



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL
COSÍO VILLEGAS”

EFFECTOS DE MODULADORES DE LA CICATRIZACIÓN SOBRE LA
EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD ALFA DEL FACTOR INDUCIDO POR HIPOXIA
(HIF-1 ALFA) Y EL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR
(VEGF) EN LA CICATRIZACIÓN BRONQUIAL, EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE TRASPLANTE PULMONAR MODIFICADO.

TESIS

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN:

CIRUGÍA CARDIOTORÁCICA

PRESENTA:

DRA. ADRIANA SIMONETA PIMIENTA IBARRA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ MORALES GÓMEZ

ASESORES:

M EN C J RAÚL OLMOS ZUÑIGA

M EN C MARIANA SILVA MARTÍNEZ



INSTITUTO NACIONAL
DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS

Ciudad de México, septiembre de 2023



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.

AUTORIZACIONES

Dr. Juan Carlos Vázquez García

Director de Enseñanza

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”

Dra. María del Carmen Cano Salas

Subdirectora de Enseñanza

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”

Dra. Dayanna Lorelly Álvarez Monter

Jefa del departamento de Formación de Posgrado

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”

Dra. Francina Valezka Bolaños Morales

Profesor titular del Curso de Cirugía Cardiorácica

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”

Dr. José Morales Gómez

Director de Tesis

Profesor colaborador del Curso de Cirugía Cardiorácica

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”

Dra. Adriana Simoneta Pimienta Ibarra

Tesista

Residente de Cirugía de Tórax del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
“Ismael Cosío Villegas”

Índice

AUTORIZACIONES	2
RESUMEN	6
Palabras clave	7
INTRODUCCIÓN	8
1. MARCO TEÓRICO	9
1.1 Trasplante pulmonar	9
1.1.1 Tipos de Trasplante pulmonar	9
1.1.2 Complicaciones del trasplante pulmonar	10
1.2 Cicatrización	11
1.2.1 Hemostasia e inflamación	12
1.2.2 Proliferación	14
1.2.3 Fase de Maduración y remodelación	16
1.3 Neovascularización	16
1.3.1 Factor 1 inducido por hipoxia (HIF-1).....	17
1.3.2 Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	19
1.4 Cicatrización patológica	21
1.4.1 Cicatrices fibróticas.	21
1.4.2 Cicatrices deficientes o con retrasos en la cicatrización	22
1.5 Cicatrización bronquial postrasplante	22
1.5.1 Tratamientos de las complicaciones bronquiales	23
1.6 Moduladores de la cicatrización	23
1.6.1 Pirfenidona (PIRFE).....	24
1.6.2 Colágena polivinil-pirrolidona (CPVP)	24
2. JUSTIFICACIÓN	25
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	26

5. OBJETIVO.....	26
5.1 Objetivo general	26
5.2 Objetivos específicos.....	27
6. MATERIAL Y MÉTODOS	27
6.1 Diseño experimental	27
6.2 Animales de experimentación.	27
6.3 Grupos de estudio.....	28
6.4 Criterios de inclusión y exclusión.	29
6.4.1 Criterios de inclusión	29
6.4.2 Criterios de exclusión.	29
6.4.3 Criterios de eliminación.	29
6.4.5 Criterios de terminación.....	29
6.5 Procedimientos del estudio	29
6.5.1 Anestesia	29
6.5.2 Técnica quirúrgica	30
6.5.3 Protocolo de Inmunosupresión.....	32
6.5.4 Tratamiento.....	33
6.6 Evaluación	33
6.6.1 Clínica	33
6.6.2 Tomográfica.....	33
6.6.3 Macroscópica	34
6.6.4 Microscópica	34
6.6.5 Inmunohistoquímica	35
6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
7. RESULTADOS.....	37
7.1.Evaluación clínica.....	37
7.2 Hallazgos clínicos	37
7.3 Hallazgos tomográficos.	38
7.4 Hallazgos macroscópicos	39

7.5 Hallazgos morfométricos	41
7.6 Hallazgos microscópicos	42
7.7 Hallazgos inmunohistoquímicos	44
7.7.1 Expresión de VEGF.....	44
7.7.2 Expresión de HIF-1 α	45
8. DISCUSIÓN.....	47
9. CONCLUSIÓN	52
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

RESUMEN

La cicatrización bronquial postrasplante se complica por la deficiente microcirculación de la anastomosis, inmunosupresión (INM) e inflamación (INF), que afectan la neovascularización (NV). Para resolver esto, se ha probado la anastomosis microquirúrgica de las arterias bronquiales, el uso de colgajos de tejidos, han modificado la INM, pero no se ha logrado el éxito deseado; lo que hace necesario buscar un fármaco que favorezca la NV y regule la expresión de factores de crecimiento y de la MEC (matriz extracelular) durante la cicatrización. La colágena polivinil-pirrolidona (CPVP) y la pirfenidona (PIRFE) son moduladores de la cicatrización (MDC) que disminuyen la INF e incrementan la NV.

Objetivo. Evaluar el efecto del tratamiento con PIRFE o CPVP sobre la producción de HIF-1 α y VEGF en la cicatriz de la anastomosis bronquial y su relación con los cambios clínicos, tomográficos, macroscópicos y microscópicos en un modelo experimental de autotrasplante pulmonar modificado (ATxPM) en ratas.

Metodología. Veinticuatro ratas con ATxPM recibieron estos tratamientos: Grupo I (n=6): ATxPM sin tratamiento, Grupo II (n=6): ATxPM con colgajo de omento, Grupo III (n=6): ATxPM tratado con PIRFE. Grupo IV (n=6): ATxPM tratado con CPVP. Los animales se evaluaron clínica y tomográficamente. Al final del estudio macroscópica y microscópicamente se valoró la cicatrización bronquial e inmunohistoquímicamente la expresión HIF-1 α y VEGF. Resultados. Los animales tratados con CPVP mostraron mayor expresión de HIF1 y VEGF y NV vs los otros grupos, menor inflamación y fibrosis, así como mejor evolución clínica y menor disminución de la luz bronquial postrasplante que los grupos I y II, Conclusión. El

tratamiento con CPVP en ratas con ATxPM, incrementa la producción de HIF1, VEGF y neovascularización en la cicatriz de la anastomosis bronquial postrasplante; favorece la cicatrización macroscópica y microscópica con menor inflamación y fibrosis así como la buena evolución clínica y tomográfica en ratas con ATxPM.

Palabras clave: Cicatrización bronquial postrasplante, colágena polivinilpirrolidona (CPVP), pirfenidona (PIRFE), autotrasplante pulmonar modificado (ATxPM), factor 1 alfa inducido por hipoxia (HIF-1 α), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), neovascularización.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el trasplante pulmonar se ha convertido en el procedimiento de elección para los pacientes con enfermedades pulmonares terminales que ocasionan el deterioro progresivo de la función respiratoria, lo que provoca que estos pacientes sean dependientes de oxígeno (1-3).

