



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
"DR. ISMAEL COSIO VILLEGAS"**

**"TIPIFICACIÓN DE LA COLAGENA PRODUCIDA EN LA
CICATRIZACIÓN TRAQUEAL POSTRAQUEOPLASTÍA
DESPUÉS DE LA APLICACIÓN DE DIFERENTES
MODULADORES DE LA CICATRIZACIÓN EN LA
ANASTOMOSIS TRAQUEAL. ESTUDIO
EXPERIMENTAL"**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE LA SUB
ESPECIALIDAD EN
CIRUGÍA CARDIOTORACICA**

PRESENTA

DR. MARCO ANTONIO IÑIGUEZ GARCÍA



TUTOR

M. EN C. J. RAÚL OLMOS ZÚÑIGA

CO-TUTORES

**DR. JOSÉ LUIS TÉLLEZ BECERRA
Q.F.B. MATILDE BALTAZARES LIPP
DRA. CLAUDIA HERNÁNDEZ JIMÉN**

MÉXICO, D.F., AGOSTO 2011



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.

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

ISMAEL COSIO VILLEGAS

*“TIPIFICACIÓN DE LA COLAGENA PRODUCIDA EN LA
CICATRIZACIÓN TRAQUEAL POSTRAQUEOPLASTÍA DESPUÉS
DE LA APLICACIÓN DE DIFERENTES MODULADORES DE LA
CICATRIZACIÓN EN LA ANASTOMOSIS TRAQUEAL. ESTUDIO
EXPERIMENTAL”*

Dr. Jorge Salas Hernández

Director de Enseñanza

M. en C. J Raúl Olmos Zúñiga

Tutor de tesis

Dr. José Luis Téllez Becerra

Co-Tutor de Tesis

Q.F.B. Matilde Baltazares Lipp

Co-Tutor de tesis

Dr. Claudia Hernández Jiménez

Co-Tutor de tesis

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Rogelio Jasso Victoria

Dr. Miguel Gaxiola Gaxiola

Dra. Avelina Sotres Vega

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Gracias a Dios, por permitirme estar aquí y ahora, por darme la dicha de terminar una etapa más en vida personal y académica.

A mi esposa, por su amor, cariño, apoyo y por la noticia que en unos meses nacerá mi hijo.

A mis padres, que me han dado la vida y que siempre están a mi lado.

A mis hermanos, por que han sido y siguen siendo las personas con las que puedo contar incondicionalmente.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

A mis compañeros residentes, por compartir conmigo las experiencias, éxitos y vicisitudes día a día, en especial a mis amigos.

A mis maestros, José Luis Téllez Becerra, Alejandro Avalos Bracho, Enrique Guzmán de Alba, José Morales Gómez, Hilda Patiño Gallegos, Erick Céspedes Meneses, Rebeca Armenta, Juan Carlos Vázquez Minero, Pablo Rueda Villalpando; que han contribuido enormemente a mi formación como cirujano torácico.

A todo el departamento de Cirugía Experimental de la Unidad de Investigación del INER; al Rogelio Jasso Victoria, J. Raúl Olmos Zúñiga, a Claudia Hernández Jiménez, a Sarahi Sánchez, Jaime Villalba Caloca, Matilde Baltazares Lipp, Sergio, Roberto y todo el resto del personal por abrirme las puertas de su lugar de trabajo y por enseñarme que la investigación es un complemento extraordinario para la vida de cualquier profesionista y que el laboratorio de cirugía experimental es una parte fundamental para la formación del cirujano torácico general. En especial a mi tutor J. Raúl Olmos Zúñiga por su entusiasmo y profesionalismo.

Esta tesis representa el final de un ciclo, de una etapa llamada residencia, una etapa que en este caso dura 4 años y que durante esta etapa se presentaron momentos muy importantes en mi vida profesional y personal; considero que lo supe aprovechar y disfrutar al máximo. Gracias.

Tipificación de la colágena producida en la cicatrización traqueal postraqueoplastía, después de la aplicación de diferentes moduladores de la cicatrización en la anastomosis traqueal. Estudio experimental.

RESUMEN.

Las estenosis traqueales se presentan por un desbalance entre la deposición de colágena tipo I, II y III en la cicatriz. En la literatura se ha reportado que varios fármacos disminuyen las estenosis traqueales, pero no se ha reportado que tipo de colágena se expresa con su uso. El objetivo de este trabajo fue Tipificar la colágena formada en la cicatriz de una traqueoplastía después de la aplicación de ácido hialurónico (AH), colágeno polivinil pirrolidona (CPVP), mitomicina C (MC) y una mezcla de AH con CPVP en un modelo experimental canino. Material y métodos: En 6 grupos de perros con una n=6 se realizó traqueoplastía cervical y se aplicó tópicamente el fármaco a evaluar: Grupo I: SSF, Grupo II: FSB, Grupo III: AH, Grupo IV: CPVP, Grupo V: AH-CPVP y Grupo VI: MC. A todos los animales se les realizó evaluación clínica y endoscópica. Al finalizar el estudio se realizó evaluación microscópica, cuantificación de la colágena formada mediante el método de Woessner e inmunohistoquímicamente se tipificaron las colágenas formadas en la cicatriz traqueal. Resultados: La aplicación del tratamiento promueve el desarrollo microscópico de fibras de colágena bien organizadas. Los perros tratados con AH, CPVP, AH-CPVP y MC mostraron menor cantidad total de colágena por gramo de tejido traqueal en la anastomosis. El FSB, AH, AH-CPVP y la MC disminuyeron la expresión de colágena tipo I en el sitio de la anastomosis y favorecieron la del tipo III; pero no promovieron el de la tipo II. Conclusión. La aplicación tópica postraqueoplastía de FSB, AH, AH-CPVP y MC disminuyen la cantidad total de colágena en la cicatriz, disminuyen la expresión de colágena tipo I, favorecen la del tipo III y no promueven la expresión del tipo II.

Palabras clave: Estenosis traqueales, ácido hialurónico (AH), colágeno polivinil pirrolidona (CPVP), mitomicina C (MC), colágena tipo I, colágena tipo II, colágena tipo III.

I. INTRODUCCIÓN.

Las vías aéreas conductoras (narinas, senos paranasales, laringe, faringe, tráquea y bronquios) son una serie de compartimientos que permiten el movimiento de aire desde su entrada al organismo, hasta el área de intercambio gaseoso de los pulmones, así como para la salida de éste. Las vías aéreas conductoras también tienen función protectora al filtrar partículas como bacterias y polvo que entran con el aire inspirado, calentando y proporcionando humedad al mismo.

La tráquea es un órgano tubular de forma circular que se encuentra sostenida por anillos cartilaginosos en forma de herradura que se conectan por detrás mediante una membrana elástica (1,2), posee una porción extratorácica y otra intratorácica y su función es llevar el aire inspirado ya sea por la nariz o boca hacia las zonas de intercambio gaseoso.

El cartílago es una variedad de tejido conjuntivo, el cual es avascular, y está constituido de una matriz extracelular (que representa más del 95% de su volumen), condrocitos, células condrogénicas, condroblastos y pericondrio.

El cartílago de acuerdo a su contenido de proteínas fibrosas específicas se clasifica en 3 tipos: a) Hialino, b) articular y c) elástico.

El cartílago hialino se encuentra en las superficies articulares de las articulaciones, terminaciones ventrales de la parrilla costal, laringe, anillos traqueales y bronquiales. Este cartílago está formado por una matriz extracelular, capsular o pericelular, matriz territorial y la matriz interterritorial.

La matriz extracelular se compone de moléculas de colágena, proteoglicanos y glicoproteínas multiadhesivas. Las moléculas de colágena representan el 15% del peso total de este tipo de cartílago, siendo el 80% colágena tipo II (3).

Patologías de la tráquea.

Las vías respiratorias sufren varias enfermedades las cuales tienen diversas causas, pero comparten ciertas características fisiopatológicas y clínicas como: la limitación del flujo respiratorio (provocado por la obstrucción intraluminal de la vía respiratoria, engrosamiento de sus paredes o pérdida de la elasticidad de los tejidos intersticiales que es necesaria para conservar la permeabilidad de la vía aérea), hipersecreción de moco, irritabilidad de toda la vía respiratoria y anomalías del intercambio gaseoso que originan tos, producción de esputo, sibilancias y disnea (4).

Los trastornos de las vías aéreas conductoras son principalmente inflamatorios, infecciosos o debidos a alteraciones anatómicas.

Las infecciones producidas por virus o bacterias, así como la inhalación de irritantes o reacciones alérgicas provocan inflamación de estos órganos, denominándose de acuerdo a la estructura anatómica afectada.

Con respecto a las alteraciones anatómicas, éstas se deben a la presencia de neoplasias, traumas, malacias y estenosis traqueales. Representando estas últimas el 92% de las patologías de origen benigno.

Estenosis traqueal.

La estenosis traqueal se define como una disminución anormal en el calibre de la tráquea por retracción cicatrizal o depósito excesivo de tejido fibroso durante la cicatrización. La estenosis traqueal constituye un verdadero problema clínico de obstrucción de vías aéreas superiores y es originada principalmente por el antecedente de intubación orotraqueal, traqueostomía, procedimientos endoscópicos, infecciones, tumores, factores congénitos en la respuesta de cicatrización y condiciones inflamatorias crónicas, mala cicatrización en plastias traqueales (5-9). La estenosis de la tráquea produce signos o síntomas variables dependiendo de la reducción del calibre de la tráquea. La mayoría de los pacientes pueden estar asintomáticos durante un periodo variable después del

retiro del tubo orotraqueal o de la traqueotomía. Posteriormente se puede presentar disnea, inicialmente con el ejercicio, después con reposo, tos, dificultad para la eliminación de las secreciones y estridor. El estridor, sonido de timbre alto, penetrante, es un signo muy importante de estenosis; puede presentarse en reposo o ejercicio, ser inspiratorio, espiratorio o combinado.

En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), como centro de referencia para el tratamiento de la estenosis traqueal, se ha observado en los últimos años, un incremento dramático en el número de pacientes con esta patología, siendo el grupo etáreo más afectado aquel en etapa más productiva, tanto en el sexo femenino como masculino. En la experiencia del Departamento de Cirugía del INER, de 1984 a diciembre del 2000, se presentaron 467 pacientes con diagnóstico de estenosis traqueal por diversas causas, destacando la secundaria a intubación orotraqueal prolongada, el tiempo de intubación muestra un mínimo de 6 horas hasta 78 días como máximo, y el sitio de localización más frecuente es el tercio superior (10).

En el Instituto actualmente la principal causa de estenosis traqueal es el antecedente de intubación orotraqueal (a pesar de que hoy en día se utilizan tubos con balones con baja presión, aunque también se presentan después de una traqueoplastías y seguimos sin saber exactamente porque no todos los pacientes con ese antecedente presentan estenosis traqueal, sin embargo coincidimos con la literatura en que el factor determinante en la producción de una estenosis traqueal es consecuencia de la sobreproducción o mala remodelación de la colágena en alguna de las fases de la cicatrización.

Cicatrización.

La reparación de una herida es una integración de procesos interactivos y dinámicos, cuya secuencia se superpone en el tiempo, por lo que al proceso de cicatrización se le puede dividir en tres fases: a) inflamatoria, b) Proliferativa y c) remodelación tisular.

Fase inflamatoria.

Se presenta inmediatamente después de la producción de la lesión y consiste en la formación del coágulo o tapón hemostático, a través de la cascada de coagulación que inician los elementos formes de la sangre por dos vías principales: la intrínseca y la extrínseca. Ambas llevan a la formación de trombina, enzima que transforma el fibrinógeno en fibrina y causa la coagulación de la sangre, también activa a las plaquetas. El fibrinógeno y los receptores de superficie de las plaquetas se unen y se polimerizan para formar una matriz de fibrina, dando lugar a un trombo.

El coágulo de fibrina junto con la fibronectina proporciona una matriz provisional para la migración de monocitos, fibroblastos y queratinocitos.

A las 6 horas de producida la lesión aparecen los neutrófilos atraídos por estímulos quimiotácticos específicos. Posteriormente, suceden las interacciones “célula-célula” y “célula-matriz”. Así se inicia la función de *fagocitosis* de bacterias y proteínas de la matriz por medio de la liberación de enzimas (hidrolasas, proteasas y lisozimas) y la producción de radicales libres de oxígeno. Finalmente, los neutrófilos quedan atrapados en el coágulo y se disecan con él, y los que permanecen en tejido viable mueren por apoptosis y posteriormente son removidos por los macrófagos o fibroblastos.

Dos o 3 días después de la lesión, se produce el acumulo de monocitos que reemplazan a los neutrófilos. Los monocitos de los vasos, al llegar al tejido se transforman en macrófagos y se unen a proteínas de la matriz extracelular mediante receptores de integrina, promoviendo la fagocitosis.

Los macrófagos cuando están unidos a la matriz extracelular sufren un cambio fenotípico y de células inflamatorias se transforman en células reparadoras que liberan citoquinas o factores de crecimiento (TGF α y β , PDGF, FGF y IGF-1) con un importante papel en la neoformación tisular.

Fase proliferativa.

Consta de los siguientes procesos: Fibroplasia, Angiogénesis y Contracción de la herida.

Fibroplasia.

Los fibroblastos constituyen las células más importantes en la producción de matriz extracelular. A medida que migran, los fibroblastos van depositando una nueva matriz provisional de fibronectina y ácido hialurónico. Desde el tercero al quinto día son estimulados por citoquinas y factores de crecimiento (TGF β , PDGF, TNF, FGF, IL1 e IL4) para comenzar a sintetizar la matriz de colágeno y una vez que se depositó una suficiente cantidad, cesa la producción, debido a que el INF γ y la misma matriz inhiben la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno.

Angiogénesis.

La angiogénesis o formación de tejido de granulación se inicia simultáneamente con la fibroplasia. En la proliferación endotelial tienen un papel especial el VEGF (factor de crecimiento vascular-endotelial) y las angiopoyetinas (Ang). La Ang 2 interactúa con un receptor de las células endoteliales (Tie 2) y disminuyendo el contacto de éstas con la matriz para favorecer la acción del VEGF. Al mismo tiempo la disminución de la tensión de O₂, estimula a los macrófagos para que produzcan y secreten factores angiogénicos.

Se produce el reclutamiento de las células periendotheliales (pericitos y células de músculo liso) que van a estabilizar los vasos recién formados. Este proceso se realiza por la unión de la Ang1 al receptor Tie 2, aumentando el contacto de éstas con la matriz. Otros receptores celulares que intervienen son los de integrina, en especial el α B3, esencial para la formación y mantenimiento de los nuevos vasos.

Contracción de la herida.

Los fibroblastos sufren una serie de cambios fenotípicos. Primero un fenotipo *migratorio*, luego un fenotipo *profibrótico* y posteriormente, alrededor del noveno día del proceso de cicatrización, adoptan el fenotipo de *miofibroblasto*.

La colágena neoformada se une a través de enlaces covalentes cruzados con haces del borde de la herida. Estas uniones crean una red a través de la herida y así la tracción que realizan los fibroblastos a la matriz pericelular se puede transmitir dando como resultado una contracción coordinada. En una herida de espesor completo hay reducción del tamaño en un 40% respecto del tamaño original.

El TGF β estimula la contracción de los fibroblastos, también intervienen la angiotensina, las prostaglandinas, la bradiquinina y la endotelina.

En el último día de la cicatrización los fibroblastos inician su proceso de apoptosis, estableciéndose una transición de una cicatriz rica en fibroblastos y tejido de granulación, a una cicatriz acelular.

