración de colágena, solución salina fisiológica (SSF)

INTRODUCCIÓN.

La laringe es un órgano con funciones de protección de la vía aérea, respiración, fonación y deglución y se divide en supraglotis, glotis y subglotis.

La supraglotis contiene a la epiglotis, los pliegues ariepiglóticos, las bandas ventriculares, y los ventrículos.

La glotis es el espacio que se encuentra entre las cuerdas vocales. Estas se insertan anteriormente en el cartílago tiroides y posteriormente en los cartílagos aritenoides. Tiene una forma triangular, que se lateraliza en la respiración y se medializa en la fonación.

La histología de la laringe la podemos dividir en epitelio respiratorio que reviste tanto la supraglotis y la subglotis; en cuanto al borde libre de las cuerdas vocales se observa un epitelio plano escamoso estratificado no queratinizado. Por debajo de este epitelio se encuentran tres capas que conforman la lámina propia: superficial (espacio de Reinke), media y profunda, que se diferencian por las concentraciones de elastina y colágena. Por último por debajo de la lámina propia se encuentra ya sea el ligamento vocal o el proceso vocal respectivamente (1, 2).

El trauma glótico, dependiendo de su extensión y cicatrización, puede formar fibrosis que finalice en sinequias, las cuales afectan la función de la laringe para mantener una vía aérea funcional y conservar una función fonatoria normal (2).

La consecuencia final del trauma glótico es la mala cicatrización de las cuerdas vocales, caracterizada por un incremento en la densidad de la colágena completamente desorganizada, que produce cambios biomecánicos negativos que ocasionan alteraciones en la fisiología de la laringe (4,5).

Recientemente algunos investigadores han estudiado la cicatrización de las cuerdas vocales que sufren un trauma glótico iatrogénico y observaron que en la fase aguda de la cicatrización de las mismas se inician los depósitos de colágena madura y la fibrosis entre los días 7 y 10 posteriores al trauma, finalizando con una cicatriz completamente fibrótica al día 21 posterior al trauma (5).

Dado que el proceso cicatrizal es una secuencia de eventos coordinados que nos llevan a la formación tejido nuevo (6), se puede pensar que el alterar o manipular la etapa aguda de la cicatrización de las cuerdas vocales pueden llegar a tener un impacto significativo en la formación de fibrosis y de sinequias posteriores al trauma glótico.

Existen medicamentos como el ácido hialurónico (AH) (7), colágena-polivinilpirrolidona (CPVP) (8-10) y la mitomicina C (11,12) que han demostrado ser buenos moduladores de la cicatrización en órganos extralaríngeos.

El AH es un componente de la matriz extracelular de la herida fetal, el cual modula la fibrogénesis de colágena durante el proceso de cicatrización de las heridas fetales (7) y favorece la regeneración, así como la reparación tisular con menor inflamación y fibrosis. Este medicamento ha sido usado con buenos resultados para la disminución de procesos fibróticos en el tratamiento de la osteocondritis de rodilla (13), regeneración de las heridas de la mucosa nasal (14), para prevenir la formación de adherencias intrabdominales postquirúrgicas (15) y como expansor tisular en la piel (16). También se ha observado en estudios experimentales que este medicamento evita las estenosis traqueales (17).

La CPVP es un fármaco formado por una mezcla de colágena porcina del tipo I y polivinil-pirrolidona, el cual actúa como remodelador de procesos fibrosos (8-10) y se ha utilizado para el tratamiento de las cicatrices queloides e hipertróficas, en fibrosis dérmicas, de tendones y en tráquea, produciendo disminución de los síntomas y el volumen de la cicatriz, así como desaparición del infiltrado inflamatorio y restablecimiento de la arquitectura dérmica normal de las cicatrices tratadas con ésta (18-20).

En otros estudios experimentales bioquímicamente se evaluó el uso de una mezcla de AH y CPVP en la cicatrización de resecciones traqueales y se observó menor concentración de colágena por gramo de tejido traqueal en la cicatriz formada cuando se utilizó la mezcla, que cuando estos fármacos se utilizaron por separado (21).

La mitomicina C es un antibiótico antineoplásico producido por el *Streptomyces caespitosus* que inhibe la proliferación y actividad de los fibroblastos evitando la fibrosis y formación de cicatriz (11,12). Este fármaco ha mostrado buenos resultados cuando se usa como un tratamiento adyuvante después de la realización de un gran número de procedimientos oftálmicos para disminuir la recurrencia del pterigión, prevención de estenosis en cirugía de glaucoma, fibrosis del nervio óptico y disminución de las estenosis laringotraqueales. (11,12, 22-24)

Con base a lo anterior se puede pensar que la infiltración de una mezcla de AH-CPVP o mitomicina C en el sitio de lesión de cuerdas vocales traumatizadas, modulará el proceso de cicatrización de las mismas.

JUSTIFICACIÓN.

El proceso cicatrizal es una secuencia de eventos coordinados que nos llevan a la formación de nuevo tejido, el manipular terapéuticamente la cicatrización de las cuerdas vocales puede evitar la formación de fibrosis y sinequias posteriores al trauma laríngeo. Es por lo que en este trabajo se propone la utilización de ácido hialurónico y colágena-polivinil pirrolidona, comparado con mitomicina C para modular la cicatrización de las mismas y evitar la fibrosis exagerada de estas, ya que hay evidencias de que estos fármacos modulan la organización de la colágena y evitan la fibrosis de las heridas.

HIPÓTESIS.

El ácido hialurónico, la colágena-polivinil pirrolidona y la mitomicina C son moduladores de la regeneración celular y disminuyen la formación de cicatrices fibróticas, por lo que se puede pensar que la aplicación de estos después de una lesión de cuerdas vocales en conejos, podría evitar la fibrosis de la cuerdas vocales traumatizadas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar los cambios endoscópicos, microscópicos y bioquímicos de la cicatrización de las cuerdas vocales traumatizadas de conejo, posterior a la aplicación tópica en el sitio de la lesión de una mezcla de AH-CPVP o mitomicina C.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Comparar cual de estos fármacos aplicados tópicamente es más eficaz para prevenir la fibrosis de las cuerdas vocales traumatizadas en conejos.
- Evaluar los cambios observados por endoscopia, y por microscopia de luz producidos por la mezcla de AH-CPVP y por la mitomicina C sobre la cicatriz formada, después de realizar una lesión en las cuerdas vocales de conejos.
- Cuantificar la cantidad de colágena formada en la cicatriz de las cuerdas vocales traumatizadas de conejos tratados con una mezcla de AH-CPVP o mitomicina C.

MATERIAL Y METODOS.

1 .Recursos.

El financiamiento de esta investigación fue otorgado por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER-“ICV”) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (Proyecto REF: F643).

En este estudio participaron los investigadores y técnicos del Departamento de Investigación en Cirugía Experimental, Investigación en Morfología y Departamento de Otorrinolaringología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, que proporcionó los quirófanos, monitores de signos vitales e instrumental necesario para la realización de los procedimientos quirúrgicos, tratamientos y seguimiento postoperatorios de los animales.

El equipo de endoscopia que se utilizó, fue proporcionado por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (Proyecto REF: F643).

Los animales utilizados en este estudio fueron proporcionados por el bioterio del INER-“ICV”.