En México, el primer trasplante pulmonar (TP) se realizó en 1989 en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias en un paciente con fibrosis pulmonar, quien y tuvo una sobrevida de 9 años (1,4). Hoy en día se reporta una totalidad de 1.1 trasplantes por cada millón de habitantes a nivel mundial (5,6). En EE.UU se ha reportado un aproximado de 2500 trasplantes al año, sumando un total de 48, 844 trasplantes desde junio de 1988 hasta el 30 de junio 2023 (7). Así mismo, hasta 2023 en México se ha reportado un total de 9 pacientes según el centro nacional de trasplante de México (CNTM), pero no mencionan la sobrevida de estos pacientes (8) y tan solo se ha registrado 1 trasplante de pulmón realizado durante el año en curso. Cabe mencionar que en México, el TP ha tenido un desarrollo lento y hasta la fecha solo existe un único programa activo en todo el país (9).

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Trasplante pulmonar

1.1.1 Tipos de Trasplante pulmonar

En la actualidad existen cuatro modalidades: A) Trasplante unilateral, B) Trasplante bipulmonar o doble, o bilateral secuencial, C) Trasplante corazón-pulmón C) Trasplante lobar.

El trasplante unilateral, se utiliza generalmente para pacientes con patología no séptica de tipo de fibrosis pulmonar (10) y consiste en la sustitución de un solo pulmón, mediante la realización de anastomosis de la arteria pulmonar, de un rodete de aurícula y del bronquio principal (4).

El trasplante bilateral o bipulmonar se lleva a cabo en pacientes enfermos con patología séptica pulmonar, fibrosis quística y bronquiectasias de otro origen (10). Esta modalidad de trasplante consiste en realizar trasplante secuencial unilateral en cada lado del tórax, en el cual primero se coloca un pulmón y al concluir las anastomosis se inicia con el órgano del lado contralateral lo que sustituye así a ambos pulmones (4).

Trasplante lobar, es una modalidad que se considera en receptores con un tamaño reducido de caja torácica y ofrece la opción de tomar injertos del donador vivo relacionado. Esta técnica es similar a la del TP unilateral solo que, en esta en lugar de suturar un rodete de aurícula, se sutura la vena pulmonar correspondiente al lóbulo pulmonar a trasplantar. No obstante, la realización de este tipo de trasplante ha generado dilemas éticos, debido a que la cantidad de tejido pulmonar funcional que se necesita, requiere de la obtención e implante de dos lóbulos tomados de

donadores vivos relacionados; porque se somete a dos donadores al riesgo de una lobectomía y al problema del deterioro natural de la función pulmonar (4).

Trasplante de bloque cardiopulmonar, se utiliza en pacientes con hipertensión pulmonar severa secundaria a una cardiopatía usualmente congénita, para este tipo de trasplante se somete al receptor a circulación extracorpórea y se lleva a cabo con la anastomosis termino-terminales de tráquea, aorta y cavas (4).

1.1.2 Complicaciones del trasplante pulmonar

Aunque los aspectos de la técnica quirúrgica, la preservación de órganos, cuidados perioperatorios y la inmunosupresión se han perfeccionado, el llevar a cabo un TP puede presentar complicaciones, las cuales pueden ser pretrasplante o postrasplante. Dentro de las primeras se encuentran la falta de donadores, el estado biológico del pulmón donador (neumonía, daño pulmonar agudo asociado a la asistencia mecánica ventilatoria) y la preservación pulmonar; mientras que postrasplante, de acuerdo con la Sociedad Internacional de Trasplante de Corazón y Pulmón, se pueden desarrollar complicaciones como: daño por isquemia reperfusión (DPIR), rechazo agudo o crónico, complicaciones inmunológicas (infecciones) bronquiolitis obliterante, neoplasias y las relacionadas con la cicatrización bronquial que suele presentarse a causa de una irrigación deficiente del bronquio (2,3,11-13).

1.2 Cicatrización

La cicatrización de heridas es una compleja cascada celular y de señalización bioquímica que tiene como objetivo la restauración de la integridad y la función del tejido lesionado. Los diferentes tejidos del cuerpo humano cicatrizan utilizando mecanismos similares; se trata de un proceso dinámico que se lleva a cabo en diferentes fases como: hemostasia e inflamación, proliferación, así como la maduración y remodelación, las cuales son continuas, se pueden superponer y están precisamente programadas (14).

FASE	EVENTOS CELULARES Y BIOLÓGICOS
HEMOSTASIA	1 Vasoconstricción 2. Agregación plaquetaria, degranulación, formación de fibrina.
INFLAMACIÓN	Infiltración de neutrófilos Infiltración de monocitos y diferenciación a macrófagos. Infiltración linfocítica
PROLIFERACIÓN	Reepitelización Angiogénesis Síntesis de colágeno Formación de MEC
REMODELACIÓN	Remodelación de la colágena. Maduración y regresión vascular

Cuadro 1. Fases de la cicatrización y eventos celulares y biológicos que se presentan durante esta (Tomado de Guo S 2010) (15).

Las heridas pueden ser agudas o crónicas; las primeras tienen diferentes causas como la incisión quirúrgica, abrasión, laceración, etc. y su curación se lleva a cabo en un corto periodo de tiempo. En las heridas crónicas, la cicatrización fracasa y el proceso de reparación no puede formar con éxito un tejido anatómico y funcional (16).

En la fase inflamatoria se limpia la herida de partículas extrañas, bacterias y tejido muerto; siendo los neutrófilos la primera población de células que llega a la zona de la herida los cuáles se encargan de eliminar a los patógenos. A continuación, los macrófagos migran a la herida y continúan el proceso de limpieza; esto genera una cascada de señalización que termina por activar a otras poblaciones como a los fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales. En la fase proliferativa se forma el tejido de granulación, la reepitelización y la restauración de la red vascular; en esta fase los fibroblastos son los protagonistas

1.2.1 Hemostasia e inflamación

La hemostasia se inicia inmediatamente después de presentarse la lesión, cuando se altera la integridad del tejido y esta etapa tiene una duración de hasta 15 minutos. Su objetivo principal es el cese de la hemorragia y la formación del coágulo (17). Durante esta etapa después de que el tejido sufre pérdida de la continuidad, ruptura de vasos sanguíneos y matriz extracelular (MEC); lo primero que se produce es una vasoconstricción y la exposición de la colágena subendotelial, lo cual promueve la agregación, así como la y degranulación plaquetaria. Posteriormente, a partir de sus

gránulos, las plaquetas activadas liberan lisosomas y cuerpos densos de proteínas tales como la trombospondina, fibronectina, factor plaquetario 4 (PF-4), proteasas y metabolitos del ácido araquidónico. Mientras que la extravasación sanguínea aporta otro grupo numeroso de proteínas, como el fibrinógeno, la fibronectina, la trombospondina, la vitronectina, la trombina y el factor de von Willebrand; que dan lugar a la formación de coágulos de fibrina, los cuales son el producto final de las vías intrínseca y extrínseca de la coagulación (18) y son los encargados de detener el sangrado y prevenir la invasión microbiana, actuar como andamiaje para las células que promueven la fase inflamatoria; favoreciendo la quimiotaxis (principalmente de polimorfonucleares) y la regeneración del tejido a través de citocinas y factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformador beta (TGF- β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de necrosis tumoral (TNF) (14,17,19).