Remodelación Tisular.

Comienza al mismo tiempo que la fibroplasia y continúa por meses. La célula principal es el fibroblasto que produce fibronectina, ácido hialurónico, proteoglicanos y colágena durante la fase de reparación y que sirven como base para la migración celular y soporte tisular. Al cabo de 1 año o más, el colágeno tipo III que se depositó durante la reparación es reemplazado por el de tipo I. La degradación del primer colágeno se debe a la acción de las metaloproteinasas de la matriz (colagenasas, gelatinasas y estromalinasas), cuya actividad depende de los iones de zinc y que son estimuladas por los factores de crecimiento y por los componentes de la matriz extracelular.

Al final del proceso la cicatriz adquiere una resistencia máxima del 70% comparada con el tejido sano. La actividad celular disminuye y el tejido conjuntivo cicatrizal se torna rico en colágeno, pobre en células y vasos.

Regeneración traqueal posterior a la lesión.

Los resultados de las investigaciones respecto a la reparación traqueal “in vivo” pueden ser difíciles de interpretar debido a la variación en la cantidad de daño y por ello no existe consenso respecto a los procesos de regeneración.

La formación de tejido de granulación comprende la producción de exudado inflamatorio, con gemación de los capilares sanguíneos y movilización de las células epiteliales, que se posicionan en la superficie cruenta para facilitar su cicatrización; este hecho desde un punto de vista clínico, sobre todo si se produce de una manera exuberante, puede conducir a disminución del calibre de la vía aérea y dificultad para el paso de aire. Por otra parte la retracción inevitable en el tejido conjuntivo cicatricial, conlleva con el tiempo a una mayor o menor estrechez en la vía aérea superior como respuesta a fenómenos reparativos (11-13).

Es importante mencionar que existen tres factores que son determinantes para la reparación del cartílago traqueal y son el tamaño del defecto, madurez del cartílago y la posición del defecto sobre la superficie. Incluso bajo condiciones óptimas la reparación de defectos del cartílago hialino es difícil debido a su bajo grado de división de los condrocitos en comparación con las células que sintetizan la colágena tipo I (tejido cicatrizal) (14).

El tejido cicatrizal traqueal está compuesto principalmente por colágena tipo I que se deposita como fibras de diámetro largo, así que cualquier tejido cicatrizal que se deposita durante la cicatrización del cartílago probablemente afecta las propiedades de reparación del tejido. Por esta razón es importante entender el mecanismo de deposición de tejido cicatrizal y como minimizarlo durante la cicatrización del cartílago (14,15).

En resumen se puede decir que la cicatrización del cartílago traqueal tentativamente es un balance entre la deposición de colágena tipo I en forma de tejido cicatrizal y la reparación por la expresión de colágena tipo II, III y proteoglicanos, así como la severidad de la inflamación del sitio de lesión (14).

Colágena.

La colágena es la proteína más abundante en el humano y es la encargada de mantener unidas las células. Se encuentra prácticamente en todos los tejidos, principalmente en la piel, tendones, vasos sanguíneos, huesos, cartílago, córnea, humor vítreo, dientes, así como en las membranas basales y puede llegar a ocupar un tercio del total de sus proteínas (16).

En el cuerpo humano existen más de veinte tipos de colágenas y aparece como un material altamente ordenado y sus fibras se disponen de manera diferente en cada tejido y de esta manera establecen una arquitectura que contribuye a la resistencia y funcionamiento óptimo de los mismos; por ejemplo en los tendones las fibras de colágena se disponen en forma estrictamente paralela, en los vasos sanguíneos se disponen alrededor de la pared formando redes helicoidales elásticas por eso mantienen su forma tubular, en la piel estas fibras se entrelazan sin mucha cohesión y se extienden en todas direcciones, en la córnea la colágena está tan perfectamente organizada en haces paralelos que es casi cristalino.

El conocimiento de la estructura molecular, la biosíntesis, el ensamblaje y la regeneración de la colágena resulta de gran importancia para lograr entender muchos pasos del desarrollo embrionario, así como procesos patológicos ligados con enfermedades humanas. La exploración de la expresión y la función de diferentes tipos de colágenas también contribuyen a un mejor entendimiento de enfermedades basadas en defectos moleculares de la colágena. Además, la degradación de la esta misma y los defectos de su metabolismo son factores importantes en el curso de enfermedades, por lo que el conocimiento de las propiedades de los diferentes tipos de colágenas puede aportar grandes beneficios en la terapia de estas enfermedades (17).

Estructura de la colágena.

La unidad básica de la fibra de colágena es el monómero de colágena, el cual tiene la forma de varilla, de unos 300 nm de longitud y 1.5 nm de diámetro. Esta molécula está compuesta por tres hélices polipéptídicas levógiras denominadas

cadena α , cada una de ellas con aproximadamente 1000 aminoácidos entre los que sobresalen la prolina, hidroxiprolina y glicina. Estas hélices se enrollan entre sí y forman una superhélice dextrógira en la que las hélices polipeptídicas y la superhélice de tropocolagena están enrolladas en sentidos opuestos, la superhélice se encarga de evitar el desenrollamiento de las tres cadenas polipépticas.

La dirección de la hélice en el enrollamiento de orden superior es opuesta al giro de las cadenas polipeptídicas individuales, con lo que se consigue una conformación que permite el empaquetamiento más íntimo posible entre las múltiples cadenas polipépticas. El estrecho empaquetamiento de la triple hélice de la colágena proporciona una gran fuerza de tensión, sin ninguna capacidad de estiramiento. Las fibras de colágena pueden soportar hasta 10000 veces su propio peso.

Biosíntesis de la colágena.

La biosíntesis de las cadenas α del tropocolágena y su ensamblaje para generar fibras de colágena transcurre en una secuencia de etapas bien ordenadas en las que al menos intervienen ocho enzimas específicas y varias enzimas inespecíficas que transforman las proteínas. La mayor parte de la información acerca de la biosíntesis y ensamblaje de la colágena proviene de estudios sobre la biosíntesis de la colágena tipo I, que probablemente sirve como paradigma para el resto de las colágenas.

1.- Estructura de la procolágena.

Todas las colágenas se sintetizan en forma de un precursor intracelular conocido como procolágena, la cual está formada por polipéptidos (cadenas pro- α) que son significativamente más grandes que las cadenas α de las fibrillas extracelulares (18-21).

2.- Hidroxilación de prolina y de lisina.

Una vez sintetizadas, las moléculas de procolágena sufren varias modificaciones postraduccionales. Los residuos de prolina y de lisina de la molécula de procolágena son hidroxilados para dar 4-hidroxi prolina, 3-hidroxi prolina y 5-hidroxi lisina. Estas modificaciones ocurren mientras las cadenas peptídicas aún están unidas a los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso.

3.-Glicosilación de hidroxilisina.

Tras la hidroxilación tiene lugar la adición de azúcares sobre los residuos de hidroxilisina. Los principales monosacáridos presentes en las colágenas de vertebrados son la galactosa y la glucosa (22). La glicosilación también tiene lugar en la luz de retículo endoplásmico.

4.-Ensamblaje de la triple hélice.

Las extensiones peptídicas carboxilo-terminales tienen una función esencial en el ensamblaje de las tres cadenas α para formar los monómeros de colágena. La formación de la triple hélice está precedida por el alineamiento de los dominios carboxilo-terminales de las tres cadenas pro- α , desde donde se inicia la formación de la triple hélice que progresa hacia el extremo amino-terminal a modo de cremallera.

Las cadenas de procolágena se agrupan formando haces de tres cadenas en la luz de las vesículas del aparato de Golgi.

5.- Secreción de la procolágena.

Después del ensamblaje, las moléculas de procolágena son empaquetadas en el aparato de Golgi en gránulos de secreción y son secretadas a la matriz extracelular.

6.- Procesamiento de la procolágena.

Tras la secreción, las moléculas de procolágena son procesadas. Las procolágena peptidasas que se encuentran en la matriz extracelular, eliminan las extensiones peptídicas de los haces de procolágena, dejando sólo la triple hélice de tropocolágena con aproximadamente 1000 residuos.

7.- Formación de microfibrillas.

Una vez eliminadas las extensiones peptídicas se producen moléculas de tropocolágena que se agregan para formar microfibrillas insolubles. Las fibras de colágena inmaduras, o microfibrillas, se forman por agregación espontánea de las moléculas de tropocolágena en la matriz extracelular, cerca de la superficie de las células.

8.- Formación de entrecruzamientos y agrupación de las microfibrillas.

La última parte de la síntesis de la colágena es el entrecruzamiento de las triples hélices de tropocolágena, y la estabilización de las fibrillas maduras de colágena. La reacción que inicia la formación de estos puentes intermoleculares es la desaminación oxidativa de residuos de lisina o hidroxilisisna. Los aldehídos producidos se condensan con otros residuos de lisina, hidroxilisisna o hidroxilisisna glicosilada, estratégicamente colocados, para formar enlaces al-imina o ceto-imina que confieren a las fibrillas una alta resistencia a la tensión.

El grado de entrecruzamiento de la colágena aumenta con la edad.

Las colágenas tipo I, II, y III forman fibrillas con estructuras similares. Sin embargo, otras colágenas son mayores o menores y se agregan de diferentes maneras.

Tipos de colágena.

El nombre de colágena [del griego κολλα (cola) y γεννω (engendrar)] se utiliza como un término genérico para denominar proteínas que forman una triple hélice característica de tres cadenas polipeptídicas. Todos los miembros de la familia de la colágena forman estas estructuras supramoleculares en la matriz extracelular, aunque su tamaño, función y distribución tisular varía considerablemente. De esta forma, se han descrito 26 tipos de colágenas genéticamente distintas.

Por lo tanto, las colágenas pueden ser consideradas como una familia de proteínas. La principal subclasificación de estas se basa en los tipos “fibrilar” y “no fibrilar”. Los colágenos fibrilares forman fibrillas características que son rápidamente identificadas por sus estriaciones transversales y proporcionan la tensión requerida para mantener unidos a los tejidos. La colágena no fibrilar forma una estructura reticular que sirve como almacén para la unión de células epiteliales y endoteliales o como una barrera de filtración en tejidos. La diferencia más importante entre la colágena no fibrilar y la fibrilar es que los monómeros del primero contienen grandes unidades globulares, lo que implica que los monómeros de colágena no fibrilar se autoensamblan formando estructuras más complejas que las que se encuentran ordinariamente dispuestas en la colágena fibrilar.

Las colágenas de los tipos I, II y III son las principales fibrilares. El tipo I se encuentra en muchos tejidos conectivos, entre los que se incluyen la piel, los huesos, los tendones y los ligamentos. El tipo II es el principal tipo de colágena del cartílago hialino. El tipo III es menos abundante que los tipos I y II, pero se pueden encontrar pequeñas cantidades en los tejidos que contienen el tipo I, con excepción del hueso y el tendón, y representa aproximadamente la mitad de la colágena total en los principales tejidos del sistema cardiovascular como las válvulas cardíacas y las principales arterias.

A pesar de la gran diversidad estructural entre los diferentes tipos de colágena, todos los miembros de esta familia tienen características comunes: la triple hélice dextrógira compuesta de tres cadenas α . Esta triple hélice puede estar compuesta por tres cadenas idénticas (homotrímeros) como en las colágenas II, III, VII, VIII, X y otros, o por dos o más cadenas diferentes (heterotrímeros) como en las colágenas de los tipos I, IV, V, IX y XI.

Colágenas I, II, III, V y XI (Colágenas formadoras de fibrillas).

Todos estas colágenas son similares en tamaño y se caracterizan por tener grandes dominios de triple hélice con alrededor de 1000 residuos de aminoácidos o 330 repeticiones Gly- X- Y por cadena. Además, son sintetizados como grandes precursores, que necesitan ser procesados hasta colágenas mediante la intervención de las procolágenas peptidasas. Estas colágenas se caracterizan por su capacidad para ensamblarse formando agregados supramoleculares altamente orientados con una estructura característica, la típica organización de fibras escalonadas con diámetro de entre 25 y 400 nm. En el microscopio electrónico, las fibrillas se definen por un patrón de bandas característico con una periodicidad de aproximadamente 67 nm (llamada periodo D) debido a la disposición escalonada de los monómeros de colágeno individuales.

Colágena tipo I es la más abundante y estudiada de esta familia. Constituye más del 90% de la masa orgánica del hueso y es la principal colágena de los tendones, la piel, los ligamentos, la córnea y muchos tejidos conectivos intersticiales con excepción del cartílago hialino, el cerebro y el humor vítreo. La triple hélice de la colágena tipo I es un heterotrímero formado por dos cadenas idénticas $\alpha 1$ (I) y una cadena $\alpha 2$ (I). Las fibras helicoidales, *in vivo*, suelen encontrarse entremezcladas con las fibras de colágena tipo III (en la piel y las fibras reticulares) o colágena tipo V (en el hueso, los tendones y la córnea). En la mayoría de órganos, y fundamentalmente en los tendones, la colágena tipo I proporciona rigidez a la tensión y en el hueso, es responsable de las propiedades biomecánicas relacionadas con la resistencia a la carga y la tensión.

Colágena tipo II es el componente característico y predominante del cartílago hialino. En comparación con la colágena tipo I, las cadenas de la tipo II muestran un contenido en hidroxilisina mayor, así como residuos de glucosa y galactosa que median la interacción con proteoglicanos, otro componente típico de la matriz del cartílago hialino. Forma una red de fibrillas entre las que se encuentran moléculas de proteoglicanos. Sin embargo, no es exclusivo del cartílago, donde representa un 80% de la colágena total, ya que también se encuentra en el humor vítreo, el

epitelio de la córnea, la notocorda, el núcleo pulposo de los discos intervertebrales y el epitelio embrionario. La triple hélice de la colágena tipo II está formada por tres cadenas $\alpha 1$ (II) formando una molécula homotrimérica de tamaño y propiedades biomecánicas similares a las de la tipo I. En el cartílago también se encuentran colágenas tipo IX y XI, los cuales se cree que actúan limitando el diámetro de las fibrillas de colágena tipo II a 15-50 nm.

Colágena tipo III es un homotrímero de tres cadenas $\alpha 1$ (III) y está ampliamente distribuido en todos los tejidos que contienen colágena tipo I excepto en el hueso y en los tendones. Es un componente importante de las fibras reticulares en el tejido intersticial de los pulmones, el hígado, la dermis, el bazo y los vasos sanguíneos.

Degradación de la colágena.

La degradación de las moléculas de colágena se lleva a cabo por enzimas altamente específicas conocidas originalmente como colagenasas. Estas enzimas son parte de una familia de moléculas conocidas como metaloproteinasas de la matriz extracelular.

Este grupo de enzimas son responsables de la degradación de moléculas de la matriz extracelular tales como la gelatina, los diferentes tipos de colágena, los proteoglicanos, la laminina, la fibronectina y la elastina.

Las características de las MMP son:

1. Son sintetizadas y secretadas por células hematopoyéticas y del tejido conjuntivo.
2. Todas las MMPs son proteínas y sus secuencias de aminoácidos determinadas de sus cDNA, revelan que están constituidas por un predominio, responsable de mantener su latencia enzimática; un dominio catalítico, el cual se cree ser el sitio de unión del zinc; y un dominio carboxiterminal.
3. Su actividad enzimática es mayor a pH cercano a la neutralidad

4. Su mecanismo catalítico es dependiente del zinc y calcio
5. Se secretan en forma de zimógeno
6. Los zimógenos pueden ser activados por proteasas o por organomercuriales
7. La regulación de las MMPs ocurre no sólo a nivel de expresión genética, sino también extracelularmente, después de su secreción, por inhibidores específicos. El principal es el inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP) (23).