2 .Animales de experimentación.

Se utilizaron 42 conejos Nueva Zelanda, sanos, sin importar el sexo o la edad, con un peso entre 3 y 3.5 Kg. Todos los animales fueron tratados de acuerdo a las Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana (25) y de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos (26).

2.1 Criterios de inclusión. Se incluyeron conejos clínicamente sanos, que no presentaron antecedentes de alguna enfermedad respiratoria desde su llegada al bioterio del INER y antes de que se les realizara el procedimiento quirúrgico.

2.2 Criterios de exclusión. Los animales con datos clínicamente patológicos a su llegada al INER y previos al procedimiento quirúrgico o con antecedentes de alguna cirugía de cuello o cavidad oral fueron excluidos del estudio.

2.3 Criterios de eliminación. Todo animal que presentó signos clínicos de cualquier patología no provocada por el procedimiento quirúrgico, fue eliminado.

3. Grupos de Estudio.

Los animales fueron divididos en siete grupos de estudio y su evaluación fue a diferentes tiempos:

El grupo control (grupo I) se formó de 6 conejos de otro proyecto de investigación en el cual se utilizaron como donadores de pulmón. Previo a que se sometieran a eutanasia (15, 25) se les evaluó las características endoscópicas de la laringe (incluyendo las cuerdas vocales). Una vez que se sometieron a fin de estudio se les extrajo el bloque pulmonar y la laringe.

Grupo I (n=6): Se evaluó las características endoscópicas, microscópicas y bioquímicas de las cuerdas vocales.

Grupo II (n=6): Se produjo una lesión en ambas cuerdas vocales y se aplicó tópicamente en el sitio de la lesión solución salina fisiológica y se sometieron a fin de estudio a los 10 días después de producirles la lesión.

Grupo III (n=6): Se produjo una lesión en ambas cuerdas vocales y se aplicó tópicamente en el sitio de la lesión solución salina fisiológica y se sometieron a fin de estudio a los 21 días después de producirles la lesión.

Grupo IV (n=6): Lesión en cuerdas vocales y aplicación tópica de Mitomicina C en el área lesionada. Las cuerdas vocales se retiraron a los 10 días posteriores a la lesión.

Grupo V (n=6). Se produjo una lesión en ambas cuerdas vocales y se aplicó tópicamente en el sitio de la lesión Mitomicina C y se sometieron a eutanasia a los 21 días después de producirles la lesión.

Grupo VI (n=6): Lesión en cuerdas vocales y aplicación tópica de ácido hialurónico combinado con colágeno polivinil pirrolidona (AH-CPVP) en el sitio de la lesión. Las cuerdas vocales se extrajeron para su evaluación a los 10 días posteriores al trauma.

Grupo VII (n=6): Lesión en cuerdas vocales y aplicación tópica de la mezcla AH-CPVP en el sitio de la lesión y fin de estudio a los 21 días después de producirles el trauma.

4. Anestesia.

Los animales se prepararon con 24 horas de ayuno para sólidos y 12 horas para líquidos. La anestesia en todos los grupos de estudio se indujo con hidrocloreuro de xilacina (Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Germany) a dosis de 0.1 mg/Kg. y 1.5 mg/kg. de propofol (Diprivan, Astra Zeneca, Milan, Italy) vía intravenosa (IV) mezclados en la misma jeringa e inmediatamente se les aplicó dipirona (Pisa Agropecuario S.A. de C.V. Tula, Hidalgo, México) a dosis de 28 mg/Kg. IV como analgésico (27).

Una vez anestesiados, los animales se colocaron sobre la mesa de cirugía en posición decúbito dorsal y durante todo el procedimiento quirúrgico sus signos vitales se vigilaron con un monitor para electrocardiografía (Datascopie Passport, New Jersey, USA).

5. Producción de la lesión en las cuerdas vocales.

En todos los animales sometidos a estudio, con un endoscopio rígido de 5 mm (Hopkins II, Karl Storz, Germany) y con un equipo de cirugía videoasistida (Cámara de video Elmo Company, Tokio, Japan. Monitor Sony PVM-1943MD, Tokio, Japan) se visualizaron las cuerdas vocales en el monitor, posteriormente con un lápiz de un equipo de electrocirugía (Force Fx C Valleylab, Illinois, USA) se produjo electrofulguración controlada (40 watts) en el tercio posterior de la porción membranosa de ambas cuerdas vocales (Figura 1 A). Inmediatamente se procedió a la aplicación del tratamiento (Figura 1 C).

Después de completar el procedimiento y aplicar el tratamiento en la región afectada, se aplicó lidocaína (Xilocaína, Astra Zeneca S.A. de C.V., Estado de México, México) en forma tópica.

Los animales de los grupos II, IV y VI se sometieron a eutanasia con sobredosis anestésica a los 10 días posteriores a la producción de la lesión, mientras que los de los grupos III, V y VII a los 21 días después de realizarles el procedimiento.

6. Tratamiento.

En todos los grupos el tratamiento se aplicó inmediatamente después de producir la lesión, mediante aplicación tópica con un algodón durante 5 minutos (Figura 1 C). En los grupos II y III se aplicó en el área electrofulgurada 1 ml de solución salina fisiológica. En los grupos IV y V se aplicó tópicamente 0.5 mg de mitomicina C (Mitocin-C, Bristol-Myers Squibb Caribbean Company, Mayagüez, Puerto Rico) contenidos en 1 ml de agua destilada (dosis utilizadas para las estenosis traqueales) (11). Mientras que los grupos VI y VII se trataron con 15 microgramos de AH (Hyaluronic acid potassium salt, Fluka Laboratory Chemicals, Riedel-de Haën, Germany) más 2.5 mg de CPVP (Fibroquel, Aspid S.A de C.V., México, DF), diluidos en 1 ml de agua destilada (dosis usada para evitar adherencias intrabdominales, estenosis uretrales e intestinales y para prevenir las estenosis traqueales experimentales, problemas de piel y tendones, así como en estenosis traqueales experimentales) (17, 20, 21).

7. Evaluación.

7.1 Clínica.

Se realizó evaluación clínica diaria durante la primera semana posquirúrgica y cada tercer día, durante el tiempo restante del estudio.

La evaluación clínica consistió en realizar observación de cada animal dentro de su jaula, toma de temperatura, observación de la coloración de mucosa oral, presencia de estridor, auscultación de la cavidad torácica mediante estetoscopio para evaluar la frecuencia respiratoria, ruidos respiratorios y frecuencia cardíaca.

7.2 Endoscópica.

En todos los animales se evaluaron las cuerdas vocales mediante endoscopía, previo a la cirugía, después de producirles la electrofulguración, a los 10 y a los 21 días dependiendo del grupo de estudio. En esta se evaluó el estado de las cuerdas vocales, presencia de necrosis, infección, granulomas edema, tipo de cicatriz formada (bien organizada o fibrótica) de las cuerdas vocales y formación de sinequias. Todos los procedimientos se videograbaron.

7.3 Microscópica.

Una vez transcurridos 10 y 21 días postelectrofulguración respectivamente los animales de todos los grupos de estudio fueron sometidos a eutanasia con sobredosis de pentobarbital sódico (Anestosal, Pfizer, Estado de México, México) (15) y se retiraron las cuerdas vocales para realizarles evaluación microscópica.