La fase inflamatoria se caracteriza por una infiltración secuencial de neutrófilos, macrófagos y linfocitos. Esta fase es promovida en el sitio de la lesión, cuando el daño tisular es sentido por los macrófagos residentes a través de los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés). En esta fase, los neutrófilos, son atraídos a la herida por la IL-1, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF), el factor plaquetario cuatro (PF4), así como los productos bacterianos y tienen como función principal la eliminación de los microorganismos invasores y detritus celulares en la herida produciendo proteasas y sustancias reactivas de oxígeno. Una vez que se ha limpiado la herida, los monocitos circundantes son atraídos al lecho de la misma y se transforman en macrófagos alrededor de las 48-

96 horas, los cuáles en etapas tempranas liberan citocinas proinflamatorias y se encargan del aclaramiento de células apoptóticas, esto genera una cascada de señalización que termina por activar a otras poblaciones como a los fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales, promoviendo la transición a la fase proliferativa; con un pico de acumulación de macrófagos dentro de los 4-7 días posteriores a la lesión (20,21). Aunque los macrófagos son cruciales para las fases iniciales de la cicatrización de heridas, la presencia prolongada de macrófagos inflamatorios retrasa la resolución de la inflamación y puede exacerbar la respuesta inflamatoria, lo cual es dañino para el tejido lo que conduce a la cicatrización fibrótica (22). Entre las citocinas proinflamatorias producidas por estas células destacan el TNF, la IL-1 β y la IL6, todas las cuales se ha observado que aumentan en otras patologías de la vía aérea relacionadas por fibrosis como las estenosis traqueales (23).

1.2.2 Proliferación

La proliferación está constituida por varios procesos como la fibroplasia (formación de tejido de granulación y a la reconstitución de la matriz del tejido lesionado), angiogénesis, reepitelización y contracción de la herida. Durante esta, el coágulo formado previamente va a ser reemplazado por matriz extracelular formada a partir de proteoglicanos, ácido hialurónico, colágena, así como elastina.

En esta etapa, los fibroblastos y las células endoteliales son las células más importantes, ya que inmediatamente después de que se produce la herida, cuando se lesiona el vaso sanguíneo disminuye el oxígeno tisular y la hipoxia favorece que

las plaquetas y macrófagos estimulen la liberación de TGF β 1, PDGF y VEGF que son factores de crecimiento que estimulan la proliferación y activación de los fibroblastos (19,24), los cuales migran sobre una matriz de fibronectina que proporciona un molde para las fibrillas de colágena e interviene en la contracción de la herida. Para moverse a través de esta matriz de fibrina, se requiere un sistema proteolítico que facilite el desplazamiento celular, por lo que los fibroblastos liberan proteasas séricas (plasmina y plasminógeno del suero, activador del plasminógeno) y colagenasas (MMP-1 o metaloproteinasa de la matriz; MMP-2 o gelatinasa y MMP-3 o estromalisina). El PDGF estimula la liberación de estas proteínas del fibroblasto mientras que el TGF β induce la secreción de inhibidores de las proteinasas, controlando así la degradación de la matriz. 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) inician con la síntesis de colágena (tipos I, III y VI) 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 colágena (14). Finalmente se diferencian en miofibroblastos por la señal del TGF β (derivada de los macrófagos) para la posterior contracción de la herida a través de sus pseudopodos; lo cual llevará finalmente al cierre de la herida (25). Si la herida es de larga duración, los fibroblastos de las heridas también pueden proceder de fibrocitos, que es un grupo de células progenitoras mesenquimales derivadas de la médula ósea; los cuales también actúan como células presentadoras de antígeno y como potenciadores de la neovascularización (26).

1.2.3 Fase de Maduración y remodelación

El proceso de maduración requiere de la reorganización de los recientes depósitos de colágeno en estructuras organizadas y entrelazadas; mientras que el proceso de remodelación involucra un balance entre apoptosis de las células ya existentes y producción de células nuevas. Esta fase puede continuar por meses, inclusive años. Alguna aberración puede llevar a cicatrización patológica o formación de heridas crónicas (19).

1.3 Neovascularización

Como ya se mencionó la neovascularización es muy importante en la fase proliferativa de la cicatrización ya que permite la formación de vasos sanguíneos durante la reparación de los tejidos y puede presentarse de dos maneras denominadas vasculogénesis y angiogénesis.

La vasculogénesis es el proceso mediante el cual se forman vasos sanguíneos de novo a partir de células progenitoras durante la vida embriológica, pero no se sabe si estas células progenitoras son capaces de reconstruir de forma independiente una red neovascular en el organismo adulto. Por otro lado, la angiogénesis es el proceso por el cual se forman vasos a partir de vasos preexistentes e implica la migración y proliferación de células endoteliales con la consecuente formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares que darán lugar a vasos sanguíneos estables (27).

La angiogénesis se puede activar por medio de diferentes señales cómo la hipoxia, isquemia, así como la lesión de un vaso sanguíneo. Sin embargo, para que esto se lleve a cabo de manera adecuada, debe existir un balance entre aquellos

mediadores químicos que promueven la angiogénesis (factores proangiogénicos) y los que la inhiben. Dentro de los factores proangiogénicos encontramos al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), angiopoyetina-1 (ANG-1), factores de crecimiento fibroblástico (FGFs), factor de necrosis tumoral (TNF), triptasa, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), proteínas NOTCH (proteína con dominio transmembranal que actúa de receptor para proteínas transmembranales adyacentes, importante para la diferenciación), IL-6 e IL-8 (28), proteínas de matriz extracelular (fibronectina, colágena etc), moléculas de adhesión y sus receptores (integrina $\alpha\beta$, VE cadherinas), así como las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) que participan en la degradación de la lámina basal y proteínas de matriz, lo cual incrementa la permeabilidad y favorece la migración y proliferación de las células endoteliales para formar estructuras parecidas a tubos (29-31).

En la literatura se ha reportado que la hipoxia activa a un factor de transcripción sensible al oxígeno conocido como factor inducido por hipoxia (HIF-1) y se ha descubierto que es uno de los reguladores principales de la angiogénesis. Ya sea durante un proceso fisiológico o patológico el HIF participa en la formación de vasos sanguíneos mediante relaciones sinérgicas con otros factores proangiogénicos como el VEGF, el PIGF (factor de crecimiento placentario) o las angiopoyetinas (29).

1.3.1 Factor 1 inducido por hipoxia (HIF-1)

El factor inducido por hipoxia-1 (HIF-1) es un complejo proteico presente en todas las células de mamíferos que facilita la entrega de oxígeno y la adaptación a la

privación de oxígeno al regular la expresión de genes involucrados en procesos celulares como captación de glucosa y metabolismo glucolítico, angiogénesis, eritropoyesis, supervivencia celular y apoptosis (32). El HIF-1 ha sido reconocido como esencial para la supervivencia del condrocito, permitiendo a las células adaptarse a condiciones bajas de oxígeno dentro de los discos de crecimiento (33).