Tratamiento de las estenosis traqueales.

El tratamiento de las estenosis traqueales es variado siendo el Standard de oro la traqueoplastía con anastomosis termino terminal sin embargo se han practicado diversos procedimientos como las dilataciones con balón o cánulas, la colocación de los distintos tipos de férulas intratraqueales (silastic o metálicas expandibles) y la permeabilización con láser, pero desafortunadamente estas han sido solamente de tipo paliativo (5,6,24).

Se estima que el porcentaje de reestenosis traqueal posterior a un procedimiento de traqueoplastía con anastomosis termino terminal varía entre el 5%-20% (25).

Otra alternativa de tratamiento que se ha utilizado es la aplicación de fármacos como los esteroides, mitomicina C (MC), antiinflamatorios no esteroides y agentes latirógenos, con el fin de modular el proceso de cicatrización y prevenir la formación de una cicatriz excesiva (26-28).

En el departamento de cirugía experimental del INER se ha utilizado con éxito el ácido hialurónico (AH), la colágena polivinil pirrolidona y la combinación de ambos en diferentes protocolos experimentales.

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 (29) 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 (30), regeneración de las heridas de la mucosa nasal (31), para prevenir la formación de adherencias intraabdominales postquirúrgicas (32) y como expansor tisular en la piel (33). También se ha observado en estudios experimentales que este medicamento evita las estenosis traqueales (13).

La colágena polivinil pirrolidona (CPVP) es un fármaco que existe en forma de esponja e inyectable y está constituido por una mezcla de colágena porcina tipo I irradiada con rayos gamma y polivinil pirrolidona (CPVP), el cual tiene actividad fibrinolítica y actúa como remodelador de procesos fibrosos debido a que inhibe la expresión de moléculas de adhesión (ELAM-1, VCAM-1), así como de citocinas proinflamatorias y fibrogénicas (IL-1 β , TNF- α , TGF-1 β y PDGF-AB) (34). Clínicamente la aplicación intralesional semanal (vida media del fármaco) del medicamento ha tenido éxito para el tratamiento de cicatrices queloides e hipertróficas, fibrosis dérmicas y de tendones, ya que disminuye el volumen de la cicatriz, desaparece el infiltrado inflamatorio y restablece la arquitectura normal de la cicatriz tratada (35,36). Experimentalmente se ha observado que disminuyen las adherencias intraabdominales (37) y su uso postraqueoplastía sola o en combinación con el AH disminuye la cantidad de colágena formada por gramo de tejido traqueal en el sitio de la anastomosis y provoca que la consistencia del tejido traqueal sea más firme que la del tejido normal (32,38,39).

Aunque en la literatura se ha reportado que tanto la mitomicina C como los esteroides, AH y CPVP disminuyen la cantidad de colágena formada por gramo de tejido traqueal, hasta la fecha no se ha reportado el tipo de colágena que se expresa en la cicatriz traqueal después de su aplicación, lo cual podría ser un aspecto importante para establecer nuevas alternativas de tratamiento para bloquear la deposición de estas y evitar las estenosis traqueales postraqueoplastia.

II. JUSTIFICACION.

La cicatrización de lesiones traqueales dependen de un balance entre la deposición de colágena tipo I en forma de tejido cicatrizal, la reparación por la expresión de colágena tipo II, III y proteoglicanos, sin embargo en ocasiones la expresión de la primera llega a ser superior que la II, lo que provoca estenosis traqueal. En la literatura se ha reportado que el AH, CPVP y la MC, disminuyen las estenosis traqueales y reacción inflamatoria; sin embargo en ningún estudio se menciona el efecto de estos sobre la expresión de los diferentes tipos de colágena de la cicatriz traqueal. En este trabajo se propuso estudiar los tipos de colágena que se expresan después aplicar diferentes moduladores de la cicatrización en un modelo experimental canino postraqueoplastía.

III. HIPÓTESIS.

El AH, CPVP y la MC son moduladores de la cicatrización que disminuyen la formación de cicatrices fibroticas, por lo que se puede pensar que la aplicación de éstos después de realizar una traqueoplastía en perros, evita al 100% la expresión de la colágena tipo I en la cicatriz traqueal y con esto las estenosis traqueales postquirúrgicas.

IV. OBJETIVO GENERAL.

Tipificar la colágena formada en la cicatriz de una traqueoplastía después de la aplicación de AH, CPVP, MC y una mezcla de AH-CPVP en un modelo experimental canino.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Valorar la presencia de colágena tipo I, II y III formada en la cicatriz de una traqueoplastía después de la aplicación de AH, CPVP y MC en un modelo experimental canino.
- Valorar los cambios endoscópicos que sufre la anastomosis traqueal post aplicación de AH, CPVP y MC, después de realizar una traqueoplastía en perros.
- Evaluar los cambios macroscópicos y microscópicos producidos por el AH, CPVP y MC sobre la cicatriz formada, después de realizar una traqueoplastía en perros.
- Determinar la cantidad de colágena formada en la tráquea, postraqueoplastía, en perros tratados AH, CPVP y MC.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

Animales de experimentación.

Se utilizaron 36 perros mestizos, sanos, sin importar el sexo o la edad, con un peso entre 15 y 18 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 (40) y de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos (41).

Criterios de inclusión.

Se incluyeron perros clínicamente sanos, que no presentaron antecedentes de alguna enfermedad respiratoria desde su llegada al bioterio del INER"ICV" y antes de que se les realizará la cirugía.

Criterios de exclusión.

Los animales con datos clínicamente patológicos a su llegada al INER"ICV" y previos al procedimiento quirúrgico o con antecedentes de alguna cirugía de cuello, fueron excluidos del estudio.

Criterios de eliminación.

Todo animal que presento signos clínicos de cualquier patología que no fuera provocada por el procedimiento quirúrgico, fue eliminado.

Grupos de Estudio.

Los animales fueron divididos en 6 grupos de estudio:

Grupo I (n=6): Resección de tres anillos traqueales cervicales y traqueoplastía convencional con aplicación intraluminal de solución fisiológica.

Grupo II (n=6): Resección de tres anillos traqueales cervicales y traqueoplastía convencional con aplicación intraluminal de fosfato sódico de betametasona (FSB).

Grupo III (n=6): Resección de tres anillos traquéales cervicales y traqueoplastía convencional con aplicación intraluminal de ácido hialurónico.

Grupo IV (n=6): Resección de tres anillos traquéales cervicales y traqueoplastía convencional con aplicación intraluminal de colágeno polivinil pirrolidona.

Grupo V (n=6): Resección de tres anillos traquéales cervicales y traqueoplastía convencional con aplicación intraluminal de ácido hialurónico más colágeno polivinil pirrolidona.

Grupo VI (n=6): Resección de tres anillos traquéales cervicales y traqueoplastía convencional con aplicación intraluminal de mitomicina C

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) a dosis de 0.1 mg/Kg. y 6 mg/kg. de propofol (Recofol, PISA) vía intravenosa (IV) mezclados en la misma jeringa e inmediatamente después se les aplicó dipirona (Metamizol Sódico-Nondol-Sector Salud) a dosis de 28 mg/Kg. IV como analgésico (42).

Una vez anestesiados, los animales se colocaron sobre la mesa de cirugía en posición decúbito dorsal y se intubaron con una sonda orotraqueal con globo Rush México D.F. de alto volumen y baja presión medidas entre 5 y 7 Fr dependiendo del tamaño del perro, la cual se conectó a un ventilador de volumen (Harvard Apparatus, Boston MA, USA) con un vaporizador (Isotec 3 Ohmeda) y la anestesia se mantuvo con Isoflurano al 1.5%. Todos los animales se ventilaron con un volumen corriente de 10 ml/Kg, una fracción inspirada de oxígeno (FiO₂) de 100% y 20 respiraciones por minuto, durante todo el procedimiento quirúrgico sus signos vitales se vigilaron con un monitor para electrocardiografía (Datascope Passport).

Técnica quirúrgica.

Se realizó una incisión media en la región cervical ventral, se disecó el tejido celular subcutáneo y platisma hasta llegar a los músculos infrahioideos (esternohioideo y esternotirohioideo) los cuales se separaron en la línea alba hasta llegar a la tráquea, esta se disecó en toda su circunferencia (Figura 1) y se resecaron tres anillos traqueales a nivel medio de la tráquea cervical (3º, 4º y 5º anillos) (Figura 2 y 3), se introdujo una cánula orotraqueal en la porción distal de la tráquea para mantener la ventilación y finalmente se realizó anastomosis término terminal con material absorbible 3 ceros (PDS, Ethicon, New Jersey USA) con puntos separados (Figura 4). Terminada la traqueoplastía se cerró por planos sin dejar drenaje. A todos los animales se les administró antes de la cirugía y durante 5 días enrofloxacin (5 mg/Kg) (Baytril, Bayer, Leverkusen, Germany) intramuscular y metamizol sódico (28 mg/Kg) (Metamizol sódico, Pisa agropecuario S.A. de C.V. Tula, Hidalgo, México) IM como analgésico trans y postquirúrgico (42).

Tratamiento.

En los grupos I, III, IV y V, el tratamiento se aplicó inmediatamente después de la cirugía y cada semana durante 3 semanas, en el resto de los grupos (II y VI) el tratamiento únicamente se aplicó durante el procedimiento quirúrgico.

Para la aplicación del tratamiento en los grupos I, III, IV y V, todos los animales fueron sometidos a anestesia general y mediante endoscopia se les instiló el fármaco en el sitio de la anastomosis (Figura 5). En los animales del grupo I se instilaron 3 mililitros de solución fisiológica. En el grupo II se instiló 2ml (8mg) de fosfato sódico de betametasona en la mucosa traqueal. En el grupo III se instiló 15 microgramos de ácido hialurónico diluidos en 3 ml de agua destilada (dosis usada para evitar adherencias intraabdominales y estenosis uretrales e intestinales y para prevenir las estenosis traqueales) (13). Los animales del grupo IV recibieron 28.2 mg de CPVP (que es la dosis utilizada para los problemas de piel y tendones y experimentalmente en estenosis traqueales crónicas) diluidos en

3 ml de solución salina al 0.9% (SSF) (38,43). Mientras que en el grupo V se instilaron una combinación de AH y CPVP a la dosis antes mencionada (39). En los animales del grupo VI se instilaron directamente sobre ambos extremos de la tráquea reseca (antes de llevar a cabo la anastomosis) 1.2 mg de mitomicina C, diluidos en 3 ml de SSF (dosis utilizadas para las estenosis traqueales) y 5 minutos después de haber sido instilada, la tráquea fue lavada nuevamente con SSF (5).

Evaluación.

Clínica.

El estudio tuvo una duración de 4 semanas y se realizó evaluación clínica diaria durante la primera semana posquirúrgica y cada tercer día, durante 3 semanas restantes del estudio. Se evaluó el grado de disnea de acuerdo a una escala modificada a la utilizada por la Medical Research Council (44), la cual se basa en la severidad de ésta: 0= sin dificultad para respirar después de correr, 1= dificultad para respirar después de correr, 2= dificultad para respirar en reposo.

Endoscópica.

En todos los animales se realizó evaluación visual directa de la anastomosis traqueal mediante traqueoscopia, previo a la cirugía y cada tercer día durante todo el tiempo de estudio. En esta se evaluó el estado de la anastomosis, así como la presencia o no de estenosis. Los procedimientos se videograbaron con una videocassetra VHS. La presencia de estenosis se valoró de acuerdo a la escala descrita La presencia de estenosis se valorará de acuerdo a la escala descrita por Freitag y col. (45): Grado 1 = 0 – 25 % estenosis, Grado 2 = 26 – 50 %. Grado 3 = 51 - 75 y Grado 4 = 76 – Luz no detectable.

Macroscópica.

Una vez transcurridas 4 semanas postcirugía los animales fueron sometidos a eutanasia con sobredosis de pentobarbital sódico (Anestesal) (42) y se realizó evaluación macroscópica y microscópica de la anastomosis.

Macroscópicamente se revisó el estado de la anastomosis, la cicatrización extraluminal, la presencia de dehiscencia, infección, así como la formación de fístulas. Para evaluar el estado de la mucosa, el lumen y la cicatriz de la tráquea, se retiró el segmento anastomosado y se incidió por la parte membranosa de la tráquea para evaluar la estenosis y tipo de cicatriz formada.

Microscópica.

Para la evaluación microscópica se tomaron muestras de los sitios de anastomosis y se fijaron en formaldehído al 10%, se incluyeron en parafina, se les realizaron cortes de 4_M y se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómica de Massón para evaluar la presencia de vasos de neoformación, inflamación o fibrosis.

Bioquímica.

En la evaluación bioquímica se determinó la concentración de hidroxiprolina por gramo de tejido traqueal. La determinación se realizó por el método de Woessner (23,46) en dos muestras de la misma traquea, la primera de ellas se tomó inmediatamente después de la traqueoplastia, mientras que la segunda muestra se tomó cuando el estudio concluyó. 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 aforo 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.

Determinación de los tipos de colágena.

La determinación de los tipos de colágena se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica en anillos traqueales tomados durante la cirugía (pretratamiento) y al final del estudio,(postcirugía), estos anillos traqueales se procesaron como para histología, se les realizaron cortes de 3 micras y se montaron en las laminillas silanizadas, posteriormente se desparafinaron durante 20 minutos a 80 °C y se deshidrataron mediante transferencia en xilol 5 minutos a alcohol absoluto durante 1 min., después se colocaron en la cámara de recuperación de antígenos con buffer de citratos pH: 6. Inmediatamente se colocaron en baño María durante 30 minutos, se dejó enfriar y se lavaron con

TBST 3 veces por 3 minutos. La peroxidasa endógena se removió con suero bloqueador y peróxido de hidrógeno durante 10 min., se lavo nuevamente con TBST. Una vez eliminada la peroxidasa endógena, la determinación se realizó utilizando el sistema Biotina-Streptavidina-peroxidasa, (Vectastain Universal Quick Kit, Burlingame,CA), las secciones de tejido fueron incubadas con el anticuerpo primario para cada colágena diluido en un buffer (suero bloqueador) durante 24 horas a 4°C, pasado este tiempo las laminillas fueron lavadas nuevamente con TBST 3 lavados de 3 minutos cada uno y se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo biotilado universal (Vectastain Universal Quick Kit, Burlingame,CA) 10 minutos, lavándose al final 3 tiempos 3 minutos cada tiempo, fueron incubadas con streptavidina/peroxidasa (Vectastain Universal Quick Kit Burlingame,CA) por 10 minutos y se lavaron como ya se describió, se utilizó AminoetilCarbazol (AEC substrate Pack Biogenex, San Ramón CA, USA) como revelador durante 5 minutos y finalmente se trataron con Hematoxilina para virar el contraste.

La expresión del tipo de colágena se evaluó utilizando un método semicuantitativo basado en el grado e intensidad de la expresión de las mismas: Grado 0: Sin expresión, Grado I: Expresión leve solo en algunos focos de la tráquea con tinción débil, Grado II: Expresión y tinción moderada en más del tejido y Grado III: Expresión y tinción severa en toda la extensión del corte.

El análisis estadístico del grado de disnea, estenosis, inflamación, fibrosis y tipificación de la colágena se llevó a cabo con la prueba de Kruskall-Wallis, mientras que para la determinación cuantificación de la colágena se realizó mediante las pruebas de ANDEVA y Tukey Kramer. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

VII. RESULTADOS.

Hallazgos clínicos.