Para realizar esta se tomaron muestras de las cuerdas vocales lesionadas, se fijaron en formaldehído al 10%, se incluyeron en parafina, se les realizaron cortes de 4_{μ} y se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson para evaluar la presencia de inflamación, vasos de neoformación, fibrosis,

organización de las fibras de colágena, cobertura total de epitelio e hipertrofia epitelial.

7.4 Bioquímica.

En la evaluación bioquímica se determinó la concentración de hidroxiprolina por gramo de tejido de cuerda vocal. La determinación se realizó por el método de Woessner (28) en una muestra de cada cuerda vocal electrofulgurada tomadas al final del estudio. Las muestras se colocaron cada una dentro de un vial que se pesó previamente, inmediatamente después de colocar la muestra se obtuvo el peso "mojado" y posteriormente se mantuvo en una estufa a 80°C hasta que se pudo obtener el peso "seco" de las muestras.

Obtenido el peso "seco", las muestras se hidrolizaron con ácido clorhídrico 6N (J.T.Baker) durante 36 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras se filtraron y se colocaron en una evaporadora hasta eliminar el exceso de ácido clorhídrico. El residuo obtenido, se llevó a pH de 7.0 y se aforó a un volumen de 10 ml con agua destilada, de esta última dilución, se tomó una alícuota de volumen variable de acuerdo con cada una de las muestras y se determinó la concentración de hidroxiprolina presente en la muestra.

Para realizar la determinación de hidroxiprolina, se preparó una curva estándar que contenía 1 mg de hidroxiprolina/1 ml de agua (SIGMA, Co), se ajustó para la preparación de los estándares de hidroxiprolina en concentraciones de 200, 400, 600, 800 y 1000 μ l de hidroxiprolina y se incluyó un blanco que contenía agua destilada. Posteriormente, en todos los tubos se adicionó: 1 ml de cloramina T (SIGMA Co) 0.05M disuelta en metilcelosolve (SIGMA Co), agua y amortiguador de fosfatos pH 6.0, 1 ml de ácido perclórico 3.0N (J.T. Baker), 1

ml de solución de paradimetilaminobenzaldehído (SIGMA Co) al 20% en metilcelosolve. El ensayo se incubó durante 20 minutos a 60°C y concluido el tiempo de incubación, se obtuvo la absorbancia de cada muestra, para esto se utilizó un espectrofotómetro (DU 640, Beckman) ajustado a una longitud de onda de 560 nm.

Análisis estadístico de los datos.

El análisis estadístico de la evaluación endoscópica, microscópica, y determinación de colágena se realizó mediante las pruebas de ANDEVA, TUKEY y KRUSKAL WALLIS. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

VI. RESULTADOS.

1. Hallazgos clínicos.

Clínicamente en todos los grupos (100% de los animales) a la inspección general, durante los primeros 3 días se apreció rudeza respiratoria, la cual desapareció entre el quinto y sexto día posteriores a la producción de la lesión. Ningún animal mostró algún otro signo clínico que pusiera en peligro su vida, ya que sus constantes fisiológicas (temperatura, frecuencia cardiaca y frecuencia respiratoria) se encontraron dentro de los parámetros normales. Durante todo el estudio no se observó disnea en ningún animal sometido al procedimiento quirúrgico.

2. Hallazgos endoscópicos.

En el grupo I (Control) las características endoscópicas observadas previo a la obtención de las cuerdas vocales se observaron de apariencia normal Figura 1 A (Cuadro 1).

En el grupo II (Trauma cuerda vocal tratado con SSF por 10 días), 3 conejos mostraron aparente necrosis en el área lesionada, de los cuales 2 (33.3%) de estos desarrollaron infección en el área traumatizada. Todos los conejos (100%) desarrollaron edema. También los 3 conejos (50%) con aparente necrosis desarrollaron un granuloma (2 en el aritenoides derecho y 1 en ambas cuerdas vocales). La cicatriz formada en 3 conejos (50%) fue desorganizada y con fibrosis severa, mientras que en los 3 restantes fue bien organizada y con fibrosis leve. Los 6 conejos (100%) desarrollaron sinequia interaritenoidea, al igual que edema de las cuerdas vocales (Figura 2 A) (Cuadro 1).

En los animales del grupo III (SSF 21 días), ningún animal presentó necrosis, infección, ni edema. Un animal (16.6%) desarrolló granuloma en el aritenoides derecho. Con respecto al desarrollo de la cicatriz en 4 animales (66.6%) se observó bien organizada y con fibrosis leve, mientras que en los otros 2 animales (33.3%) formaron una cicatriz desorganizada y con fibrosis severa. Cuatro animales (66.6%) desarrollaron sinequias (Figura 2 B) (Cuadro 1).

Los conejos tratados con Mitomicina C (grupo IV) y que fue estudiada su cicatrización a los 10 días, mostraron en el 50% de los casos (3 animales) necrosis aparente en el área lesionada, 2 (33.3%) desarrollaron infección y granuloma de la misma. En todo el grupo (100% de los conejos) se presentó edema en ambas cuerdas vocales. La cicatriz observada en 4 animales (66.6%) fue bien organizada y con fibrosis leve, los otros 2 conejos desarrollaron una cicatriz desorganizada y fibrótica. En 4 animales (66.6%) se encontró presencia de sinequia interaritenoides (Figura 2 C) (Cuadro 1).

Los conejos tratados con Mitomicina C por 21 días (grupo V), ninguno mostró necrosis, infección o granuloma. Sin embargo el 83.3% de los casos (5 animales) presentaron edema en ambas cuerdas vocales. En el 100% de los animales sometidos a trauma de la cuerda vocal se observó una cicatriz bien organizada. En 4 conejos (66.6%) se pudo observar la presencia de sinequia, mientras que los otros 2 animales de experimentación (33.4%) no desarrollaron estas (Figura 2 D) (Cuadro 1).

Los animales de grupo VI (AH-CPVP 10 días), no presentaron (0%) necrosis, infección, ni granulomas. Sin embargo el 100% de los conejos mostraron edema de las cuerdas vocales. La cicatrización de 4 animales de este grupo (66.6%) fue bien organizada. Sin embargo 2 conejos (33.3%) desarrollaron fibrosis leve. Cuatro conejos (66.6%) formaron sinequias interaritenoides (Figura 2 E) (Cuadro 1).

En el grupo VII (AH-CPVP 21 días), ningún animal (0%) presentó necrosis ni infección. Un conejo (16.6%) desarrolló un granuloma en el aritenoides derecho. A su vez el 50% (3 conejos) mostraron edema en las cuerdas vocales. La cicatrización de 5 animales de este grupo (83.3%) fue bien organizada y solo en uno se observó desorganizada ésta. Sin embargo ninguno de los conejos (0%) desarrolló fibrosis. Cuatro conejos (66.6%) formaron sinequias interaritenoides (Figura 2 F) (Cuadro 1).

En el análisis estadístico de la presencia de infección, granuloma al comparar dentro de cada grupo y entre grupos no se observó diferencia ($p=NS$ ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS)(ver cuadro 1).