La hipoxia celular induce la expresión de diferentes genes, donde la transcripción de estos genes que responden a la hipoxia es regulada por factores que reconocen secuencias específicas en el ADN denominado Hipoxia Response Element (HRE). El principal factor de transcripción implicado como clave en la regulación de genes que se inducen por hipoxia es el inducible por hipoxia-1 (HIF-1), un heterodímero formado por una subunidad α de 120 kDa y una subunidad β de 91-94 kDa. La actividad biológica de HIF-1 está dada principalmente por la actividad y expresión en la subunidad α , la que en condiciones de normoxia es hidroxilada y degradada. Sin embargo, en condiciones de hipoxia se inhibe esta reacción y es translocada al núcleo donde dimeriza a la subunidad beta, para luego unirse a la secuencia específica HRE presentes en el promotor de los genes inducidos por hipoxia (32,34,35) .

Como ya se mencionó, al disminuir la concentración de oxígeno, disminuye también la degradación del HIF-1 α con lo cual se promueve la glicolisis, que permite que el ATP se sintetice de forma oxígeno-independiente y permite una regulación positiva hacia factores que mejoran el flujo sanguíneo y por lo tanto la entrega de oxígeno a los tejidos desprovistos del mismo; esto a través de la activación del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF). En segundo lugar, también participa aumentando la expresión de la metaloproteinasas 2 (MMP-2) para la degradación de

las matrices extracelulares, lo cual permitirá que las células endoteliales migratorias se relacionen con las integrinas $\alpha\beta$ y formen tubos (36-38).

El factor HIF-1, durante el proceso de cicatrización de las heridas, tiene muchas implicaciones clínicas: la deficiencia de HIF-1, con la subsecuente deficiencia a la respuesta al estímulo hipóxico, genera hipoxemia crónica, lo que predispone a la formación de heridas crónicas (39).

1.3.2 Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), denominado inicialmente factor de permeabilidad vascular (VPF), descubierto por el Dr. Herald Dvorak en 1975; es una glicoproteína homodimérica de 34-42 kDa (40), que pertenece a una subcategoría de cisteínas no derivadas del factor de crecimiento plaquetario; la cual es producida por muchos tipos celulares, incluyendo las células tumorales, macrófagos, plaquetas, queratinocitos y células mesangiales (41,42).

El VEGF durante la cicatrización de heridas y angiogénesis actúa directamente sobre el endotelio vascular, en el que puede inducir cambios morfológicos, alterar la expresión genética, estimular la proliferación y migración celulares e inhibir la apoptosis en las células endoteliales, esto último a través de las proteínas Bcl-2 y A1; iniciando así la formación de nuevos capilares y permitiendo su maduración (40,41,43). También participa en la secreción de enzimas de degradación de la MEC (colagenasa, activador tisular del plasminógeno tipo urocinasa). Cabe mencionar que su capacidad para hacer incrementar la permeabilidad de las CE microvasculares es muy elevada, mientras que su actividad mitogénica se queda atrás al compararlo con otros factores pro-angiogénicos.

La fuga plasmática facilitada por el VEGF es un paso importante en la formación de la matriz de fibrina provisional que favorece la atracción de células inflamatorias y el consecuente crecimiento y formación del estroma maduro vascularizado (43).

El VEGF está formado por 4 familias de proteína homodiméricas y se dividen en: VEGF-A, VEGF-B, VEGFC, VEGF-D, los cuales realizan su función en las células diana a través de tres receptores con actividad tirosina cinasa intrínseca clase IV: VEGFR-1 (Flk-1), VEGFR-2 (KDR), y VEGFR-3, localizados en células endoteliales y en otros tipos celulares. El VEGF C y D son esenciales para el desarrollo del sistema linfático y pueden inducir la angiogénesis e incrementar la permeabilidad vascular (41,43).

Esta familia también abarca al factor de crecimiento placentario; sin embargo este se expresa en la angiogénesis patológica, suplementando y/o potenciando la actividad del VEGF A en células tumorales (42,44).

De los miembros de esta familia, el VEGF-A es considerado el factor angiogénico más importante, se estimula por la hipoxia (a través de la vía HIF-1) y su función es incrementar la permeabilidad vascular, estimular la proliferación y migración de las células endoteliales; además de proveer a dichas células con señales de supervivencia inhibiendo su apoptosis. El VEGF A no representa una molécula única, se trata de un grupo de moléculas que aparecen en varias isoformas (16 en total), las cuales se deben al empalme alternativo que tienen durante su codificación genética; siendo el VEGF A 165 la isoforma más relevante en la angiogénesis fisiológica y patológica. Las isoformas de este grupo se unen comúnmente al receptor de tirosin-cinasa VEGF 1 (Flt-1) y VEGF2 (KDR), cuando se une con este último es cuando se activa la angiogénesis, causando dimerización y activación por

transfosforilación (transferencia de grupos fosforilo) (43), alterando el patrón de expresión génica de las células endoteliales, a través del aumento de la expresión de una serie de factores de transcripción (DSCR-1, TR3/Nur77); proteínas asociadas a la coagulación (factor tisular) fibrinolíticos, (uPA y su receptor, tPA, PAI-1), metaloproteasas de matriz, el transportador de glucosa GLUT-1, la sintetasa de óxido nítrico, factores antiapoptóticos (bcl-2, A1, survivina, XIAP), moléculas de adhesión de células endoteliales (E-selectina, ICAM-1, VCAM); etc (45).

1.4 Cicatrización patológica

Durante la cicatrización cualquier alteración en la inflamación y en la angiogénesis va a provocar la generación de una cicatriz patológica (15), las cuales son totalmente diferentes a las que se presentan cuando hay una respuesta normal de reparación y se caracterizan por ser fibróticas o por mostrar una cicatrización deficiente o retrasos en la cicatrización (46).

1.4.1 Cicatrices fibróticas.

La formación de cicatrices fibróticas siempre está precedida de una prolongación de la fase inflamatoria de la cicatrización o una alteración durante la contracción o remodelación, en la que se presenta incremento en la síntesis de citocinas profibrogénicas que promueven la expresión de componentes profibróticos de la cicatrización y a la disminución en la degradación de estas proteínas generalmente por la falta de colagenasas (MMP1) durante la contracción (46-49).

1.4.2 Cicatrices deficientes o con retrasos en la cicatrización

Las cicatrices deficientes o con retrasos en la cicatrización, se caracterizan porque presentan un incremento en la expresión de mediadores inflamatorios, MMPs, disminución de la actividad de los factores de crecimiento, lo cual provoca que en la herida se degrade el nuevo tejido, así como los factores de crecimiento y se transformen en crónicas debido a que poseen insuficiente deposición de las proteínas de la MEC (48, 50).