Todos los animales sobrevivieron al procedimiento quirúrgico y al tiempo de estudio establecido sin ninguna diferencia clínica importante. Solamente 3 (50%) animales tratados con SSF (grupo I) mostraron estridor al ladrido, sin que éste afectara su ventilación.

Hallazgos Endoscópicos.

En todos los casos se observó cicatrización de los bordes de la anastomosis traqueal a los 7 días posteriores al procedimiento quirúrgico.

El 100% de los animales del grupo I (SSF) (Figura 6), y VI (MC) (Figura 7), mostraron la mucosa traqueal edematosa e hiperémica durante las 2 primeras semanas del estudio y desapareció en la tercera semana, solo se mantuvo así en un animal tratado con SSF hasta el final del estudio. En los grupos II (FSB) (Figura 8), III (AH) (Figura 9) y IV (CPVP) (Figura 10) la mucosa se observó de esta manera durante los primeros 5 días, mientras que en el grupo V (Figura 11) solo durante los primeros 3 días postcirugía, en estos animales la tráquea se observó de apariencia normal a la segunda semana postraqueoplastía.

Tres animales (50%) del grupo I mostraron estenosis grado II de la anastomosis, 2 en la segunda semana y 1 en la tercera, la cual permaneció hasta el final del estudio, durante la traqueoscopia se pudo observar que el tejido que producía la estenosis era de consistencia firme, difíciles de atravesar con el endoscopio y tendían a sangrar al intentar pasar este instrumento. Solo un animal (16.7%) del grupo III desarrollo estenosis grado I de la anastomosis a la segunda semana postcirugía, la cual era laxa y permitía el paso del endoscopio sin dificultad. En todos los animales que no desarrollaron estenosis, una vez que desaparecieron el edema y la hiperemia mostraron una evolución endoscópica satisfactoria hasta el final del estudio.

Al correlacionar la evolución endoscópica dentro de cada grupo y entre grupos, se pudo observar que las tráqueas a las que se les aplicó SSF presentaron mayor porcentaje de estenosis (Kruskall-Wallis $p < 0.05$).

Hallazgos Macroscópicos.

Al final del estudio, macroscópicamente en ningún grupo se observó dehiscencia, infección o fístulas. En todos los grupos, la anastomosis estaba bien cicatrizada. En el 100% de los animales del grupo I se observó presencia de abundante tejido fibroso de consistencia firme. En los grupos II, III (Figura 12), IV (Figura 13) y VI (Figura 14) en todos los perros se apreció desarrollo de tejido fibroso moderado de consistencia laxa, así como la presencia de aparentes vasos de neoformación a nivel de la anastomosis, tanto sobre el cartílago como sobre la mucosa traqueal. Además en el grupo V (Figura 15) se observó desarrollo de tejido fibroso moderado pero de consistencia firme, así como vasos de neoformación tanto en la mucosa como en el cartílago del segmento traqueal anastomosado. Además en los animales tratados con la mezcla de AH-CPVP (grupo V) el sitio de la anastomosis se palpó de una consistencia muy firme (duro).

Hallazgos Microscópicos.

Histológicamente en todos los casos (100%) del grupo I se observó fibrosis, caracterizada por la formación de nuevas fibras de colágena gruesas y desordenadas, 2 de estos animales (33.3%) presentaron inflamación leve en la lamina propia. Los otros 4 animales (66.6 %) en todas las capas de la tráquea, mostraron inflamación severa a base de linfocitos, con presencia de células gigantes a cuerpo extraño en la zona de las suturas (Figura 16).

Los animales del grupo II, presentaron fibrosis moderada a base de fibras de colágena gruesa y bien organizada, en todos los casos el cartílago se observó con desorganización de sus estructuras histológicas. Además, cinco (83.3%) de los seis perros operados desarrollaron inflamación moderada a base de linfocitos en la zona de las suturas, un animal (16.6%) mostró una inflamación severa a base de neutrófilos en la zona de sutura.

En los animales del grupo tratado con AH (grupo III), 4 perros (66.6 %) mostraron desarrollo de nuevas fibras de colágena densa, delgada y bien organizada, así como fibras elásticas, también presentaron reacción inflamatoria leve en la submucosa serosa y lámina propia de la tráquea (Figura 17), en dos de éstos perros (33.3%) se observó hemorragia en el epitelio y lámina propia. Además un animal de este grupo (16.6%), se presento reacción inflamatoria intensa a base de linfocitos en todas las capas de la tráquea, con reacción granulomatosa al material de sutura y formación de fibras de colágena gruesas y desordenadas.

Los estudios histológicos de los 6 animales (100%) del grupo IV (CPVP) mostraron depósitos de nuevas fibras de colágena gruesas y bien organizadas, vasos de neoformación y hemorragia de la serosa, el 33% de estos animales (n=2) desarrollo una reacción inflamatoria leve a base de linfocitos en la lamina propia, además 1 perro (16.6%) mostró fibrosis en la serosa (Figura 18).

En todos (100%) los animales del grupo V, se observó el desarrollo de fibras de colágena bien organizadas, delgadas y fibras elásticas con poco desarrollo de vasos de neoformación (Figura 19). En cuatro animales (66.66%) todas las capas de la tráquea mostraron abundante inflamación con infiltrado de linfocitos.

Los 6 animales (100%) del grupo VI mostraron buena cicatrización, caracterizada por pocas fibras de colágena, delgadas y bien organizadas. El cartílago traqueal se observó normal a excepción de la zona en la que se llevó a cabo la anastomosis (Figura 20), la cual mostró degeneración del mismo. También se apreciaron zonas de pérdida del epitelio en el sitio de la anastomosis. En todos los casos se desarrollo inflamación mínima a base de linfocitos en la zona de las suturas.

Hallazgos Bioquímicos.

Al cuantificar bioquímicamente la cantidad de colágena por mg de tejido traqueal se observó que en los grupos I (SSF), II (FSB) y III (AH), esta se incremento después de la traqueoplastía, sin embargo este incremento solo fue significativo en el grupo I (Andeva $p < 0.05$, Tukey/Kramer $p < 0.05$) (Cuadro 1).

En los grupos IV (CPVP) (Andeva $p < 0.05$, Tukey/Kramer $p < 0.01$) V (AH-CPVP) y VI (M C) (Andeva $p < 0.05$, Tukey/Kramer $p < 0.01$), la cantidad de colágena formada poscirugía y postratamiento disminuyó significativamente en comparación con sus anillos controles (Cuadro 1).

Al comparar entre grupos, todos los grupos (II, III, IV Andeva $p < 0.01$, Tukey/Kramer $p < 0.05$) (V y VI Andeva $p < 0.001$, Tukey/Kramer $p < 0.01$) formaron menos colágena después de la cirugía que el grupo I (Cuadro 1).

Al final del estudio no se observó diferencia en la cantidad de colágena formada entre los grupos V y VI ($p = \text{NS}$), sin embargo estas mostraron disminución significativa al compararla con la del grupo IV (Andeva $p < 0.001$, Tukey/Kramer $p < 0.001$) (Cuadro 1).

Hallazgos inmunohistoquímicos.

Con respecto a la tipificación de la colágena, en las muestras prequirúrgicas de todos los grupos se observó que en 13 animales (3 del grupo I, 3 del II, 2 del III, 3 del IV y 2 del VI) hubo expresión leve y en 1 moderada (1 del grupo IV) de colágena tipo I, los 22 perros restantes no la expresaron; sin embargo al comparar entre grupos y dentro de cada grupo no se presentó ninguna diferencia ($p = 0.194$ ANDEVA).

Al comparar el pre y post operatorio se observó incremento de leve a moderado en la expresión de la colágena tipo I en los grupos I y IV ($p < 0.01$ ANDEVA, Tukey). Mientras que en los grupos II, III y VI la expresión de esta disminuye de forma leve ($p < 0.01$ ANDEVA, Tukey) (Gráfica 1). En el grupo V se mantuvo igual ya que ningún animal expresó esta colágena.

Al confrontar entre grupos la expresión de colágena tipo I al final del estudio se observó que los animales tratados con AH, AH-CPVP y MC mostraron menor expresión ya que solo 1 animal del grupo III (AH) y 1 del VI (MC) esta pudo ser observada de forma leve ($p < 0.005$ ANDEVA) (Figura 21) en comparación con los otros grupos de estudio en los que se expresó en todos los casos de forma leve a moderada (Gráfica 2).

En las muestras de tráquea tomadas antes de la cirugía se observó que en la colágena tipo II se expresó de manera leve en 15 casos (2 del grupo I, 2 del II, 1 del III, 4 del IV, 4 del V y 2 del VI), en los 21 animales restantes no hubo expresión de esta ($p= 0.435$ ANDEVA).

Al valorar la expresión de colágena tipo II pre y postratamiento se apreció que en el grupo I y III no se modificó. En los grupos II, IV y VI se incrementó sin embargo esto solo fue significativo en los grupos II y VI ($p= 0.002$ ANDEVA), mientras que en los animales del grupo V la expresión de esta disminuyó en comparación con sus valores basales ($p= 0.05$ ANDEVA) (Gráfica 3).

Al final del estudio, se observó que la colágena tipo II no se expresó en 4 casos del grupo de SSF, 5 del grupo AH y 4 del AH-CPVPV (Figura 22), lo cual fue significativo ($p < 0.001$ ANDEVA, $p < 0.01$ Tukey) al compararlo con los otros grupos (FSB, CPVP y MC) en los que se expresó de forma leve con excepción de un animal del grupo II en el que se presentó de forma moderada.

En los anillos traqueales controles, la colágena tipo III se expresó de forma severa en 21 animales (2 del grupo I, 2 del II, 4 del III, 6 del IV, 6 del V y 1 del VI), moderada en 10 (2 del grupo I, 2 del II, 2 del III y 4 del VI) y leve en 4 casos (2 del grupo I y 2 del II), solo en un animal no se expresó. Tampoco al comparar entre grupos y dentro de cada grupo no se observó diferencia significativa ($p= 0.63$ ANDEVA) (Gráfica 5).

Al analizar la expresión pre y postratamiento de la colágena tipo III, nos percatamos se expresó en todos los casos de grado moderado a severo. Aunque al final del estudio al comparar entre grupos se observó que esta colágena se expresa de forma moderada en los animales tratados con FSB, AH, AH-CPVP y MC, a diferencia de los tratados con SSF y CPVP (Figura 23) en los que se expresa de forma severa ($p < 0.001$ ANDEVA, $p < 0.005$ Tukey) (Gráfica 6).

VIII. DISCUSIÓN.

El tejido dañado se repara mediante la deposición de colágena, remodelación de la colágena y la formación de una cicatriz.

El manejo de las estenosis traqueales es uno de los problemas más difíciles de resolver para el cirujano de tórax y cuello, debido a que la formación de una cicatriz desproporcionada y la reestenosis son complicaciones de la cicatrización traqueal (47-50).

La adecuada cicatrización traqueal se presenta por un balance entre la deposición de colágena tipo I, expresión de colágena tipo II, III y proteoglicanos, así como con una respuesta inflamatoria moderada (14), por lo que se puede pensar que el alterar el grado de inflamación de sitio de lesión y la expresión de los diferentes tipos de colágena durante la cicatrización traqueal, permitirá una adecuada homeostasis entre ellas y la formación de una cicatrización que no provoque estenosis traqueal.

Para prevenir las estenosis traqueales se han realizado diversos estudios experimentales como clínicos en los que se han aplicado diferentes fármacos como los esteroides, mitomicina C (MC), AH, CPVP y AH combinado con CPVP, con el fin de modular el proceso de cicatrización y prevenir la formación de una cicatriz excesiva (13,26-28,38,39,43) y se ha observado que estos disminuyen el grado de inflamación, fibrosis, cantidad de colágena formada por gramo de tejido traqueal, sin embargo en ninguno de ellos se describe el tipo de colágena que se expresa en la cicatriz traqueal después de su aplicación postraqueoplastía.

En este trabajo se describe el efecto de la aplicación de AH, CPVP, MC y una mezcla de AH-CPVP sobre la cicatrización traqueal y tipo de colágena que se expresa en esta, después de realizar una traqueoplastía en perros.

Los hallazgos clínicos y endoscópicos de todos los perros de este estudio mostraron que en todos los casos se presentó cicatrización traqueal, sin embargo, la cicatrización observada endoscópicamente en los animales de los grupos II, III,

IV y V desde la primer semana no mostró signos de inflamación a diferencia de la del grupo control y MC, debido a que la respuesta inflamatoria de las heridas traqueales disminuye en presencia de FSB, AH, CPVP y la mezcla de AH-CPVP, ya que éstos favorecen la proliferación de células que producen un infiltrado inflamatorio monocelular, el cual disminuye el proceso inflamatorio agudo, local y periférico en el caso del AH (13) y la CPVP (29,50,38,39,43,51), mientras que el esteroide estabiliza la pared celular, disminuye el edema y previene la migración de macrófagos (52), supresión de la proliferación de fibroblastos (53) o la inhibición de la síntesis de colágena o colagenasa. Sin embargo en los grupos en los que se aplicó SSF y la mitomicina C, la mucosa se encontró edematizada por 2 semanas, porque este fármaco no tiene efecto antiinflamatorio agudo (49).

Lo observado macroscópicamente en este estudio, coinciden con los reportados por otros autores (27,30-32,37,53-59) que mencionan que el desarrollo de cicatrices menos fibróticas y laxas formadas en los animales del grupo II, III, IV, V y VI se produjeron porque todos estos fármacos durante la inflamación que es parte del proceso de cicatrización disminuyen la producción de colágena y restablecen la arquitectura normal del tejido traqueal permitiendo una mejor organización de los fibroblastos en el caso del AH y CPVP, mientras que los esteroides y la MC puede deberse a que inhiben la proliferación de los fibroblastos, así como la producción y migración de la matriz extracelular (5,49).

La inflamación severa con presencia de linfocitos observada microscópicamente en los animales del grupo I indica que todavía se está presentando un proceso de inflamación crónica, ya que estas células aparecen en las fases tardías de la inflamación y esto sugiere que la aplicación del FSB, AH y la CPVP disminuyen la respuesta inflamatoria. Estos hallazgos coinciden con los de otros autores que mencionan que en presencia de éstos medicamentos se disminuye la inflamación. Estos hallazgos coinciden con los de otros autores que mencionan que los mediadores inflamatorios del sistema inmune se asocian a la reparación de los tejidos y que los linfocitos (esencialmente los T), tienen un papel muy importante en la regulación de la cicatrización del adulto principalmente en la modulación de

la fibrosis (52,54,55,60-66). Aunque en este estudio no se observó que la MC disminuyera la inflamación durante el mismo tiempo que los otros medicamentos, en los estudios histológicos se apreció que esta tiene efectos antiinflamatorios a largo plazo (4 semanas), sin embargo no existen estudios que reporten estos hallazgos.

Las células gigantes a cuerpo extraño que se observaron en la zona de las suturas de un animal del grupo I, es una respuesta de inflamación crónica granulomatosa, al material de sutura que provocó la fusión de los macrófagos que fueron a digerirlo y por eso se formaron las células gigantes a cuerpo extraño (50,60,67-69).