La necrosis observada en la evaluación endoscópica de los animales de los grupos II y IV fue significativa en comparación con los otros grupos de estudio (I, III, V, VI y VII) ($p<0.01$ ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS) (ver cuadro 1).

El edema observado en las cuerdas vocales de los grupos III y VII fue estadísticamente menor que en los otros grupos de estudio (I, II, V, VI) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS) (ver cuadro 1).

La formación de sinequias observada en el grupo II fue estadísticamente significativa cuando se comparó con el grupo VI (AH-CPVP 10 días) ($p < 0.01$ ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS) (ver cuadro 1).

3. Hallazgos Microscópicos.

Con respecto al estudio histopatológico en los controles se apreció la estructura normal de las cuerdas vocales (Figura 3)

En los animales del grupo II se observó acantosis en 66.6% de los casos (4 conejos), los otros 2 se observaron normales (33.3%). Cuatro conejos (66.6%) presentaron inflamación severa, 2 (33.3%) inflamación moderada en todas las capas de la cuerda vocal con infiltrado de predominio neutrófilo. Dos conejos (33.3%) desarrollaron un área de necrosis y en otros 2 (33.3%) se desarrolló un granuloma en el epitelio y la lámina propia de la cuerda vocal. En todos los casos se apreció cicatrización de la cuerda vocal lesionada, sin embargo en 4 animales (66.6%) se observó fibrosis moderada, en uno (16.6%) severa y se caracterizó por la formación de fibras de colágena completamente desorganizada. Mientras que en el otro conejo (16.6%) se observó la formación leve de fibras de colágena de apariencia delgada y bien organizadas en forma unidireccional. En 2 casos (33.3%) se observó la presencia de fibroblastos en la lámina propia (Figura 4 A)

En los animales del grupo III (SSF 21 días) encontramos en su totalidad (100%) acantosis, así como inflamación moderada en todas las capas de la cuerda vocal en 4 de los conejos (66.6%), apreciándose en los 2 restantes (33.3%) un infiltrado inflamatorio leve. Por otro lado 2 de los animales desarrollaron granulomas en la lámina propia (33.3%) y ninguno de ellos mostraba áreas necróticas (0%). En cuanto a la cicatrización las fibras de colágena observadas en los 6 conejos (100%) fueron en cantidad moderada con disposición completamente desorganizada. En 4 de los animales (66.6%) se observó infiltrado fibroblástico (Figura 4 B)

En cuanto al grupo IV (Mitomicina C 10 días) se apreció acantosis en 6 de los animales (100%). Se observó inflamación severa aguda en 4 conejos (66.6%) y moderada en 2 (33.3%) en todas las capas de las cuerdas vocales estudiadas. A su vez, 4 conejos (66.6%) desarrollaron áreas de necrosis, 2 animales (33.3%) granulomas y 1 de ellos (16.6%) un absceso en el epitelio y en la lámina propia. Referente a la cicatrización 6 de los animales (100%) denotaban un moderado aumento de fibras de colágena la cuales se caracterizaron por su disposición desorganizada (Figura 4 C).

En el grupo V (Mitomicina C 21 días) al igual que los grupos de estudio reportados arriba se encontró que 6 animales (100%) desarrollaron acantosis. Por otro lado, en 1 conejo (16.6%) se apreció inflamación aguda severa y en 4 de ellos (66.6%) moderada dentro de las 3 capas de la cuerda vocal y en el conejo restante (16.6%) se observó proceso inflamatorio leve solamente en la

lámina propia y el epitelio. Ningún animal (0%) mostró áreas necróticas, granulomas o abscesos. A su vez en 6 conejos (100%) se observó moderado incremento en la presencia de fibras de colágena con disposición desorganizada de las mismas (Figura 4 D).

En los animales del grupo VI (AH-CPVP 10 días) se observó acantosis en 2 de los casos (33.3%), los otros 4 conejos se observaron las características del epitelio sin cambios patológicos (66.6%). Seis conejos (100%) presentaron inflamación leve con infiltrado de predominio neutrófilo dentro de la lámina propia y el epitelio de la cuerda vocal. Ningún conejo (0%) desarrolló un área de necrosis, granulomas o abscesos. En todos los casos se apreció cicatrización con la presencia de las fibras de colágena bien organizadas y delgadas (Figura 4 E).

Dentro de los hallazgos del grupo VII (AH-CPVP 21 días) se apreció acantosis en 2 de los animales (33.3%). Se observaron cambios inflamatorios leves en 3 conejos (50%) dentro del epitelio y la lámina propia de la cuerda vocal. En los restantes animales se encontraron hallazgos inflamatorios moderados en todas las capas de la cuerda vocal (50%). Un conejo (16.6%) desarrolló un área necrótica. Ninguno de los conejos participantes de este grupo presentó granuloma y/o absceso (0%). En cuanto a la fibrosis ninguno de los animales (0%) denotaban un depósito desorganizado de las fibras de colágena, y en 2 conejos (33.3%) se observó un infiltrado de fibroblastos en la lámina propia (Figura 4 F).

Al realizar el análisis estadístico de los hallazgos histológicos, la presencia de granulomas y fibroblastos no fue significativa a la hora de compararla dentro de cada grupo y entre grupos ($p=NS$ ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS)(ver cuadro 2).

Al comparar dentro de cada grupo la presencia de acantosis no fue significativa, sin embargo, al compararla entre grupos la formación de ésta en los grupos I, VI y VII fue menor al compararla con los grupos II, IV y V ($p<0.05$ ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS) (ver cuadro 2).

Con respecto a la inflamación, la observada en los grupos VI y VII fue significativamente menor que en los otros grupos de estudio (II, III, IV y V) ($p<0.01$ ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS), a excepción del grupo I ($p=NS$ ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS) (ver cuadro 2).

La necrosis observada en el grupo IV al compararla con los otros grupos de estudio fue significativa ($p<0.05$ ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS) (ver cuadro 2).

Finalmente la presencia de fibrosis leve en los grupos VI y VII fue estadísticamente significativa ($p<0.01$ ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS) al compararla con todos los otros grupos (ver cuadro 2).

4. Hallazgos Bioquímicos.

Al cuantificar bioquímicamente la cantidad de colágena por mg. de tejido de las cuerdas vocales lesionadas mediante el método de Woessner, al comparar dentro de cada grupo ninguno presento diferencia significativa ($p=NS$, Andeva, Tukey).

Al comparar entre grupos se observó se apreció que la colágena de los grupos tratados con la mezcla AH-CPVP tanto de 10 como de 21 días, mostraron una disminución importante en la cantidad de colágena formada por gramo de tejido de cuerda vocal en comparación con los otros grupos de estudio, excepto con el grupo I (Andeva $p < 0.05$, Tukey/Kramer $p < 0.01$) (Gráfica 1).

DISCUSION

La cicatrización de las cuerdas vocales al igual que en otros órganos es una secuencia de eventos coordinados que originan la formación de nuevo tejido. Sin embargo la mala cicatrización de las cuerdas vocales después de un traumatismo, puede provocar la formación de sinequias que conlleva a ocasionar cambios biomecánicos y alteraciones en la fisiología de la laringe (4, 5, 29).