1.5 Cicatrización bronquial postrasplante

La cicatrización bronquial postrasplante (CBPT) puede sufrir de complicaciones como broncomalacia y estenosis de la vía aérea (51), las cuales se asocian con la sección de las arterias bronquiales (predisponen a la presencia de isquemia bronquial), rechazo agudo del injerto, infecciones bacterianas y fúngicas y la técnica anastomótica (52). También se ha descrito a la inmunosupresión, ya que el uso de fármacos que tienen efecto antiproliferativo, así como el uso de esteroides, predispone a una mayor incidencia de dehiscencias de las anastomosis (53,54).

Además, cabe mencionar que tanto la técnica quirúrgica y la inmunosupresión dañan la microvasculatura bronquial, lo cual afecta la angiogénesis, remodelación vascular y predispone a la presencia de isquemia de la mucosa e inflamación, que favorecen la presencia de cicatrización bronquial patológica (3, 55), debido a que alteran la producción de factores de la angiogénesis (factor de crecimiento del endotelio vascular [VEGF]) y del crecimiento (factor de crecimiento transformante β

[TGFβ]) (56-58), moléculas de adhesión de la matriz extracelular (MEC) (molécula de adhesión plaquetaria y endotelial tipo 1 [PECAM-1 o CD31]) (59-62) y colágena, así como metaloproteinasas que intervienen durante la angiogénesis, neovascularización y la cicatrización (63-66).

1.5.1 Tratamientos de las complicaciones bronquiales

Para tratar de evitar dichas complicaciones bronquiales postrasplante, se ha intentado mediante microcirugía la reanastomosis de las arterias bronquiales, se ha modificado la técnica de sutura y anastomosis (ejemplo: telescopiado de la anastomosis), se ha envuelto la misma en colgajos de omento (omentopexia) y musculares; y se han modificado los tipos y dosis de inmunosupresión entre otras, pero ninguna ha sido exitosa al 100% (2), por lo que hay que buscar otras alternativas para estimular la angiogénesis y neovascularización, como el uso de fármacos moduladores de la cicatrización que las favorecen y con esto mejorar la cicatrización de la anastomosis bronquial postrasplante.

1.6 Moduladores de la cicatrización

En la literatura se ha reportado que la Pirfenidona (PIRFE) y la Colageno polivinil pirrolidona (CPVP), moduladores de la cicatrización (MDC), que disminuyen la inflamación, fibrosis y promueven la neovascularización y la cicatrización en varios tejidos (tráquea, pulmón, piel) (67,68); sin embargo, no se ha estudiado su efecto sobre la cicatrización bronquial postrasplante pulmonar.

1.6.1 Pirfenidona (PIRFE)

La Pirfenidona (5-metil-1-fenil-2-[1H]-piridina) (PIRFE) es un fármaco que previene y revierte la fibrosis, (69) ya que actúa como antifibrótico y antiinflamatorio regulando la proliferación de fibroblastos y su transformación a miofibroblastos, también inhibe la síntesis de colágeno gracias a que bloquea la expresión de citocinas como la IL-1 e IL-6 y factores de crecimiento como el TNF- α y TGF- β , con lo que reduce las fibrosis patológicas. Su uso tanto experimental como clínico ha mostrado buenos resultados en cicatrices fibróticas de piel, fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, fibrosis renal (70); pero su utilidad en la cicatrización bronquial post TP no se ha estudiado, ni el efecto que tiene sobre la producción de HIF1 y VEGF durante la cicatrización.

1.6.2 Colágena polivinil-pirrolidona (CPVP)

Es un biofármaco inyectable de colágeno polimerizado con propiedades inmunomoduladoras cuyos efectos electroforéticos, fisicoquímicos y farmacológicos son únicos, debido a la unión covalente entre el colágeno y la PVP, los cuales han tenido buenos resultados cuando se usa como MDC en las reparaciones de heridas dérmicas y la consolidación ósea a través de la inducción de macromoléculas a la matriz extracelular. La CPVP actúa sobre los fibroblastos y macrófagos y modula el recambio en la MEC, particularmente la colágena tipo I y III, disminuye la expresión de IL-1B, factor de necrosis tumoral (TNF- α) factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), favoreciendo el recambio de los componentes del tejido conjuntivo con la

consecuente eliminación de proteínas fibrosas (71, 72). En piel ha demostrado que al tener estos efectos disminuye el volumen de la cicatriz, desaparece el infiltrado inflamatorio y restablece la arquitectura normal de la cicatriz tratada con ésta. También se ha observado que su uso post traqueoplastía disminuye la cantidad de colágena formada por gramo de tejido traqueal en el sitio de la anastomosis (67,68); pero, su utilidad en la cicatrización bronquial post TP no se ha estudiado, al igual que su efecto sobre la producción de HIF1 y VEGF en la cicatrización de este tejido.

2. JUSTIFICACIÓN

La cicatrización de la anastomosis bronquial postrasplante pulmonar puede ser patológica hasta en el 25% de los casos y ocasionar mortalidad entre el 2-5% de los casos. Estas se presentan por la deficiente microcirculación en el sitio de la anastomosis, inmunosupresión (INM) e inflamación (INF) que afectan la angiogénesis (ANG), neovascularización (NV), producción de factores de crecimiento proangiogénicos y la expresión de componentes de la matriz extracelular (MEC) que intervienen en la cicatrización. Para solucionar esto, se han utilizado diferentes técnicas quirúrgicas de la anastomosis, colocación de colgajos de tejidos y se modificó la inmunosupresión, pero ninguna ha sido 100% exitosa; lo que hace necesario buscar un fármaco que favorezca la ANG, NV y la cicatrización bronquial adecuada. La PIRFE y la CPVP son MDC han demostrado disminuyen la inflamación (INF) e incrementan la NV en la cicatrización traqueal; por lo que se propone estudiar el efecto de estos MDC sobre la neovascularización bronquial a través de la expresión de HIF-1 y VEGF en la cicatriz de la anastomosis bronquial postrasplante.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La colágena polivinil-pirrolidona (CPVP) y la pirfenidona (PIRFE), regularan la expresión de HIF-1 α , así como el VEGF, y favorecerán la angiogénesis y neovascularización, en la cicatrización bronquial postrasplante, en un modelo experimental de autotrasplante pulmonar modificado?

4. HIPÓTESIS

La PIRFE y la CPVP son MDC que favorecen la angiogénesis, neovascularización y la buena cicatrización en tráquea y piel, entonces el administrarlos en ratas con autotrasplante pulmonar modificado favorecerá la expresión de los factores de crecimiento como HIF-1 y VEGF que incrementan la angiogénesis, neovascularización y la adecuada cicatrización postrasplante.

5. OBJETIVO

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del tratamiento con PIRFE o CPVP sobre la producción de HIF1 y VEGF en la cicatriz de la anastomosis bronquial.

5.2 Objetivos específicos

Evaluar el efecto del tratamiento con CPVP o con PIRFE vía oral sobre los cambios clínicos, tomográficos, morfométricos y microscópicos de la cicatriz bronquial en un modelo experimental de trasplante pulmonar modificado en ratas.