En lo que respecta al desarrollo de fibras de colágena bien organizadas en los animales de los grupos II, III, IV, V y VI sugiere que éstos ordenan y adelgazan las fibras de colágena y restablecen la arquitectura normal del tejido traqueal, porque durante el proceso de reparación disminuyen la inflamación y la producción de colágena (29,33,38,39,43,49,51,70,71). Mientras que la mitomicina C aún no se sabe cuál el mecanismo exacto por el cual disminuye la fibrosis, algunos autores sugieren que tiene un efecto similar a la de los agentes alquilosantes, ya que produce uniones cruzadas de DNA e inhibe la síntesis de RNA y de colágena. También se menciona que hay evidencias que sugieren de que su actividad antifibroblástica es porque la reducción de la actividad de los fibroblastos está mediada por apoptosis en la cual se produce la muerte programada del mismo, en la que células apoptóticas muestran una característica morfológica que incluye condensación del núcleo y citoplasma, fragmentación nuclear y derrame citoplásmico con la membrana celular intacta (5), además de producir migración de la matriz extracelular. En este estudio la disminución en la fibrosis traqueal coinciden con los reportados por otros autores (5,49,72,73).

La evaluación bioquímica mostró que tanto la CPVP, la mezcla AH-CPVP y la mitomicina C disminuyen de manera importante la cantidad de colágena desarrollada por mg de tejido en comparación con los grupos de SSF y FSB, esto puede explicarse porque el tratamiento con estos fármacos disminuyen la

inflamación y la formación de fibras de colágena y coincide con los hallazgos observados por otros autores al realizar estudios de cicatrización en otros tejidos y diferentes modelos experimentales y clínicos (5,13,43,49,51,71).

En este estudio se observó la expresión de colágena tipo I en los anillos traqueales sin tratamiento porque este tipo de colágena se encuentra presente en todos los tejidos conjuntivos; sin embargo cuando hay una lesión esta se expresa durante la fase de maduración y remodelado de la cicatriz (74). La mayor presencia postratamiento de colágena tipo I en los grupos tratados con SSF y CPVP fue ocasionada por que la primera no tiene efectos antiinflamatorios y la segunda tiene efecto solo en la inflamación crónica durante la fase de remodelación (la cual en este estudio por su tiempo de duración, apenas está empezando), en donde actúa disminuyendo los factores proinflamatorios como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformado b1 (TGFb1), el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleucina β -1 (IL- β 1), así como las moléculas de adhesión celular que favorecen la diapédesis leucocitaria, como la molécula de adhesión de los leucocitos al endotelio (ELAM-1) y la molécula de adhesión vascular (VCAM-1), hasta que estos alcancen niveles semejantes a los normales y favorezca el recambio de los componentes del tejido conjuntivo con la consecuente eliminación del exceso de proteínas fibrosas (34-36,43). Por otro lado también al finalizar el estudio se observó menor expresión de esta colágena en el grupo tratado con FSB, porque los esteroides inhiben la producción de colágena tipo I y III debido a que inhiben la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina de la proteína del precolágena, necesaria para el entrecruzamiento covalente de las fibras de colágeno individuales, para formar el complejo final de triple hélice del colágeno estructuralmente estable (75,76). En estudios previos en los que se ha estudiado este tipo de colágenas durante el crecimiento se ha reportado que los esteroides reducen la acumulación intracelular de ARN mensajero durante la formación de las cadenas de precolágena que van a formar las hélices polipéptídicas de colágena. Aunque también pueden actuar bloqueando el factor de crecimiento de insulina (IGF1) suprimiendo su síntesis, lo cual afecta la mitogénesis de los condrocitos (77). La menor presencia de esta

también en los grupos tratados con AH (III y V) fue porque este fármaco actúa sobre la inflamación aguda y promueve menos liberación de citocinas y proteoglicanos con lo que se promueve una remodelación más rápida de la cicatriz. En el grupo VI se observó leve expresión de colágena tipo posiblemente porque la mitomicina C es impide la contracción de la herida mediada por fibroblastos en este paso de la cicatrización, ya que inhibe la síntesis de DNA por medio de la formación de enlaces cruzados de la adenina y la guanina, suprimiendo la síntesis de proteínas, lo que ocasiona un retraso en la replicación de los fibroblastos e inhibe la producción de colágena y retrasa la contracción de la herida (78). Todo lo anterior nosotros lo suponemos debido a que no existen estudios acerca de la expresión de los diferentes tipos de colágena en la tráquea después de una traqueoplastía y ser tratada con diferentes moduladores de la cicatrización.

La colágena tipo II es el componente principal del cartílago traqueal y al final del estudio no se expreso o se expreso de forma leve porque la cicatriz de la anastomosis traqueal todavía se encuentra en proceso de remodelación y no ha habido tiempo suficiente para observar si la colágena producida en esa cicatriz se transforma en la colágena original.

La colágena tipo III es la que predomina en los recién nacidos y en el periodo inicial de la cicatrización de las heridas quirúrgicas y durante el proceso de remodelación que consiste básicamente en la fragmentación del colágeno formado y el reordenamiento de sus fibrillas, hacen que disminuya la proporción de colágeno III y se incrementa la de colágeno I (79). En este estudio se observó que la colágena tipo III se expreso en grado moderada en los animales tratados con FSB, AH, AH-CPVP y MC posiblemente porque todos con sus efectos antiinflamatorios (con excepción de la MC, que no tiene actividad antiinflamatoria) inhiben la acción de los fibroblastos para la producción de colágena; sin embargo en la literatura no existen reportes que describan la expresión de esta en la tráquea después de haber sido tratada con estos medicamentos. Con respecto al presencia severa de esta colágena en el grupo I, es porque la SSF no tiene ningún

efecto sobre la producción de colágena, mientras posiblemente solo tenga efecto sobre la colágena tipo I cuando la fase de remodelación de la cicatrización ya se encuentre avanzada (por lo que es necesario realizar estudios a más largo plazo para evaluar esto). Es importante mencionar que la menor expresión observada en el grupo en el que este fármaco se mezcló con el AH fue originada por los efectos de este último.

IX. CONCLUSIONES.

- El AH, CPVP, la mezcla AH-CPVP y MC aplicados en forma tópica en el sitio de la anastomosis traqueal en perros, disminuyen la inflamación de las mismas y mejoran la calidad de la cicatrización de las mismas ya que disminuyen la formación de estenosis traqueal postraqueoplastía cervical en perros.
- La aplicación tópica de FSB, AH, CPVP, la mezcla AH-CPVP y MC en el sitio de la anastomosis postraqueoplastías, disminuye la inflamación, así como la fibrosis y promueve el desarrollo de fibras de colágena bien organizadas.
- Después de una traqueoplastía cervical en perros, la aplicación tópica de AH, CPVP, la mezcla AH-CPVP y MC disminuye la cantidad de colágena formada por gramo de tejido traqueal en el sitio de la anastomosis.
- La aplicación tópica postraqueoplastía de AH, FSB, AH mezclado con CPVP y la MC disminuyen la expresión de colágena tipo I en el sitio de la anastomosis.
- La aplicación tópica de SSF, FSB, AH, CPVP, AH-CPVP y MC en el sitio de las anastomosis postraqueoplastía no promueve la expresión de colágena tipo II en la cicatriz formada.
- El tratamiento con FSB, AH, AH-CPVP y MC favorece la expresión moderada de colágena tipo III en la cicatriz formada después de realizar una traqueoplastía cervical en perros.

X. BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Dellmann H.D. Histología veterinaria. Sistema respiratorio. ed. Acribia S.A. Zaragoza España 1993:159-176.
- 2.- Plopper CG, Mariassy AT, Lollini LO. Structure as revealed by airway dissection. A comparison of mammalian lungs. Am Rev Respir Dis. 1993;28: S4.
- 3.- Ortiz MA. Histología. Tejido óseo y cartílago. 2008; 5:128-155.
- 4.- Tojo T, Niwaya K, Sawabata N, Nezu K, Kawachi K, Kitamura S. Tracheal allogenic immunoresponse is reduced by cryopreservation canine experiment. Transplant Proc. 1996;28(3):1814-1815.
- 5.- Reza R, Stanley M S, Gerald BH. Mitomycin: Effects on Laryngeal and Tracheal Stenosis, Benefits and Complications. Ann Otol Laryngol. 2001;110:1-6.
- 6.- Soda MA, Delgado A, Morales J. Manejo quirúrgico de las estenosis traqueales. Gaceta Médica de México. 1994;130:386-389.
- 7.- Lau E. Richard, Schwartz Anthony, Buergelt D. Claus. JAVMA. 1980;176:134-139.
- 8.- Davidson IA, Cruickshank AN, Duthie WH, Bargh W. Duncan JG. Tracheal Lesions Following tracheostomy. Proceedings of the Royal Society of Medicine. 1971;31:479.
- 9.- Gallit J. Clark AF. Wound repair in the context of extracellular matrix. Current Opinion in Cell Biology. 1994;6:717-25.
- 10.- Morales J, Téllez JL. Niebla B. Loyola U, Avalos A, Patiño H. Dilataciones Traqueales como Manejo Temporal de la Estenosis Traqueal en el INER 60 Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Neumología y Cirugía de Tórax. Tijuana, B. C. Abril 2001.
- 11.- Wang Z, Pankratov MM, Gleich LL, Rebeiz EE, Shapshay SM. New technique for laryngotracheal mucosa transplantation. 'Stamp' welding using indocyanine green dye and alumin interacion with diode laser. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1995;121:773-777.

- 12.- Bjorkerud S, Ekedahl C, Hansson PG, Jeppsson PH, Lindstrom J. Experimental tracheal wall injury. *Acta Otolaryngol.* 1973; 75:387-388.
- 13.- Olmos-Zúñiga JR, Santos-Cordero JA, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, Gaxiola-Gaxiola MO, Mora Fol JR et al. Efecto del ácido hialurónico sobre la cicatrización traqueal en un modelo experimental canino. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2004; 55:81-87
- 14.- Silver FH, Glasgold AI. Cartilage wound Healing. An overview. *Otolaryngologic Clinics of North America.* 1995;28:847-864.
- 15.- Silver FH, Moss CS. Biology of facial implant materials. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America.* 1994; 2:241.
- 16.- Devlin, TM. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas, 4ª edición, Editorial Reverté, Barcelona. 2004.
- 17.- Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 2003; 55:1531-1546.
- 18.- Layman, DL, McGoodwin EB, Martin GR. The nature of collagen synthesized by cultured human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA,* 1971; 68:1138-1142.
- 19.- Bellamy G, Bornstein P, Evidence for procollagen, a biosynthesis: synthesis and secretion of a high molecular weight collagen precursor (procollagen). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 1971; 68:1638-2642.
- 20.- Church RL, Pfeifer SE, Tanzer ML Collagen biosynthesis: synthesis and secretion of a high molecular collagen precursor (procollagen). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 1971; 68:1638-2642.
- 21.- Pontz BF, Müller PK, Meigel WN. A study on the conversion of procollagen. Release and recovery of procollagen peptides in the culture medium. *The Journal of Biological Chemistry,* 1973; 248:7558-7564.

- 22.- Spiro RG. Characterization and quantitative determination of the hydroxylysine-linked carbohydrate units of several collagens. *The Journal of Biological Chemistry*. 1969; 244:602-612.
- 23.- Ruiz López VM. Efecto de los Inmunosupresores en la Cicatrización Bronquial en un Modelo de Autotrasplante Pulmonar. Tesis Licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF. 1996.
- 24.- Soda MA, Delgado FA, Fernández EJ, Gánem MJ and Borgstein VJ. Estenosis laringotraqueales: Experiencia en el Instituto Nacional de enfermedades Respiratorias. *Anales Sociedad Mexicana Otorrinolaringología*. 1990; 35:85-92.
- 25.- Lorenz R. Adult laryngotracheal stenosis: etiology and surgical management. *Current opinion in otolaryngology and head and neck surgery* 2003; 11:467-472.
- 26.- Correa AJ, Reinish L, Sanders DL, Huang S. Inhibition of subglottic stenosis with mitomycin c in the canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*.1999; 108:1053-1060.
- 27.- Krotz-Gomez F, Reyes Marquez R, Díaz L. TGF-B and PDGF-AB expression in fibroblast derived from normal skin, hypertrophic/keloid scar and hypertrophic/keloid scar treated with fiboquel. *Wound Repair and Repair Regeneration*. 1996; 4:A160
- 28.- Livingtone GL, Schild JA. Lathirogenic agents as therapy for subglottic stenosis a pilot study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1987; 97:446-51.
- 29.- Longaker MT, Harrison MR, Crombleholme TM. Studies in Fetal Wound Healing: I. A Factor in Fetal Serum that Stimulates Deposition of Hialuronic Acid. *J Pediatr Surg*. 1989;24:789-792.
- 30.- Wen DY. Intra-articular Hyaluronic Acid Injection for Knee Osteoarthritis. *American Family Physician*. 2000; 62:565-570.
- 31.- 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;25:253-261.

- 32.- Sawada T, Hasegawa K, Tsukada K. Adhesion Preventive Effect of Hyaluronic Acid After Intraperitoneal Surgery in Mice. *Human Reproduction*. 1999; 14:1470-1472.
- 33.- Krauss MC. Recent Advances in Soft Tissue Augmentation. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. 1999; 182:119-128.
- 34.- Krötzsch E, Díaz de León E, Furuzawa GJ, Marquez R, Quiroz E, Citokine expresión is down regulated by collagen-polivinylpirrolidone in hyperthrophic scars *J. Invest Dermatol*. 1998;111:828-834.
- 35.- Rodríguez R, Furuzawa J, Corchado A, Krötzsch F. Collagen-polyvinylpyrrolidone promotes human wound healing through cytokine down modulation. *Wound Rep Reg*. 2001; 9:166.
- 36.- Suárez C, Salgado RM, Apis AM. Inducción del tejido de granulación por pasta de Lassar vs colágena polivinilpirrolidona en úlceras por insuficiencia venosa. *Cir Plast*. 2004; 14:5-13.
- 37.- Cervantes C, Olaya E, Testas M, García N, Coste G, Arrellin G, Luna A, Krötzsch F. Collagen-PVP, A collagen síntesis modulator, decreases intraperitoneal adhesions. *J Surg Research*. 2003; 110:207-210.
- 38.- Loyola-Garcia 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.
- 39.- Santillán Artolózaga A. Efecto de diferentes moduladores cicatrizales en la traqueoplastía. Tesis Especialidad de Otorrinolaringología, Cirugía de Cabeza y Cuello. México D.F. Facultad de Medicina. UNAM, 2006.
- 40.- Estados Unidos Mexicanos. AFÍA. Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. *Diario Oficial de la Federación* 6 dic, 1999.

41.- National Institutes of Health U.S.A. Guía Para el Cuidado y Uso de Los Animales de Laboratorio. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health U.S.A. Edición Mexicana Auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. México, D.F. 2002.

Academy of Surgical Research. Course of Animal Anesthesia and Models.

42.- Memories of the Course of Animal Anesthesia and Models of the 12th Annual Meeting and 1ST International Conference of the Academy of Surgical Research; October 1996: Muenster, Germany. Academy of Surgical Research, 1996.

43.- Olmos JR, Hernández C, Díaz E, Jasso R, Sotres A, Gaxiola M: Wound Healing Modulators In A Tracheoplasty Canine Model. *J Invest Surg.* 2007; 20:333-338.

44.- Task Group on Screening For Respiratory Disease in Occupational Settings. *Am Rev Respir Dis.* 1982, 126: 952-56

45.- Freitag L, Ernst A, Unger M, Kovitz K, Marquette CH. A proposed classification system of central airway stenosis. *Eur Respir J.* 2007; 30:7-12.

46.- Woessner JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Giophys.* 1961;93:440–447.

47.- Grillo HC. Development of tracheal surgery: A historical review. Part 1: Techniques of tracheal surgery. *Ann Thorac Surg.* 2003; 75:610–619.