Hoy en día se han desarrollado muchos medicamentos que influyen sobre el proceso de cicatrización normal e incluso modifican las cicatrices fibróticas. Algunos de estos fármacos actúan tanto en la fase inflamatoria, como en la proliferativa evitando la formación de cicatrices fibróticas (10,11). Aunque también existen medicamentos que no tienen estas características, pero se comportan modificando y/o degradando la colágena ya establecida en una cicatriz (7,10).

En este trabajo, con el fin de mejorar las características de la cicatriz que se produce después de un traumatismo laríngeo y evitar la formación de sinequias que producen los cambios biomecánicos negativos en el funcionamiento laríngeo, se exploró la utilización de la mezcla de ácido hialurónico y la colágena-polivinil pirrolidona, así como de la mitomicina C (los cuales son fármacos que modulan la organización de la colágena y evitan la fibrosis de las heridas), con el propósito de modular la cicatrización de las mismas.

En los hallazgos endoscópicos de este trabajo, los conejos tratados con solución salina fisiológica y mitomicina C en los grupos de 10 días, desarrollaron infección, granuloma y aparente necrosis en el 50% de los casos, a diferencia de los otros grupos de estudio que fueron tratados con la mezcla de AH-CPVP. Esto puede ser explicado por que el mecanismo de acción del AH y de la CPVP consiste en inhibir la respuesta inflamatoria aguda y que aunque no existen otros estudios del uso de estos fármacos en las cuerdas vocales, los hallazgos observados en este estudio coinciden con los descritos por diversos investigadores que han evaluado su utilidad en diferentes tejidos (7, 8, 9, 10, 15, 17).

Con base a los resultados observados endoscópicamente en este trabajo, en los que del 50 al 80% de los animales formaron una cicatriz organizada, independientemente del medicamento con el que fueron tratados, pueden sugerir que el uso de estos fármacos permite la cicatrización adecuada de las cuerdas vocales. Sin embargo estos hallazgos no coinciden con lo reportado por otros autores que han utilizado la mitomicina C para el manejo de traumatismo laríngeo (29).

La presencia de sinequias observadas en todos los grupos de estudio a excepción del grupo tratado con la mezcla AH-CPVP por 10 días, pudiera atribuirse al efecto antiinflamatorio producido por la mezcla de los fármacos, a diferencia de la SSF y mitomicina C, favorece que no exista una cicatriz completamente organizada y que la colágena formada en este estudio sea insuficiente para producir una sinequia. (7, 11, 12, 18, 20)

Histopatológicamente lo encontrado en este trabajo, con referencia al menor desarrollo de acantosis y de inflamación en las cuerdas vocales de los animales de los grupos VI y VII (AH-CPVP) en comparación con los otros grupos estudiados, se puede atribuir al efecto antiinflamatorio de la mezcla de estos medicamentos, lo cual coincide con lo observado por otros autores al utilizarlo en otras regiones del cuerpo (traquea, tendones, abdomen, articulaciones) (13, 15, 17, 19, 20, 21, 30).

La formación de fibras de colágena bien organizada y delgada en los grupos tratados con AH-CPVP, a diferencia de los otros grupos en los que se encontraron de una manera gruesa y desorganizada, observada en el análisis histológico, es posible que se deba al efecto antiinflamatorio, así como también al efecto de los dos medicamentos que pueden favorecer una disminución (AH) y a la remodelación de la colágena formada (CPVP) durante el proceso inflamatorio cicatrizal (18, 19, 20, 21).

La evaluación bioquímica mostró que la mezcla AH-CPVP disminuye cuantitativamente de manera importante la cantidad de colágena desarrollada por mg de tejido en comparación con el grupo tratado con SSF y/o mitomicina C. Estos hallazgos coinciden con lo descrito por otros autores quienes mencionan que el tratamiento con la mezcla AH-CPVP disminuye la formación

de fibras de colágena e interviene en la remodelación, a diferencia de la SSF y la mitomicina C que no tienen efectos antiinflamatorios y aunado a que esta ultima, solo actúa sobre colágena bien establecida (19, 20, 21, 30).

CONCLUSIÓN

De acuerdo a lo descrito se puede concluir la mezcla de ácido hialurónico y colágena polivinil pirrolidona administrados posteriormente a una lesión en cuerda vocal inducida en conejos, mejora la calidad de la cicatrización de las cuerdas vocales, debido a que disminuye la inflamación, la formación de fibras colágena y consecuentemente la formación de sinequias.

CUADROS

EVALUACIÓN ENDOSCÓPICA							
	GRUPOS DE ESTUDIO						
	Grupo I Control	Grupo II SSF 10 días	Grupo III SSF 21 días	Grupo IV Mitomicina 10 días	Grupo V Mitomicina 21 días	Grupo VI AH-CPVP 10 días	Grupo VI AH-CPVP 21 días
Aparente Necrosis	0	3 **	0	3 **	0	0	0
Infección	0	2	0	2	0	0	0
Granuloma	0	3	1	2	0	0	1
Edema	0	6	0 **	6	5	6	3 *
Cicatriz bien organizada	0	3	4	4	6	4	5
Cicatriz fibrosis severa	0	3	2	2	0	2	1
Sinequia	0	6	4	4	4	0 **	4

* $p < 0.05$ ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS \pm Desviación Estándar

** $p < 0.01$ ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS \pm Desviación Estándar

Cuadro 1. Muestra los hallazgos observados al final del estudio en cada grupo experimental.

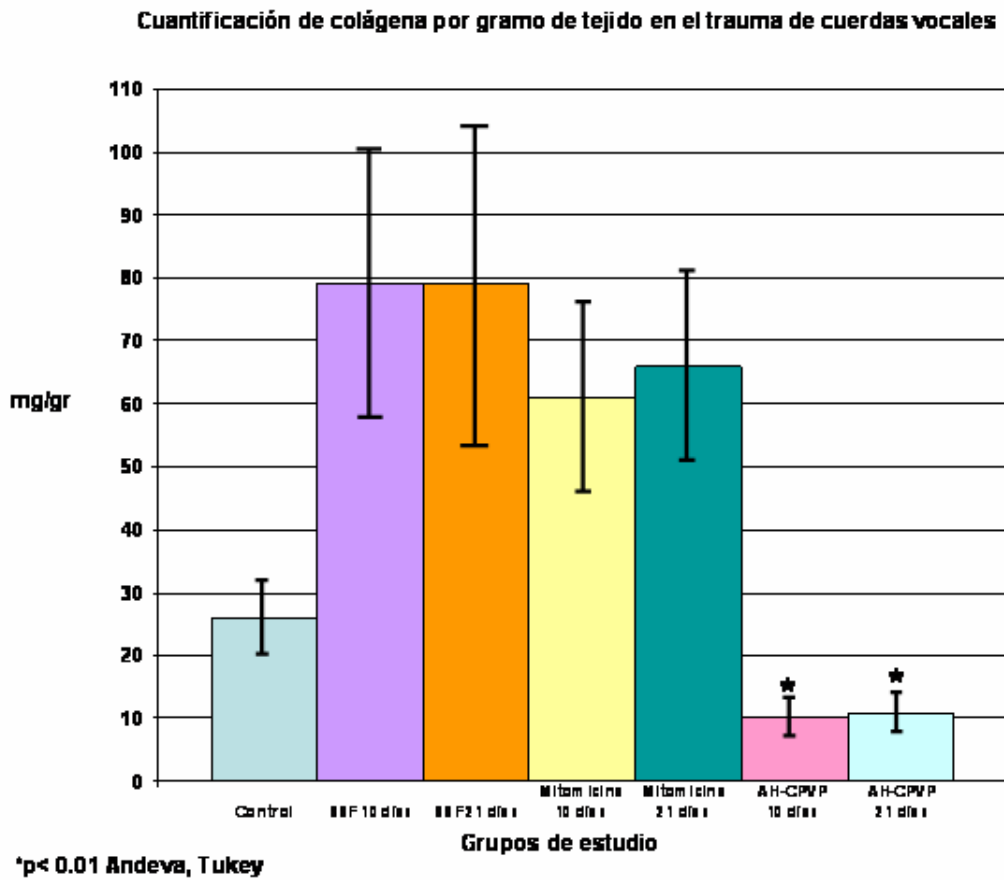
EVALUACIÓN MICROSCÓPICA							
	GRUPOS DE ESTUDIO						
	I Control	II SSF 10d	III SSF 21d	IV Mit C 10d	V Mit C 21d	VI AH- CPVP 10d	VII AH- CPVP 21d
Acantosis	0	4	6	6	6	2 *	2 *
Inflamación	0	2 mod 4 sev	2 lev 4 mod	2 mod 4 sev	1 lev 4 mod 1 sev	6 lev **	3 lev ** 3 mod**
Necrosis	0	2	0	4 *	0	0	1
Granuloma	0	2	2	2	0	0	0
Colágena	0	1 lev 4 mod 1 sev	6 mod	6 mod	6 mod	6 lev**	6 lev**
Fibroblastos	0	2	4	2	3	0	2