Valorar el efecto del tratamiento con CPVP o con PIRFE, sobre la expresión in situ de HIF-1 α y VEGF, así como su relación con la neovascularización, en la cicatriz de la anastomosis bronquial en un modelo experimental de autotrasplante pulmonar modificado.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental

Se realizó un estudio prospectivo, longitudinal, comparativo y experimental, cuyo financiamiento fue otorgado por la Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental del Departamento de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER).

6.2 Animales de experimentación.

Se utilizaron 24 ratas de raza Wistar clínicamente sanas, sin importar el sexo o la edad, con peso entre 200 y 350 g, las cuales fueron manejadas de acuerdo de acuerdo a las especificaciones técnicas para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana (73) y de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos (74).

6.3 Grupos de estudio.

Las ratas fueron divididas en 4 grupos de estudio.

A todos los animales se les realizó autotrasplante pulmonar modificado (ATPM) (75) en el que se realizó disección y pinzamiento del hilio pulmonar izquierdo, seccionó el bronquio y se reanastomosó, y los animales fueron tratados de la siguiente manera:

Grupo I (n=6): ATPM con anastomosis bronquial sin tratamiento (Control) (AB-ST);

Grupo II (n=6): ATPM con anastomosis bronquial y omentopexia (AB-O);

Grupo III (n=6): ATPM y anastomosis bronquial tratada con PIRFE (AB-PIRFE) cada 24 horas post cirugía;

Grupo IV (n=6): ATPM y anastomosis bronquial tratada con CPVP (AB-CPVP) cada 7 días post cirugía.

El tamaño de la muestra fue calculado para una población finita (4584 en el mundo) con un intervalo de confianza del 95% teniendo como resultado 95 individuos por grupo; sin embargo, ya que las normas oficiales nacionales e internacionales para el uso y manejo de los animales de laboratorio no permiten el uso excesivo de los mismos, se recomienda que las investigaciones realizadas en animales se lleven a cabo bajo la Ley de las Tres Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) (76), por lo que la cantidad de sujetos experimentales se redujo al mínimo, para que se alcanzaran diferencias estadísticas y se obtuvo un número de 6 animales por grupo.

6.4 Criterios de inclusión y exclusión.

6.4.1 Criterios de inclusión

Se incluyeron ratas Wistar clínicamente sanas, que no presentaron signos clínicos de ningún padecimiento respiratorio desde su llegada al bioterio del INER y antes de realizar el procedimiento quirúrgico.

6.4.2 Criterios de exclusión.

Los animales que presentaron cualquier cuadro clínico de enfermedad respiratoria durante su permanencia en el bioterio del INERICV previo al procedimiento quirúrgico no se incluyeron en este estudio.

6.4.3 Criterios de eliminación.

Todo animal que presentó signos clínicos de cualquier patología que no fuera provocada, ni se relacionara con el procedimiento quirúrgico fue eliminada.

6.4.5 Criterios de terminación.

Aquellos animales que mostraron signos de dolor agudo o crónico, o signos de enfermedad respiratoria relacionada con el procedimiento y que no disminuyeron con la aplicación de medicamentos, fueron sometidos a eutanasia con sobredosis anestésica utilizando pentobarbital sódico (Anestesal, Pfizer S.A. de C.V. Guadalajara, México).

6.5 Procedimientos del estudio

6.5.1 Anestesia

En todos los animales la anestesia fue inducida con Hidrocloruro de Xilacina (Prozin, Pisa; Guadalajara, México) a dosis de 5 mg/kg y 120 mg/kg de Ketamina (Anesket,

Pisa, Guadalajara, México) vía intraperitoneal (IP) mezclados en la misma jeringa; durante la cirugía se administró lidocaína (Lidocaína, Pisa, Guadalajara, México) en el sitio de la incisión. Una vez inducida la anestesia los animales fueron intubados orotraquealmente, se conectaron a un equipo de anestesia inhalada (Care Station 620, General Electric, Helsinki, Finlandia) y durante todo el procedimiento quirúrgico, se mantuvieron con sevoflurano al 1.5%.

6.5.2 Técnica quirúrgica

En el grupo II, a través de una celiotomía, se extrajo el omento, el cual se introdujo en el hemitórax izquierdo por una incisión de aproximadamente 1 cm que se realizó en el hemidiafragma izquierdo, y posteriormente este se utilizó para envolver la anastomosis bronquial. Una vez que se envolvió la anastomosis, este se fijó con un punto de poliglactina 910 de 8-0 y se continuó con el cierre convencional (Figura 1).

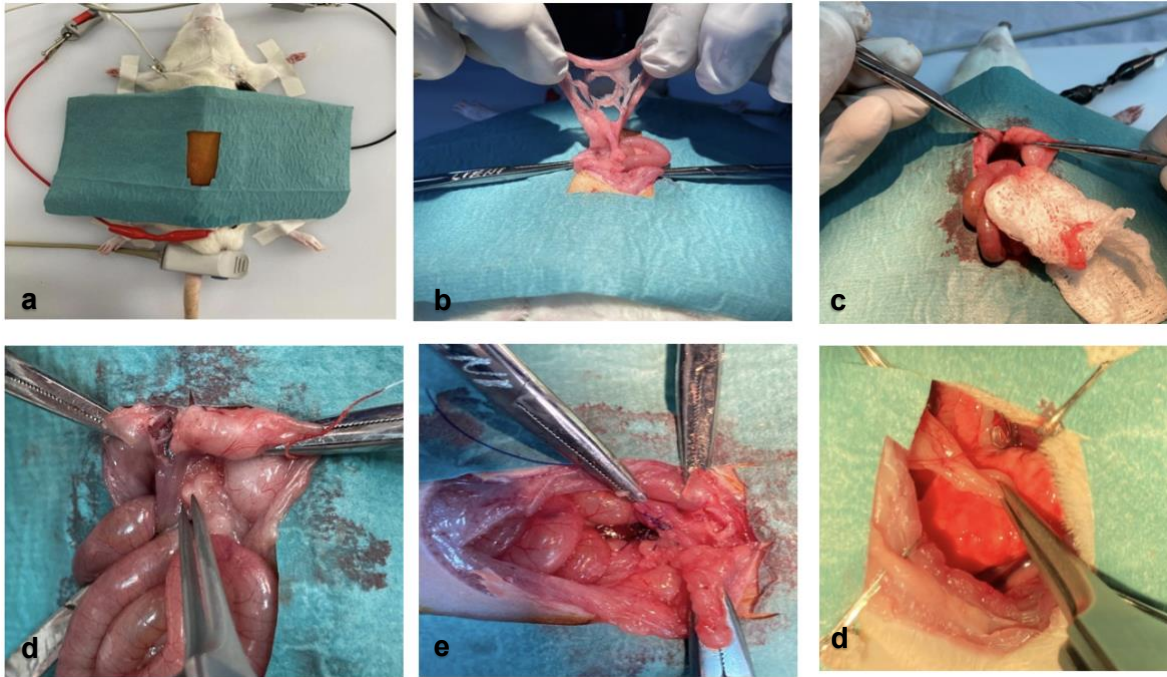


Figura 1. Técnica quirúrgica omentopexia: a) Incisión de laparotomía, b) Disección y medición del omento, c,d) apertura del diafragma y paso del omento a cavidad torácica, e, f) Paso del omento sin tensión a cavidad torácica y fijación del mismo al sitio de anastomosis bronquial.