48.- Grillo HC. Development of tracheal surgery: A historical review. Part 2: Treatment of tracheal diseases. *Ann Thorac Surg.* 2003; 75:1039–1047.

49.- Eliashar R, Eliachar I, Esclamado R, Gramlich T, Strome M. Can Topical Mitomicyn Prevent Laryngotracheal Stenosis?. *Laryngoscope.* 1999;109:1594-1600.

50.- Adolph VR, DiSanto SK, Bleacher JC, et al: The Potential Role of the Lymphocyte in Fetal Wound Healing. *J. Pediatric Surg.* 1993; 28:1316-1620.

51.- Olmos-Zúñiga JR, González-López R, Gaxiola-Gaxiola M, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, Santibáñez-Salgado JA, Soda-Merhy A. Empaquetamiento del oído medio con esponja de colágena polivinil pirrolidona. Estudio experimental en cobayos. *Rev Inv Clin.* 2009; 61:497-504.

52.- Edgard J, Louise. F. Pharmacologic inhibition of collagen in an experimental model of subglottic stenosis. *Annal of rhinology and laryngology.* 1998; 107: 275-279.

53.- 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:A147.

54.- Doolin E, Tsumo K, Strande M and Santos M. Pharmacologic inhibition of Collagen in an experimental model of subglottic stenosis. *Ann Otol Rhinol Laringol.* 1998,107:275-78.

55.- Krupala JL, Gianoli GJ, Smith RA The Efficacy of Hyaluronic Acid Foam As a Middle Ear Packing Agent In Experimental Tympanoplasty. *The American Journal Of Otology.* 1998;19:546-50.

56.- Simon LS. Viscosupplementation Therapy with intra-articular Hyaluronic Acid. Fact or fantasy?. *Rheum Dis Clin N Am.* 1999;25:345-357.

57.- Kelly MA, Moskowitz RW, Lieberman JR. Hyaluronan therapy: looking toward the future. *Am J Orthop.* 2004; 33 (2 Suppl):23-28.

58.- Reijnen MM, Bleichrodt RP, Van Goor H. Pathophysiology of intra-abdominal adhesions and abscess formation, and the effect of hyaluronan. *Br J Surg.* 2003;90:533-541.

59.- Chimal-Monroy J, Bravo-Ruiz T, Furuzawa-Carballeda GJ, et al. Collagen-PVP accelerates new bone formation of experimentally induced bone defects in rat

skull and promotes the expression of osteopontin and SPARC during bone repair of rat femoral fractures. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;857:232-236.

60.- Burd DAR, Greco RM, Regauer S, Longaker MT, Siebert JW, Garg HG. Hyaluronan and wound healing: a new perspective. *Br J Plastic Surg.* 1991; 44: 579-584.

61.- Barbul A, Regan MC. The regulatory role of T-Lymphocytes in wound healing. *J Trauma.* 1990; 30:CS97-S100.

62.- Barbul A. Immune aspects of wound repair. *Clin Plast Surg.* 1990; 17:433-441.

63.- Krummel TM, Nelson JM, Diegelmann RL, et al. Fetal response to injury in the rabbit. *J Pediatr Surg.* 1987; 22:640-644.

64.- Burrington JD. Wound healing in the fetal lamb. *J Pediatr Surg.* 1971;6:523-528.

65.- Del Rio J, Beck DE. Chronic perioperative Steroids and colon anastomosis healing in rats . *Journal of Surgical Research.* 1996;66:138-142.

66.- Santillán-Doherty P, Jasso-Victoria R, Olmos-Zúñiga R. Efecto de la prednisona, la azatioprina y la ciclosporina A sobre la cicatrización bronquial. *Cir Ciruj.* 1998; 66:165-171.

67.- Peacock EE. Control of wound healing and scar formation in surgical patients. *Arch Surg.* 1981;116:1325-29.

68.- Fernández S. Respuesta tisular a materiales de relleno: estudio experimental». Ed. Santiago de Compostela: Universidade. Servizo de Publicaciones e Intercambio Científico, 2007. ISBN: 978-84-9750-857-5.

69.- Escudero FJ, Guarch R, Lozano JA. Reacción tisular a las prótesis mamarias. Contractura capsular periprotésica. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2005; 28 (Supl. 2): 41-53.

70.- Darzi MA, Chowdri NA, Kaul SK, Khan M. Evaluation of various methods of treating keloids and hypertrophic scar: A 10 years follow up study. *British Journal of Plastic Surgery*. 1992; 45:374-79.

71.- Hernández Jiménez Claudia. Efecto del ácido hialurónico y colágeno polivinil pirrolidona sobre la cicatrización traqueal en un modelo experimental canino. Tesis de Maestría en Ciencias. México D.F. Facultad de Veterinaria. UNAM 2005.

72.- Lee DA, Lee TC, Cortes AE. Effects of mitramycin, mitomycin, daunorubicin and bleomycin on human subconjunctival fibroblast attachment and proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1990;31:2136-2144.

73.- Khaw PT, Sherwood MB, MacKay SL. Five-minute treatments with fluorouracil, floxuridine and mitomycin have long-term effect on human Tenon's capsule fibroblast. *Arch Ophthalmol*. 1992; 110: 1150-1154.

74.- Harrison J. Surgical wound healing. En: Gutmann J, Harrison J, editores. *Surgical endodontics*. Tokyo. Ishiyaku Euroamerica, Inc. 1994;300-337.

75.- Desai DV, Kuo PC. Control perioperatorio de poblaciones especiales:el paciente inmunocomprometido (cáncer, VIH, trasplante). *Surg Clin N Am*. 2005;85:1267-1282.

76.- Munson PL, Mueller RA, Breese GR, Principles of pharmacology. New York: Chapman and Hall, 1995:749-762.

77.- Suarez G, González JA. Esteroides y crecimiento. *Rev Cub Alimnt Nutr*. 1998; 12: 40-45.

78.- Castillo JM, López JF, Aragón AR, Camacho T, Colorado A, Vargas P. Aplicación transuretral de mitomicina C como adyuvante de la uretrotomía interna. *Rev Col Mex Urolo*. 2007; 3:125-129.

79.- Bielsa I. Proceso de cicatrización de las heridas. *Piel*. 2006; 21:207-212.

XI. FIGURAS.

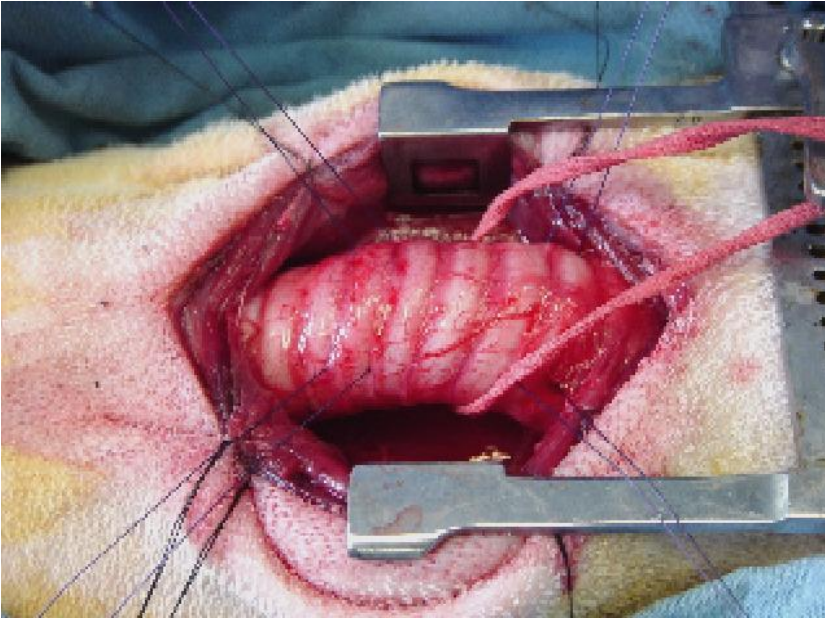


Figura 1. Disección de toda la circunferencia traqueal.

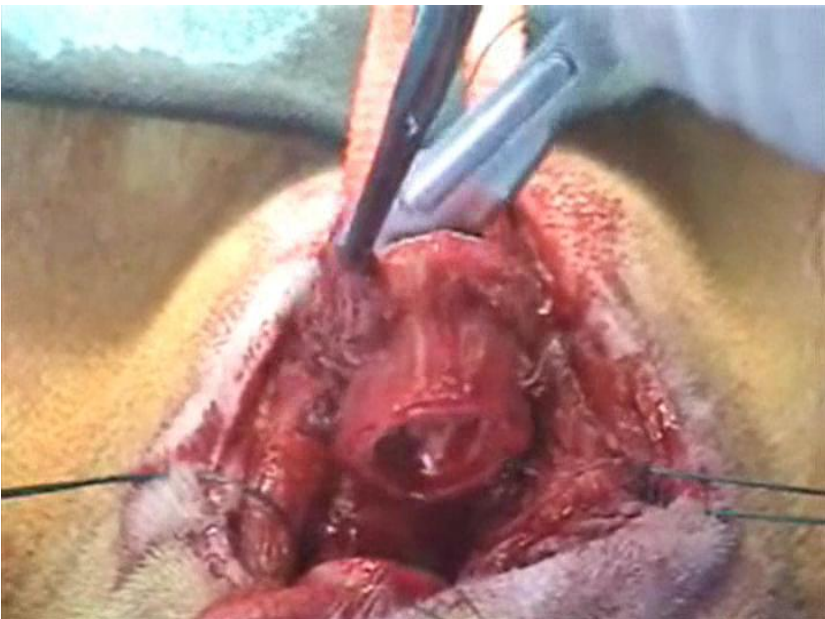


Figura 2. Disección de tres anillos traqueales.

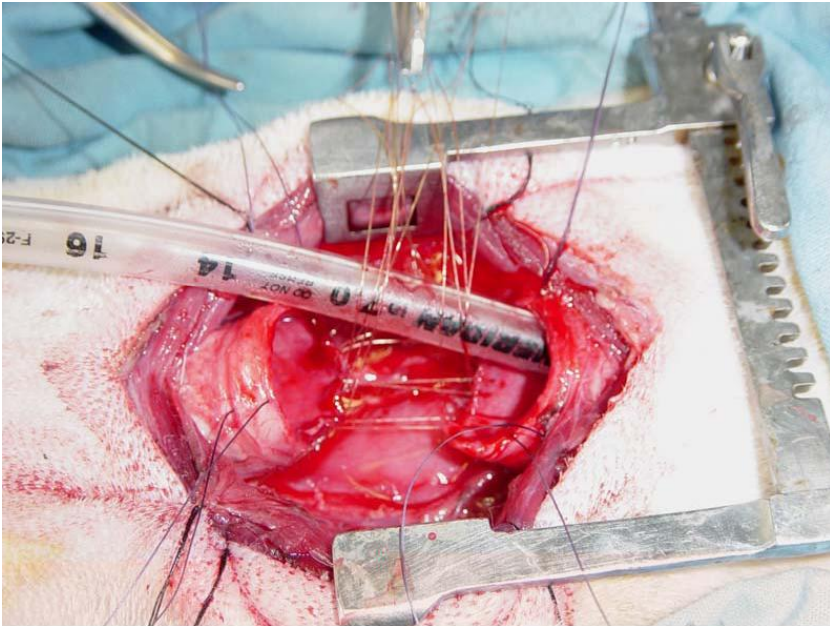


Figura 3. Anastomosis de la porción membranosa de la tráquea y tubo de ventilación en la porción proximal.



Figura 4. Fin de la anastomosis traqueal.

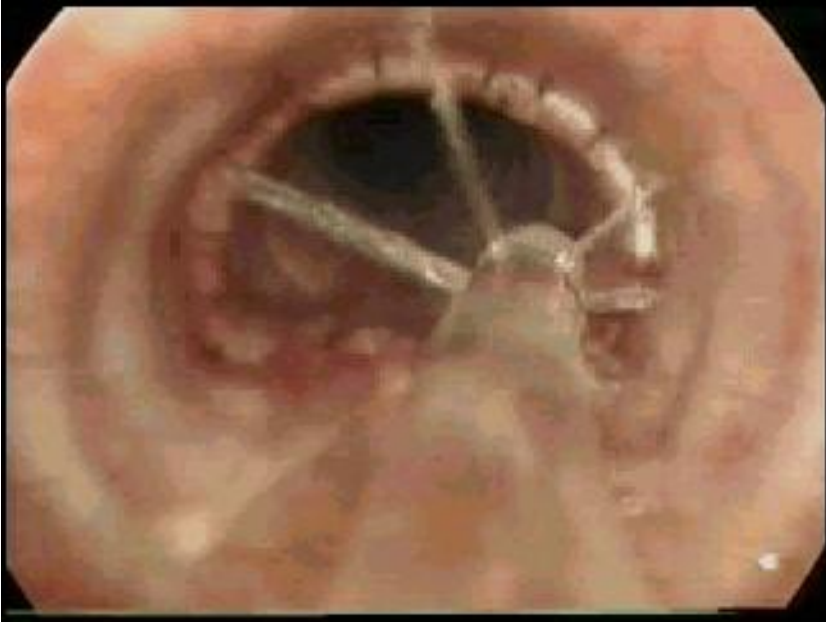


Figura 5. Muestra aplicación endoscópica del tratamiento en un perro del grupo III.



Figura 6. Endoscopía al final del estudio de la anastomosis tratada con SSF.



Figura 7. Endoscopía al final del estudio de buena cicatrización de la anastomosis de un perro del grupo de MC.



Figura 8. Cicatrización al final del estudio en un animal tratado con FSB.



Figura 9. Traqueoscopia al final del estudio de un animal del grupo de AH.

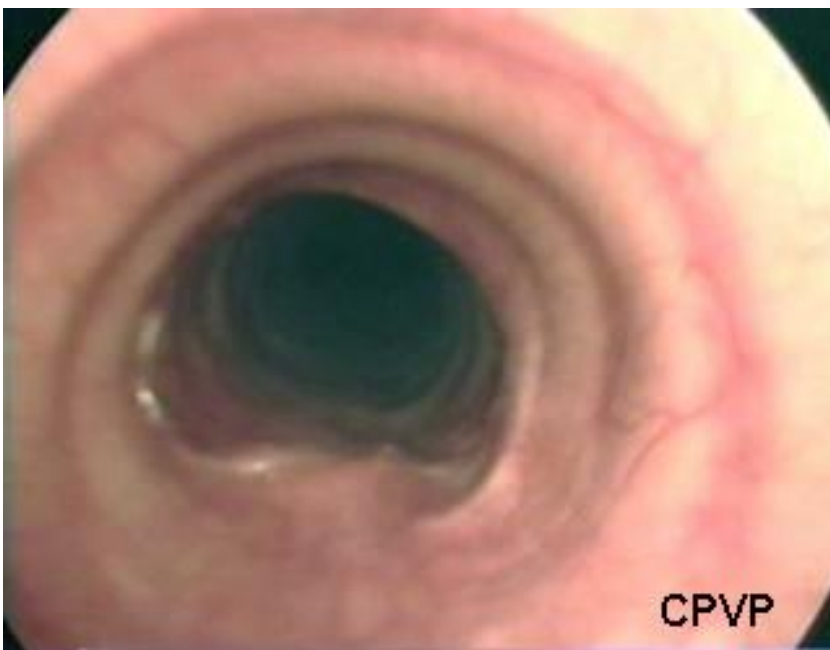


Figura 10. Cicatriz desarrollada por un animal del grupo de CPVP.