* $p < 0.05$ ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS \pm Desviación Estándar

** $p < 0.01$ ANDEVA, TUKEY, KRUSKAL WALLIS \pm Desviación Estándar

Cuadro 2. Muestra los hallazgos microscópicos observados al final del estudio en cada grupo experimental.

GRAFICAS



Gráfica 1. Cantidad de colágena formada al final del estudio en la cicatriz de las cuerdas vocales de conejo tratadas con diferentes moduladores de la cicatrización.

FIGURAS

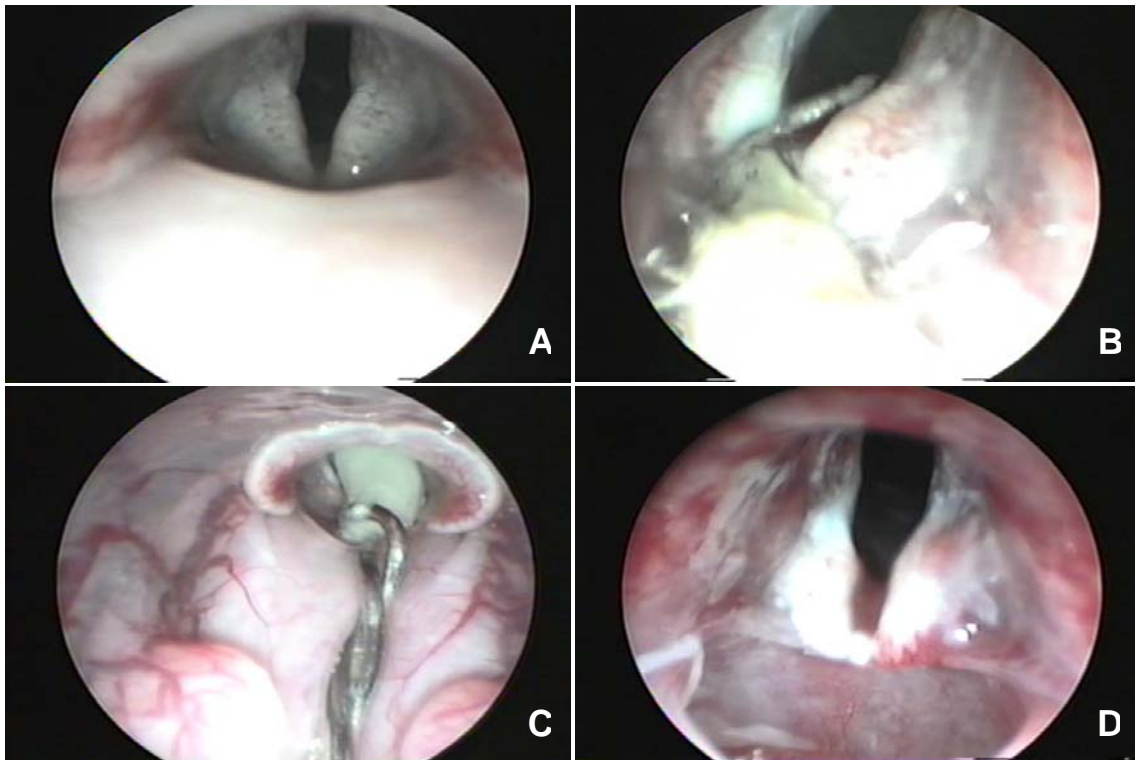


Figura 1. Se observa: A) las cuerdas vocales previo al inicio de tratamiento, B) la electrofulguración de las mismas, C) muestra la manera en la que se aplicó el tratamiento y D) cuerdas vocales lesionadas después del tratamiento.