En todos los grupos, se realizó toracotomía izquierda en el quinto espacio intercostal y se disecó el hilio pulmonar izquierdo. Concluida la disección, cada estructura del hilio pulmonar se pinzó individualmente, posteriormente el bronquio izquierdo fue seccionado transversalmente e inmediatamente se reanastomosó utilizando surgete continuo y material de sutura absorbible poliglactina 910 (Vicryl, Ethicon, New Jersey, USA) de 8-0. Concluido esto, se continuó con el cierre convencional (Figura 1). Finalmente, todos los animales recibieron tramadol (Tramadol Jet, Norvet; Ciudad de México, México) y meloxicam SC (Melodex, Aranda; Querétaro, México) a dosis de 5 mg/Kg y 0.2 mg/Kg respectivamente, como analgésicos postquirúrgicos

por 3 días y enrofloxacina (Baytril, Bayer; Leverkusen, Alemania) a dosis de 5 mg/kg SC cada 24 h por cinco días.

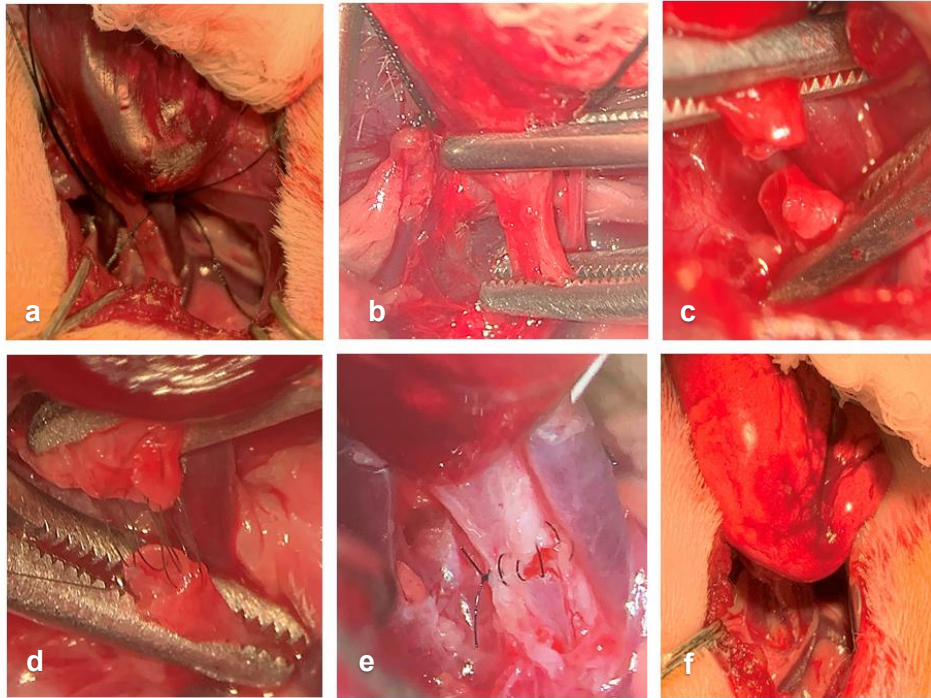


Figura 2. Técnica quirúrgica. a) exposición del hilio pulmonar, b) y c) pinzamiento y sección del bronquio principal izquierdo, d) sutura de la cara posterior del bronquio, e) sutura de la cara anterior y f) pulmón izquierdo insuflado al concluir la anastomosis.

6.5.3 Protocolo de Inmunosupresión

Todos los animales un día antes de realizar la cirugía y durante todo el tiempo de estudio, recibieron un esquema triple de inmunosupresión cada 24 horas, con Tacrolimus (Framebin, Pisa, Guadalajara, México) (0.15 mg/kg VO), así como Azatioprina (Azatrim, Lemerin, Huichapan, México) (2mg/kg VO) y prednisona (2mg/kg, IV) (Solumedrol, Fizer, D.F. México) (77).

6.5.4 Tratamiento

Los animales del Grupo III recibieron 40/mg/Kg de PIRFE VO (dosis utilizada experimentalmente en modelos de estenosis traqueal (67); mientras que en los animales del grupo IV, semanalmente y durante 4 semanas se les administraron SC 2.5 mg de CPVP (dosis utilizada para los problemas de piel, tendones y experimentalmente en estenosis traqueales crónicas) (67,68).

6.6 Evaluación

Todos los animales fueron evaluados durante 4 semanas post ATPM de la siguiente forma:

6.6.1 Clínica

Todas las ratas se valoraron clínicamente todos los días en la primera semana posquirúrgica, cada tercer día en la segunda semana y posteriormente cada semana hasta concluir el tiempo de estudio. En esta se valoró principalmente la presencia de estridor y disnea.

6.6.2 Tomográfica

Todos los animales se sometieron a tomografía axial computarizada (TAC) con cortes axiales y coronales de la cavidad torácica, para evaluar el estado de la anastomosis bronquial y el tamaño de su luz bronquial. Esta evaluación se llevó a cabo pre ATPM y al concluir el tiempo de estudio.

6.6.3 Macroscópica

Al cumplirse el tiempo de estudio establecido, los animales animales de experimentación se sometieron a eutanasia con sobredosis de pentobarbital sódico 100 mg/kg IV (Anestesal, Pisa Agropecuaria, Hidalgo, México). Posteriormente se extrajo el bronquio anastomosado, se identificó la anastomosis y se le valoró su cicatrización, presencia de adherencias, fistulas, dehiscencias, estenosis y broncomalacias. También mediante morfometría, se evaluó el tamaño de la luz bronquial.

6.6.4 Microscópica

Para el estudio histológico, se tomaron muestras de todas las anastomosis, las cuales se fijaron en formaldehído al 10% y a las 24 horas se incluyeron en parafina y se les realizaron cortes de 4µm, que se tiñeron con hematoxilina-eosina, así como con tinción tricrómica de Massón. Posteriormente, en toda la circunferencia de la muestra de la cicatriz de la anastomosis bronquial se evaluó la presencia de inflamación, fibrosis, organización de las fibras de colágena y vasos de neoformación. A cada uno de estos parámetros se les asignó un grado de acuerdo con la intensidad de los cambios histopatológicos (grado 1: ausente 0-10%, grado 2: leve 11-25%, grado 3: moderado 26-50% y grado 4: severo 51-100%) (78).