Figura 11. Endoscopia traqueal al final del estudio de la anastomosis tratada con la mezcla AH-CPVP.



Figura 12. Cicatriz de la parte externa de la anastomosis traqueal en el grupo III.

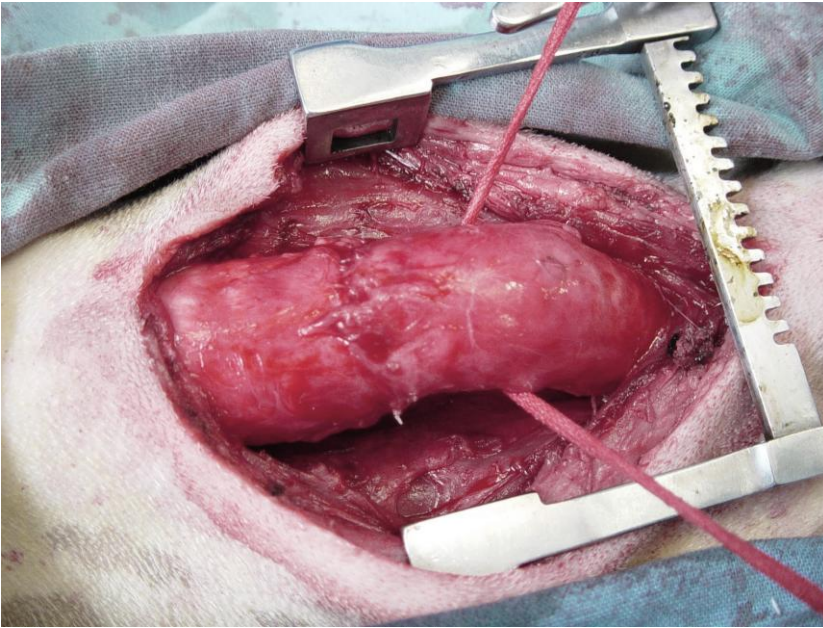


Figura 13. Foto macroscópica al final del estudio de la cicatriz externa de la anastomosis traqueal tratada con CPVP.

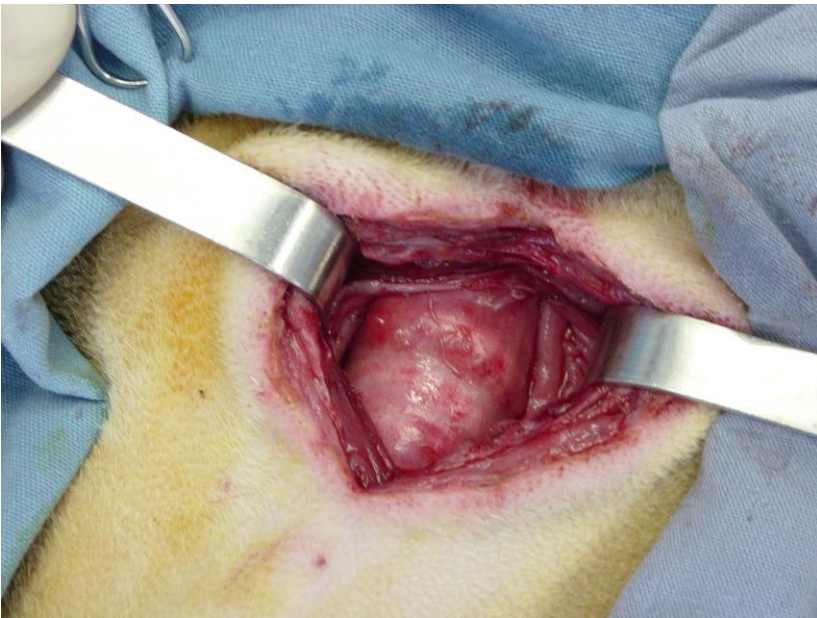


Figura 14. Muestra la cicatriz al final del estudio en un animal tratado con la mezcla AH-CPVP.



Figura 15. Cicatriz de la mucosa traqueal en un animal tratado con MC.

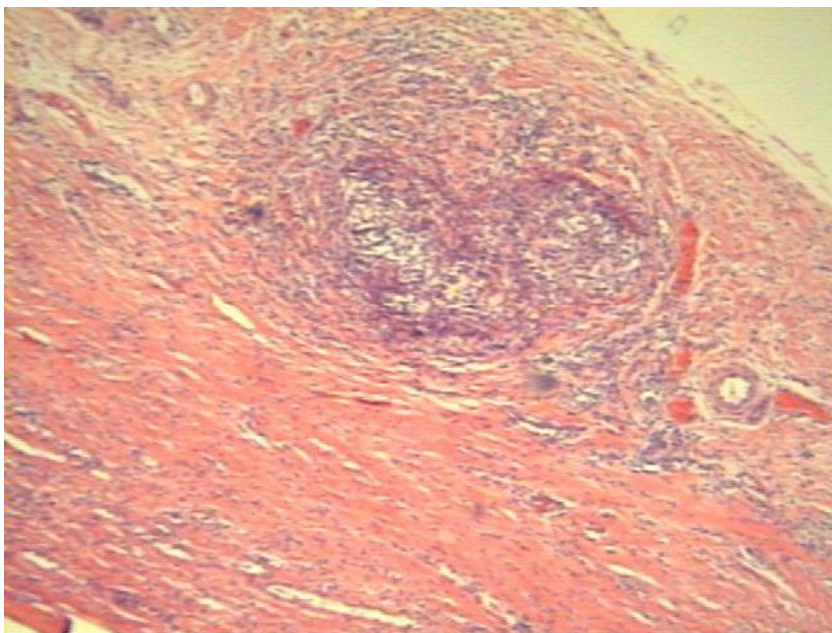


Figura 16. Fotomicrografía que muestra el granuloma formado en un animal del grupo I, también se observa infiltrado inflamatorio severo. Tinción H-E 2.5x

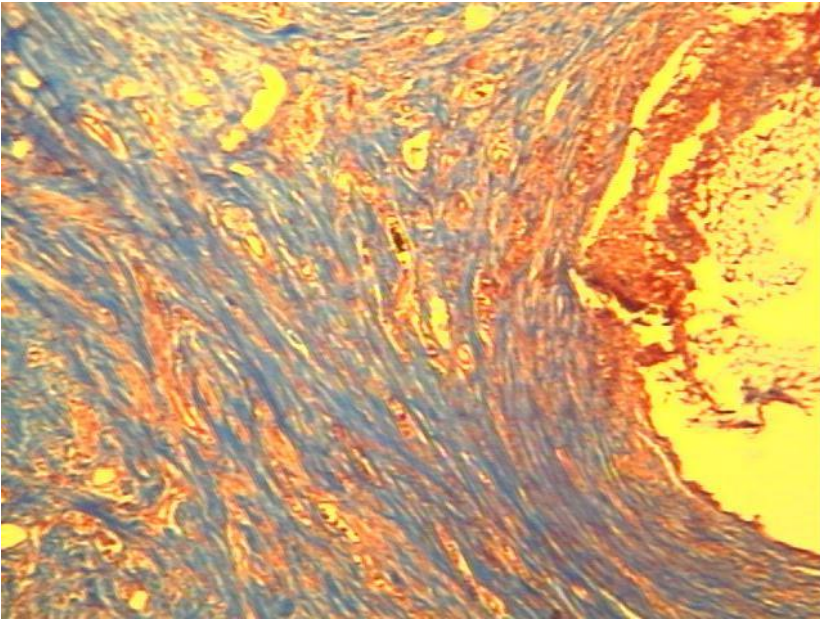


Figura 17. Fotomicrografía, que muestra una capa de fibras de colágena bien organizada alrededor de material de sutura en un animal tratado con AH. Tinción Masson 10x.

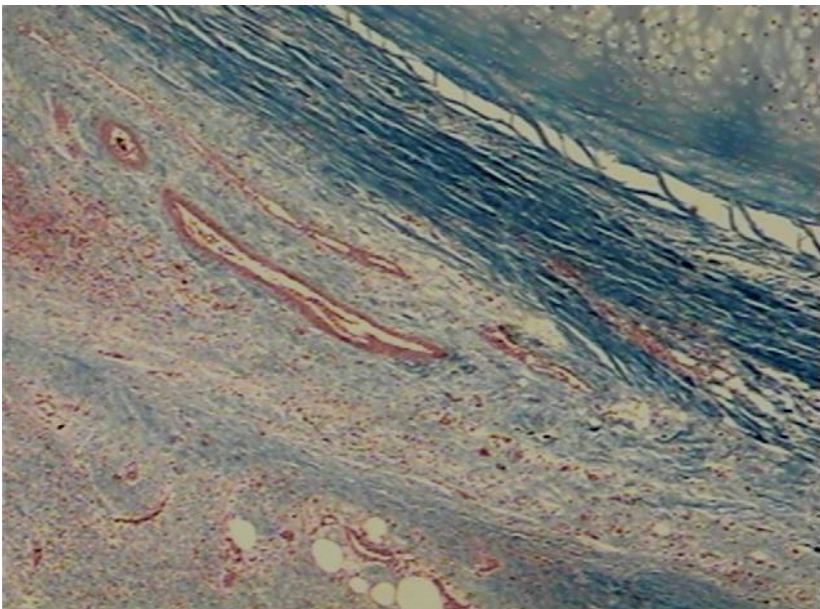


Figura 18. Fotomicrografía, que muestra las fibras de colágena bien organizada, vasos de neoformación y colágena delgada y bien organizada en un animal del grupo IV (CPVP). Tinción Masson 10x.

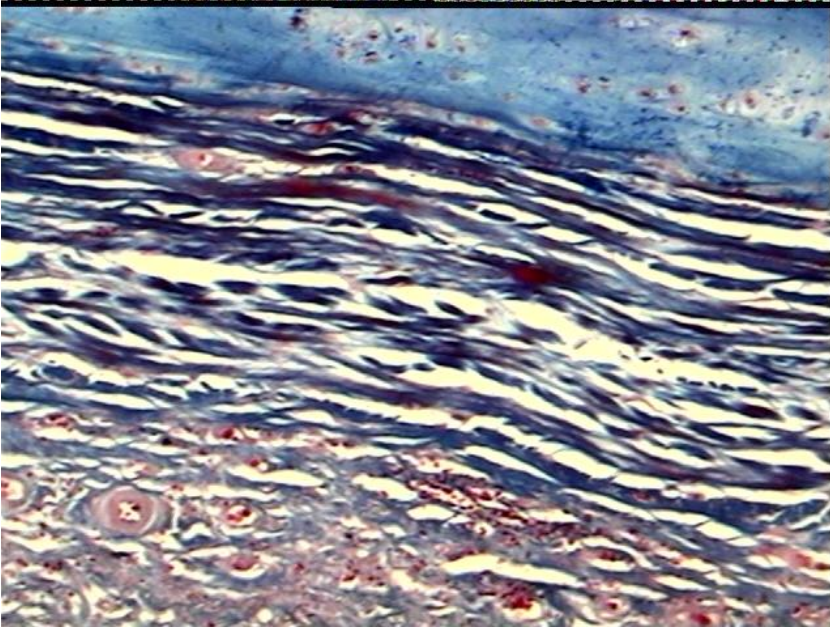


Figura 19. . Fotomicrografía en la que se observa la colágena bien organizada, vasos de neoformación y estructura del cartílago bien preservada en el grupo V (AH-CPVP). Tinción Masson 40x.

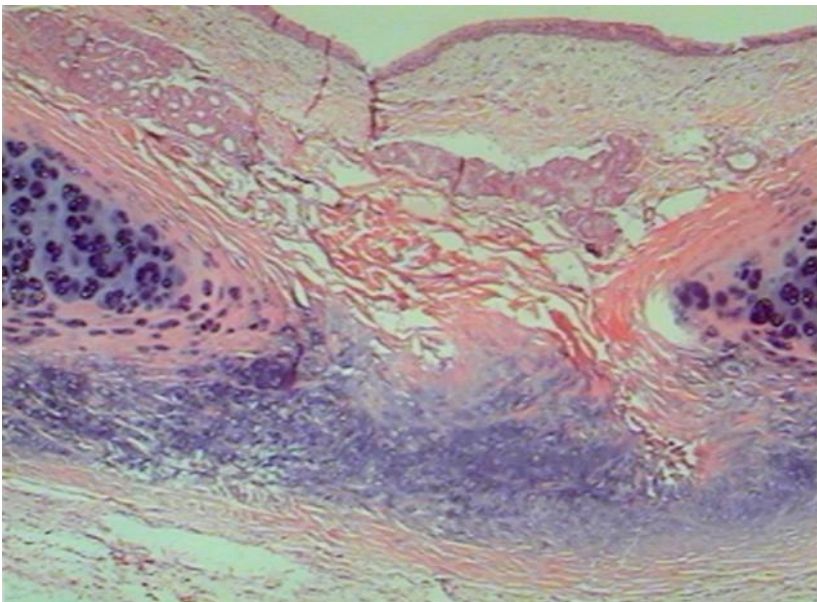


Figura 20. Fotomicrografía que muestra el epitelio traqueal y fibras de colágena bien organizada entre el cartílago traqueal seccionado por el corte de la traqueoplastía en un animal del grupo VI (MC) (Masson 10x).

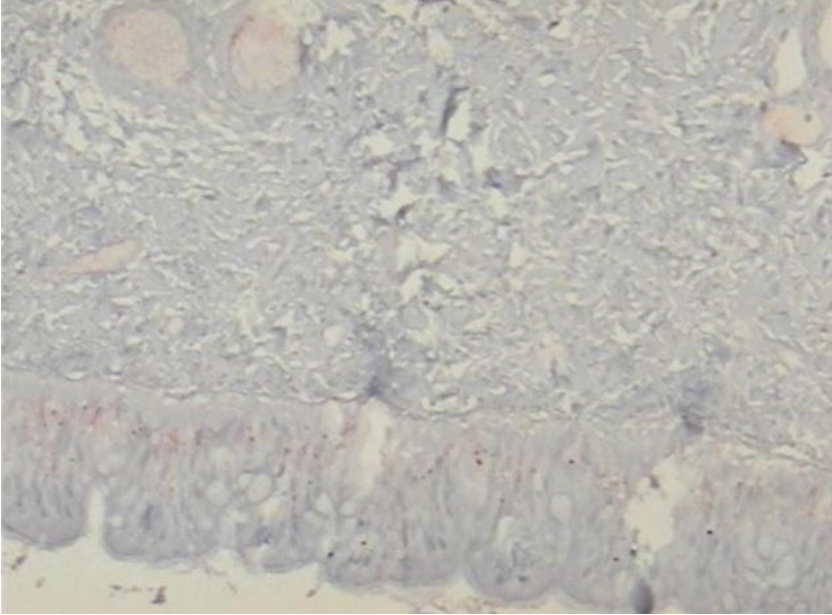


Figura 21. Microfotografía en la que se observa por inmunohistoquímica (rojo) la expresión positiva leve de la colágena tipo I en la tráquea de un animal tratado con MC. (10 X).