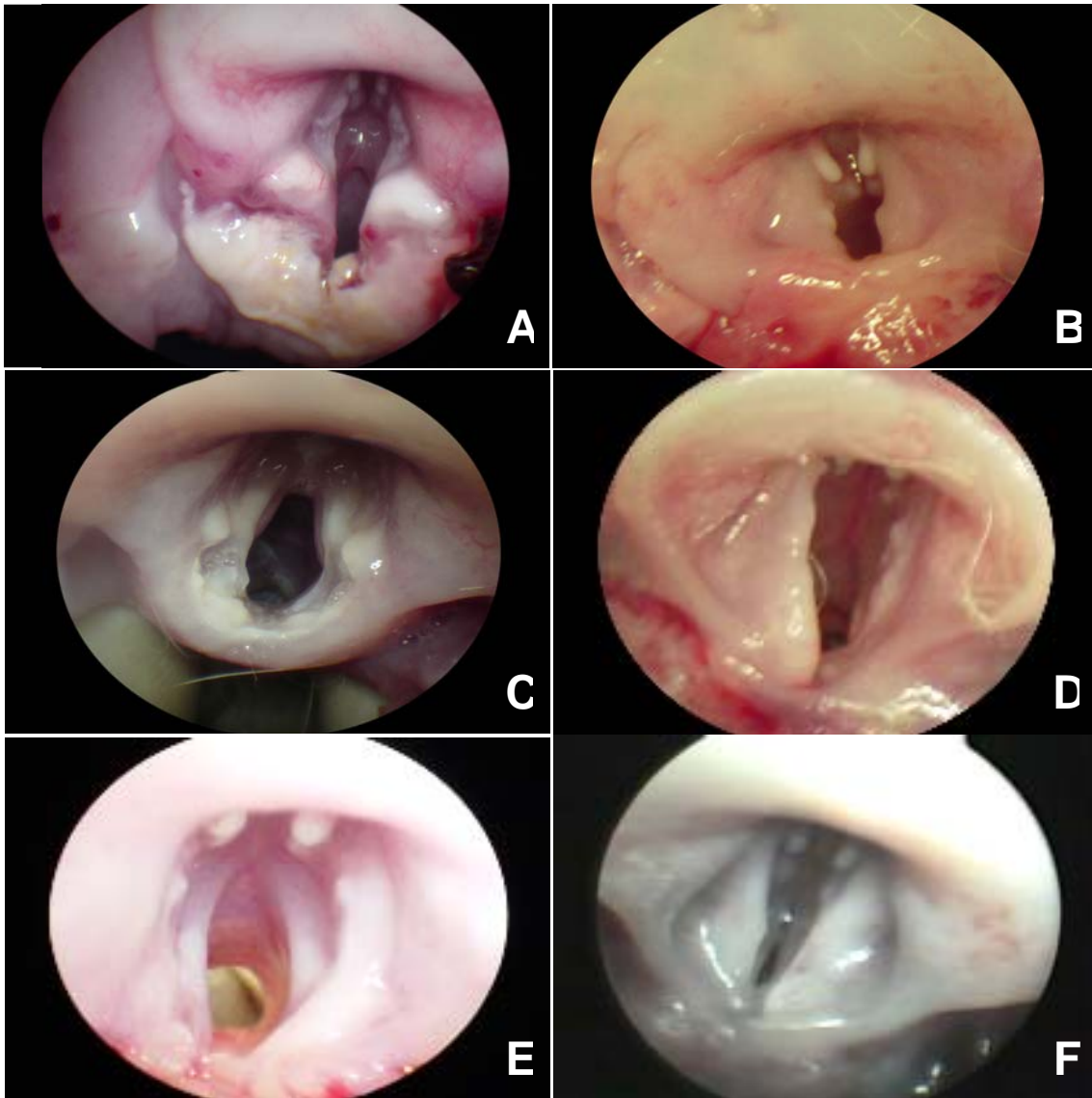


Figura 2. Endoscopía realizada al final del estudio en la que se observa la cicatrización de la cuerdas vocales de acuerdo a su grupo de estudio: A) Grupo SSF 10 días, B) Grupo SSF 21 días, C) Mitomicina C 10 días, D) Grupo Mitomicina C 21 días, E) AH-CPVP 10 días y F) AH-CPVP 21 días.

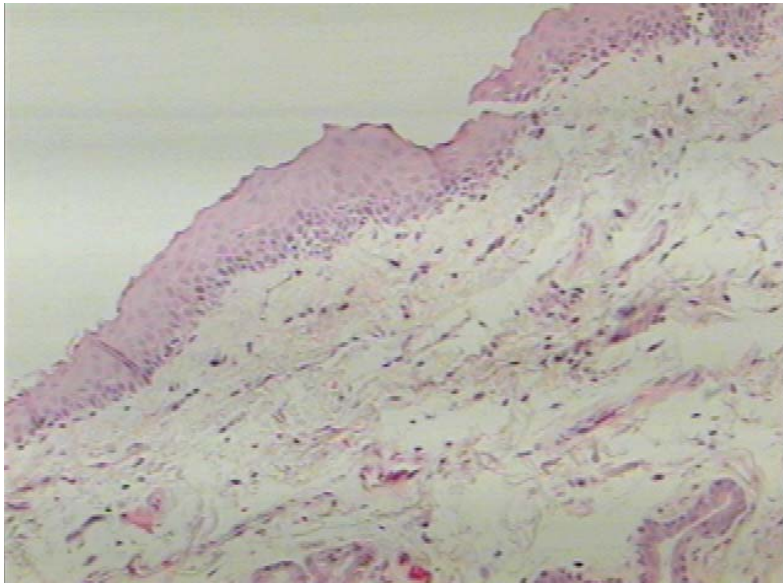


Figura 3. Microfotografía de cuerda vocal control que muestra la arquitectura normal de todas las capas de la cuerda vocal (H-e, 10X).

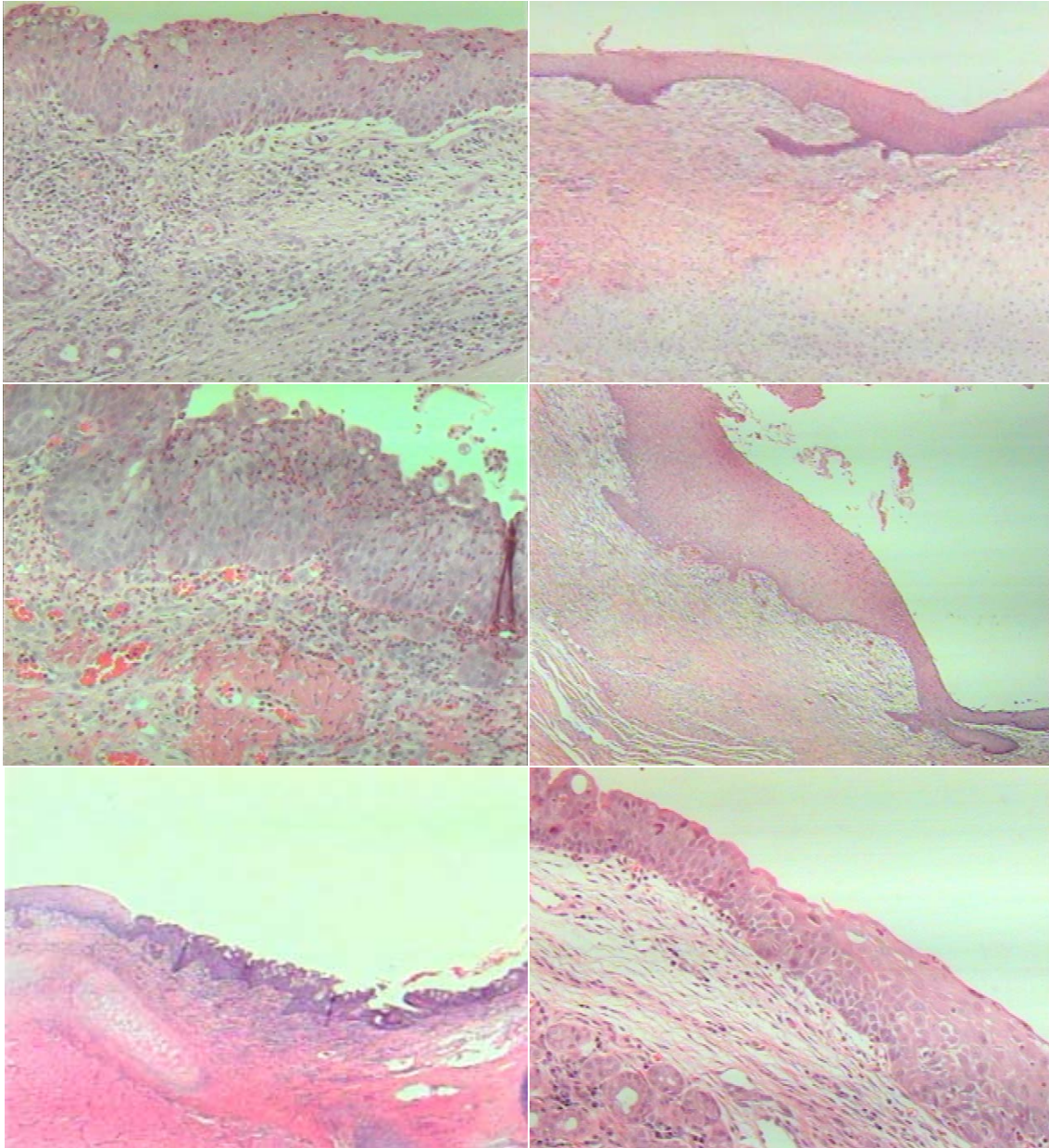


Figura 4. Microfotografía (H-e, 10x) que muestra el infiltrado inflamatorio y la formación de fibras de colágena en los diferentes grupos de estudio. A) SSF 10 días, B) SSF 21 días, C) Mitomicina 10 días, D) Mitomicina 21 días, E) AH-CPVP 10 días, F)AH-CPVP 21 días

BIBLIOGRAFIA.