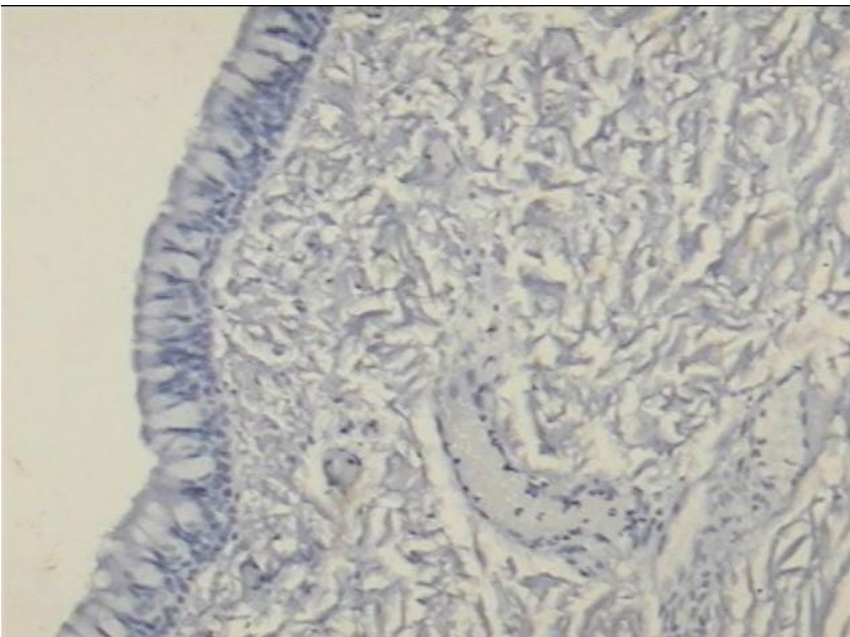


Figura 22. Microfotografía en la que se observa al final del estudio la nula expresión de la colágena tipo II por inmunohistoquímica en la traquea de un animal tratado con AH-CPVP. (10 X).

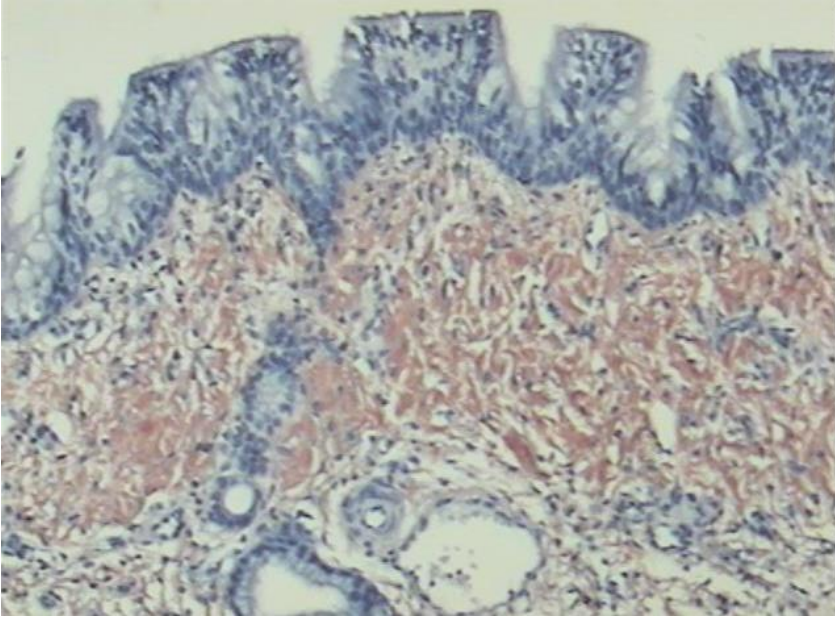


Figura 23. Microfotografía en la que se observa al final del estudio la expresión positiva de la colágena tipo III por inmunohistoquímica (rojo) en la submucosa traqueal de un animal tratado con CPVP. (10 X).

XII. CUADROS

| Miligramos de colágena en el tejido traqueal antes y después de la cirugía | | | | | | |
|--|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|----------------------|------------------|
| Grupos de estudio | | | | | | |
| | Grupo I (SSF) | Grupo II (FSB) | Grupo III (AH) | Grupo IV (CPVP) | Grupo V (AH-CPVP) | Grupo VI (MC) |
| Precirugía | 223.15 | 101.44 | 187.06 | 257.16 | 225.12 | 226.62 |
| Sin Tratamiento | ± 15.80 | ± 19.46 | ± 12.19 | ± 10.10 | ± 8.95 | ± 26.56 |
| Poscirugía | 318.15 | 138.11 | 217.46 | *184.40 | ** † 8.58 | ** † 13.67 |
| Pos tratamiento | ± 10.92 | ± 20.87 | ± 14.51 | ± 13.20 | ± 1.38 | ± 3.70 |

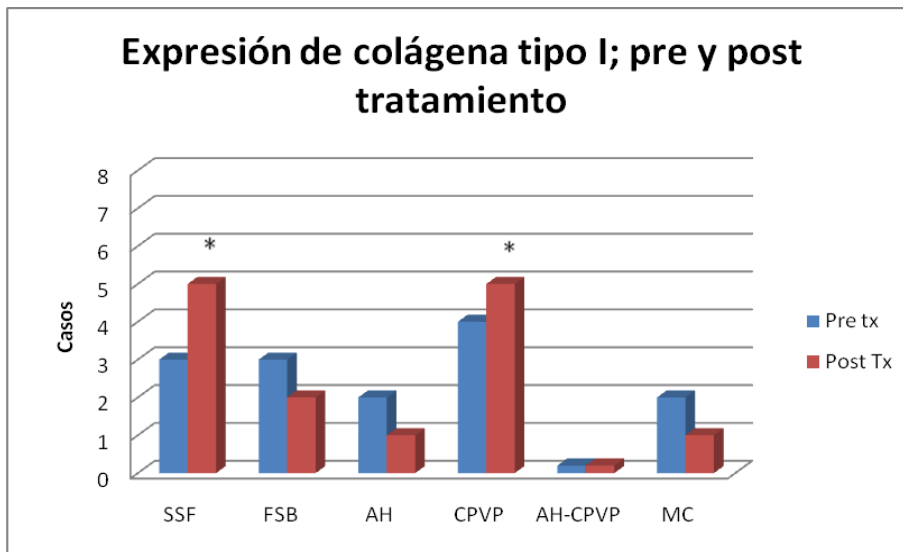
Promedio ± EE.

Andeva * p<0.05 ** p<0.001.

*Tukey Kramer p<0.01, † Tukey Kramer p<0.001.

Cuadro 1. Miligramos de colágena formada en la cicatriz de la traqueoplastia al final del estudio.

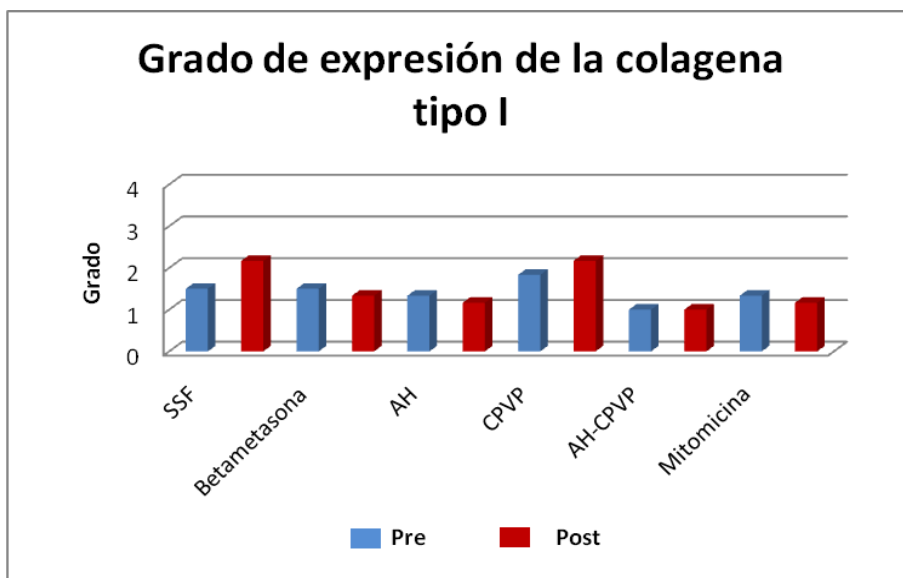
XIII. GRAFICAS.



Número de casos

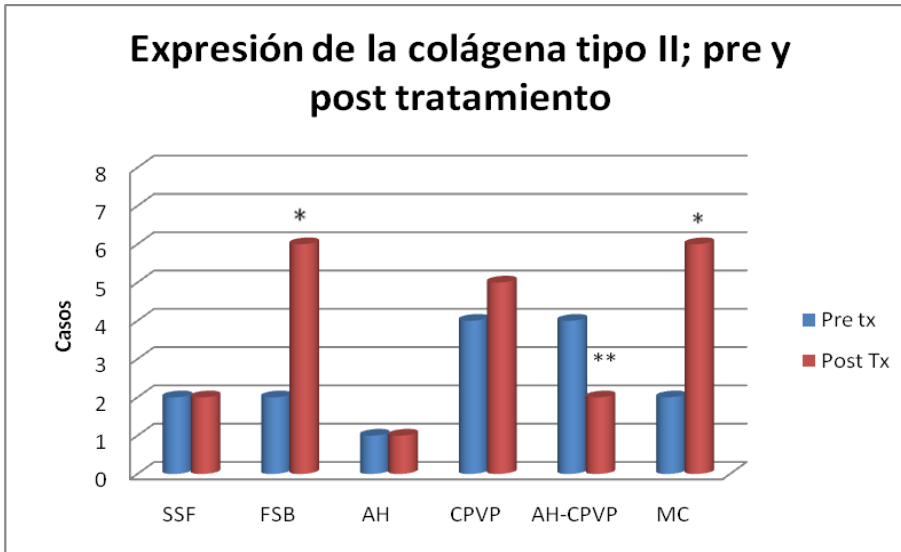
* $p < 0.01$ ANDEVA, Tukey

Grafica 1. Muestra el incremento en la expresión de la colágena tipo I en los grupos I y IV al final del estudio.



Promedio grado de expresión.

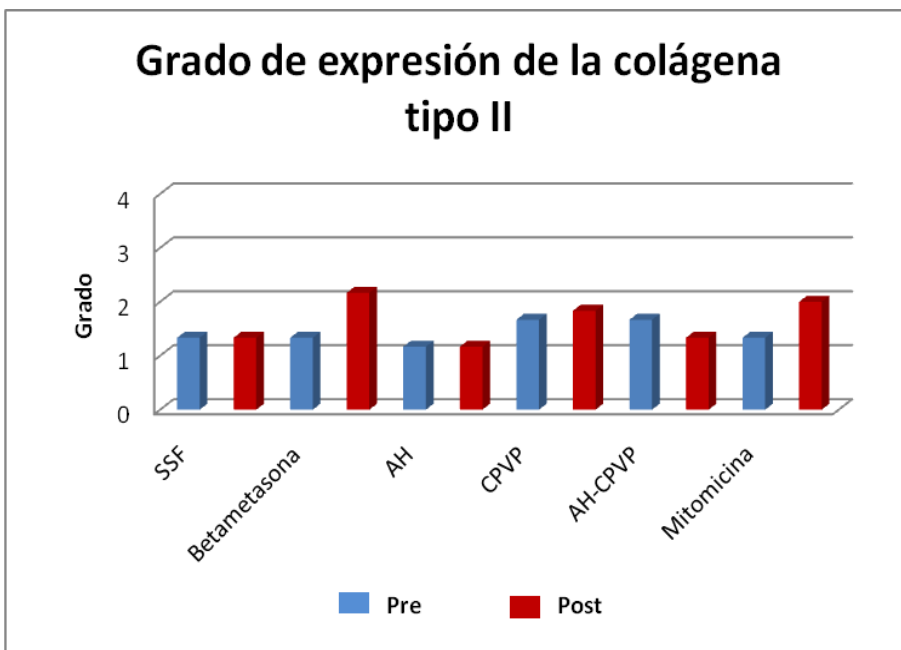
Grafica 2. Se observa el grado de expresión de colágena tipo I antes y después del tratamiento.



Numero de casos.

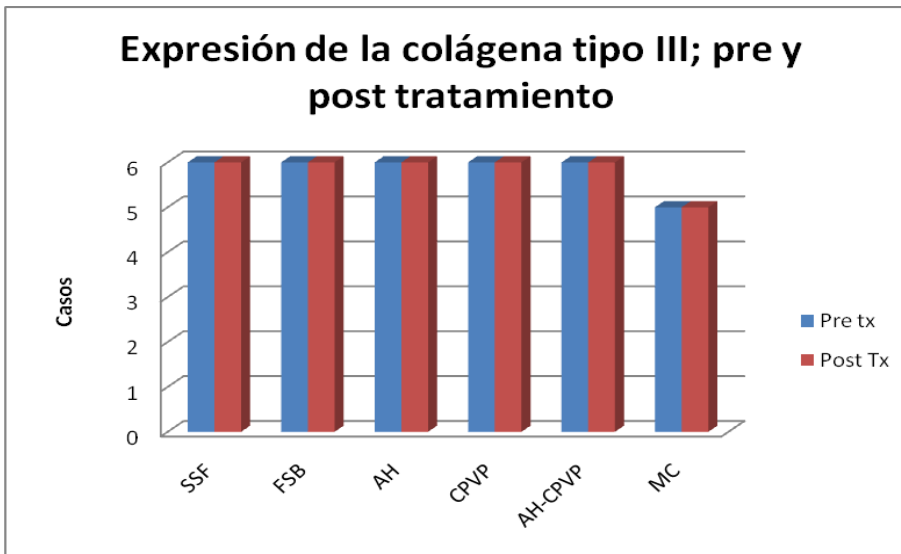
* $p= 0.002$ ANDEVA, ** $p= 0.05$ ANDEVA

Grafica 3. * Muestra el incremento en la expresión de colágena tipo II y ** disminución de la expresión de la misma al final del estudio.



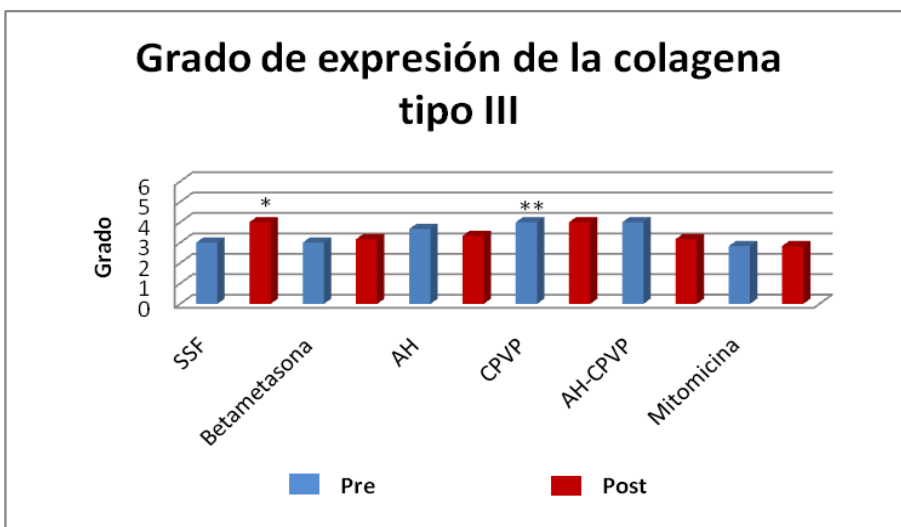
Promedio grado de expresión.

Grafica 4. Se aprecia el grado de expresión de colágena tipo II antes y después del tratamiento.



Numero de casos.

Grafica 5. Se observa la expresión pre y postratamiento de la colágena tipo III.



Promedio grado de expresión.

* $p < 0.001$ ANDEVA, $p < 0.005$ Tukey

Grafica 6. Muestra la expresión severa de colágena tipo III al final del estudio en los grupo tratados con SSF (*) y CPVP (**).