1. - Robert Ossof, *The Larynx*, Lippincott Williams and Wilkins, 2003, pp. 431-440
2. - Alfio Ferlito, *Diseases of the Larynx*, Oxford University Press Inc., 2000, pp, 25-44.
3. - Rousseau B, Hirano S, Scheidt TD et al. Characterization of vocal fold scarring in canine model. *Laryngoscope* 2003; 113:620-7
4. - Thibeault SL, Gray SD, Bless DM, Chan RW, Ford CN. Histologic and rheologic characterization of vocal fold scarring. *J Voice* 2002; 16:96-104
5. - Bransky RC, Rosen C, Verdolini K and Hebda P. Acute vocal fold wound healing in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2005; 114: 19-24.
6. - Kirsner RS, Eaglstein WH. The wound healing process. *Dermatol Clin* 1993; 11:629-40.
7. - Longaker MT, Harrison MR, Crombleholme TM, et al: Studies in Fetal Wound Healing: I. A Factor in Fetal Serum that Stimulates Deposition of Hialuronic Acid. *J Pediatr Surg*. 1989; 24(8): 789-792.
- 8.- Chimal J., Lira M., De la Cruz et al. Healing of fractures rat femoral bones enhanced by fibroquel. A radiological, histological and histochemistry study. *Wound Repair and Regeneration*. 1996; 4(1): A147.
- 9.- Chimal J., Bravo T., Krotz F. and Díaz L. Implantes de fibroquel aceleran la formación de hueso nuevo en defectos óseos inducidos experimentalmente en cráneos de rata: un estudio histológico. *Rev. Biomed* 1997; 8: 81-88.
10. - Doolin E., Tsumo K., Strande M. and Santos M. Pharmacologic inhibition of Collagen in an experimental model of subglottic stenosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1998, 107:275-78.

11. - Reza R., Stanley M.S. and Gerald B.H. Mitomycin: Effects On Laryngeal and Tracheal Stenosis, Benefits and Complications. *Ann Otol Laryngol.* 2001; 110: 1-6.
12. - Eliashar R., Eliachar I., Esclamado R., Gramlich T. and Strome M. Can Topical Mitomicyn Prevent Laryngotracheal Stenosis? *Laryngoscope.* 1999; 109: 1594-1600.
13. - Wen DY: Intra-articular Hyaluronic Acid Injection for Knee Osteoarthritis. *American Family Physician.* 2000; 62(3): 565-570.
14. - Soldati D, Rahm F, Pasche P: Mucosal Wound Healing After Nasal Surgery. A Controlled Clinical Trial on the Efficacy of Hyaluronic Acid Containing Cream. *Drug Under Experimental and Clinical Research.* 1999; 25(6): 253-261.
15. - Sawada T, Hasegawa K, Tsukada K, et al: Adhesion Preventive Effect of Hyaluronic Acid After Intraperitoneal Surgery in Mice. *Human Reproduction.* 1999; 14(6): 1470-1472.
16. - Krauss MC: Recent Advances in Soft Tissue Augmentation. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery.* 1999; 182: 119-128.
- 17.- Olmos-Zúñiga JR, Santos-Cordero A, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, Gaxiola-Gaxiola M, Mora-Fol R, Franco-Oropeza A y Santillán-Doherty P. Efecto del ácido hialurónico sobre la cicatrización traqueal en un modelo experimental canino. *Acta Otorrinolaringológica Española.* 2004; 55: 81-87.
- 18.- Charous S.J. Ossof RH, Reinisch L. and Davidson J.M. Canine subglottic stenosis as a model for excessive fibrosis: a pilot immunohistochemical analysis. *Wound Rep. Reg.* 1996; 4:444-53.

19. - Darzi M.A., Chowdri N.A., Kaul S.K. and Khan M. Evaluation of varios methods of treating keloids and hypertrophic scar: A 10 years follow up study. *British Journal of Plastic Surgery*. 1992; 45:374-79.
- 20.- Loyola-García U. Respuesta Terapéutica A La Colágeno-Polivinil Pirrolidona En Un Modelo Experimental De Estenosis Traqueal Canino. Tesis Especialidad de Cirugía Torácica. México D.F. Facultad de Medicina. UNAM, 2001.
- 21.- Hernández Jiménez Claudia. Efecto del ácido hialurónico y colágeno polivinil pirrolidona en la cicatrización de traqueoplastías en perros. Tesis de Maestría en Ciencias. México D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. UNAM, 2005.
- 22.- Kunimoto N., Mori S. Studies on the pterygium. Part IV A treatment of the pterygium by mitomycin- C instillation. *Acta Soc Ophthalmol Jpn*. 1963; 67:601-607.
23. - Palmer S., Mitomicyn as adjunct chemotherapy with trabeculectomy. *Ophthalmol*. 1991; 98:317-321.
24. - Bergstrom TJ., Wilkinson WS, Skuta GL, Watnick RL, Elner VM. The effects of subconjunctival mitomycin C on glaucoma filtration surgery in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1991; 109:1725-1730.
- 25.- 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. Estados Unidos Mexicanos.
- 26.- Guía Para el Cuidado y Uso de Los Animales de Laboratorio. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health

Health U.S.A. Edición Mexicana Auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. México, D.F. 2002.

27. - Memories of the Course of Animal Anesthesia and Models of the 12 th Annual Meeting and 1ST International Conference of the Academy of Surgical Research. University of Muenster Department of Surgery. Muenster, Germany, October, 1996.

28. - Ruiz López VM. Tesis Profesional: Efecto de los Inmunosupresores en la Cicatrización Bronquial en un Modelo de Autotrasplante Pulmonar. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF. 1996.

29. – Garret C.G., Soto J., Brillante Ch.R., Riddick J., Reinisch L., Effect of Mitomycin C on Vocal Fol. Healing in a Canine Model. Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology. 2001; 110; 25-30

30.- Santillán Artolózaga Alberto. Efecto de Diferentes moduladores de la Cicatrizales en la Traqueoplastía. Estudio Experimental. Tesis de Especialista en Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. México D.F. Facultad de Medicina. Instituto Nacional De Enfermedades Respiratorias. Universidad Nacional Autónoma de México. UNAM, 2006.