6.6.5 Inmunohistoquímica

La determinación de la expresión in situ de VEGF, y de la fracción alfa del HIF-1 en las biopsias obtenidas de la cicatriz bronquial se llevó a cabo por inmunohistoquímica. A las muestras incluidas en parafina se les realizaron cortes de tres micras y se montaron en laminillas silanizadas. Para desparafinarlas se colocaron en una estufa (Fisher Scientific) a 60 °C durante 30 minutos, se deshidrataron mediante transferencia en xilol por 5 minutos y posteriormente un minuto hasta Alcohol 96%, después se trataron con buffer de citratos pH 6, el antígeno se recuperó con calor en baño húmedo (Stable Temp®, Cole Parmer®) a 60°C por 30 minutos, se dejaron enfriar y se lavaron con Tris-Buffered Saline with Tween (TBST) tres veces por cinco minutos. La peroxidasa endógena se bloqueó utilizando peróxido de hidrógeno al 30% (J.T. Baker, Méx.) diluido (1:9 en H₂O desionizada) durante 15 minutos y se lavó nuevamente en tres tiempos de cinco minutos con TBST. Posteriormente se agregó suero bloqueador (Vectastain Universal Quick Kit., Burlingame, CA) durante 15 minutos a temperatura ambiente para el bloqueo del pegado inespecífico y se lavó nuevamente. Una vez que se llevó a cabo los pasos anteriores las secciones de tejido fueron incubadas con el anticuerpo primario para VEGF (ab1316, Abcam, Cambridge, MA, USA) y fracción alfa del HIF-1 (GTX30647, GeneTex, Inc, Irvine, CA) diluidos en buffer (suero bloqueador) durante 24 horas a 4°C. Pasado este tiempo se lavaron nuevamente en tres ocasiones con TBST por cinco minutos cada uno y se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo biotilnado universal (Vectastain Universal Quick Kit, Burlingame,CA) 10 minutos, se lavaron al final en tres tiempos de cinco

minutos, posteriormente se utilizaron el sistema Biotina-Estreptavidina-Peroxidasa (Vectastain Universal Quick Kit., Burlingame, CA) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y nuevamente se lavaron como ya se describió, se utilizaron 3,3'Diaminobencidina (DAB) (BioCare Medical, USA) como revelador durante cinco minutos, se tiñeron con Hematoxilina y para virar el contraste se utilizó una solución saturada de Carbonato de Litio (Fisher Chemical, USA). La cuantificación de la expresión de cada proteína se realizó empleando el software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), desarrollado por el National Institute of Health (NIH) y el plugin IHC Profiler (79). Se tomaron imágenes de microscopía en formato digital de diez campos aleatorios por laminilla, a través de un microscopio utilizando el mismo objetivo y la misma intensidad de luz.

6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS, versión 21 para Windows. Para la evaluación de los hallazgos clínicos se utilizó la prueba estadística de χ^2 y para los parámetros microscópicos y marcoscópicos se utilizó la prueba de Kruskal- Wallis. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

7. RESULTADOS

7.1. Evaluación clínica

Todos los animales sobrevivieron al ATPM, al igual que al tiempo de estudio establecido.

7.2 Hallazgos clínicos

El 100% de las ratas sometidas a ATPM de todos los grupos de estudio presentaron estridor en la primera semana postquirúrgica ($p = 0.427$ Chi cuadrado), el cual desapareció en el transcurso de la segunda Post ATPM (Cuadro 1). También se observó que durante la cuarta semana post autotrasplante 4 ratas del grupo II y 1 del grupo I mostraron disnea, pero solo se observó una diferencia estadística en la presencia de **disnea** del grupo II, en comparación con los demás grupos de estudio ($p=0.006$) χ^2 . (Cuadro 1)

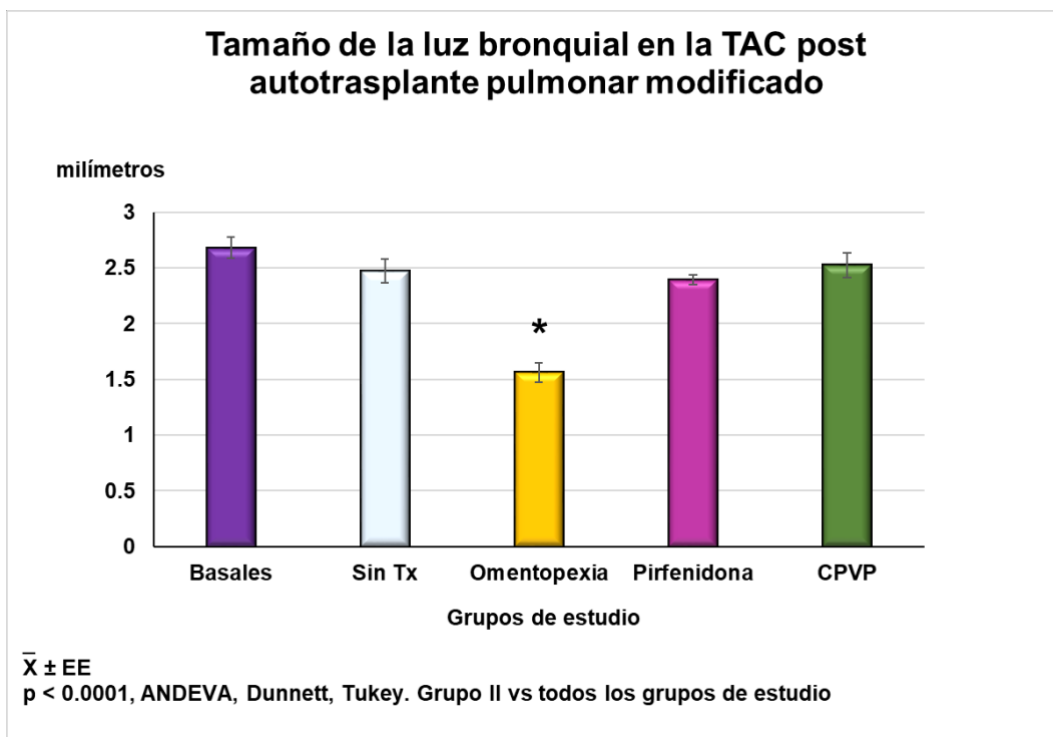
<i>Grupos de estudio</i>	<i>Signos Clínicos</i>	
	Estridor	Disnea
<i>Grupo I</i>	6	1
<i>Grupo II</i>	4	4*
<i>Grupo III</i>	5	0
<i>Grupo IV</i>	4	0

* $p = 0.006$, χ^2

Cuadro 1. Muestra los signos clínicos mostrados por los animales sometidos a ATPM.

7.3 Hallazgos tomográficos.

Tomográficamente, los animales del grupo II (omentopexia) presentaron disminución importante de la luz bronquial en comparación con los valores pretrasplante y de los otros grupos al final del estudio ($p < 0.0001$, ANDEVA, Dunnett, Tukey). (Grafica 1) (Figura 3)



Grafica 1. Muestra el tamaño de la luz traqueal en todos los grupos al inicio y al final del estudio.

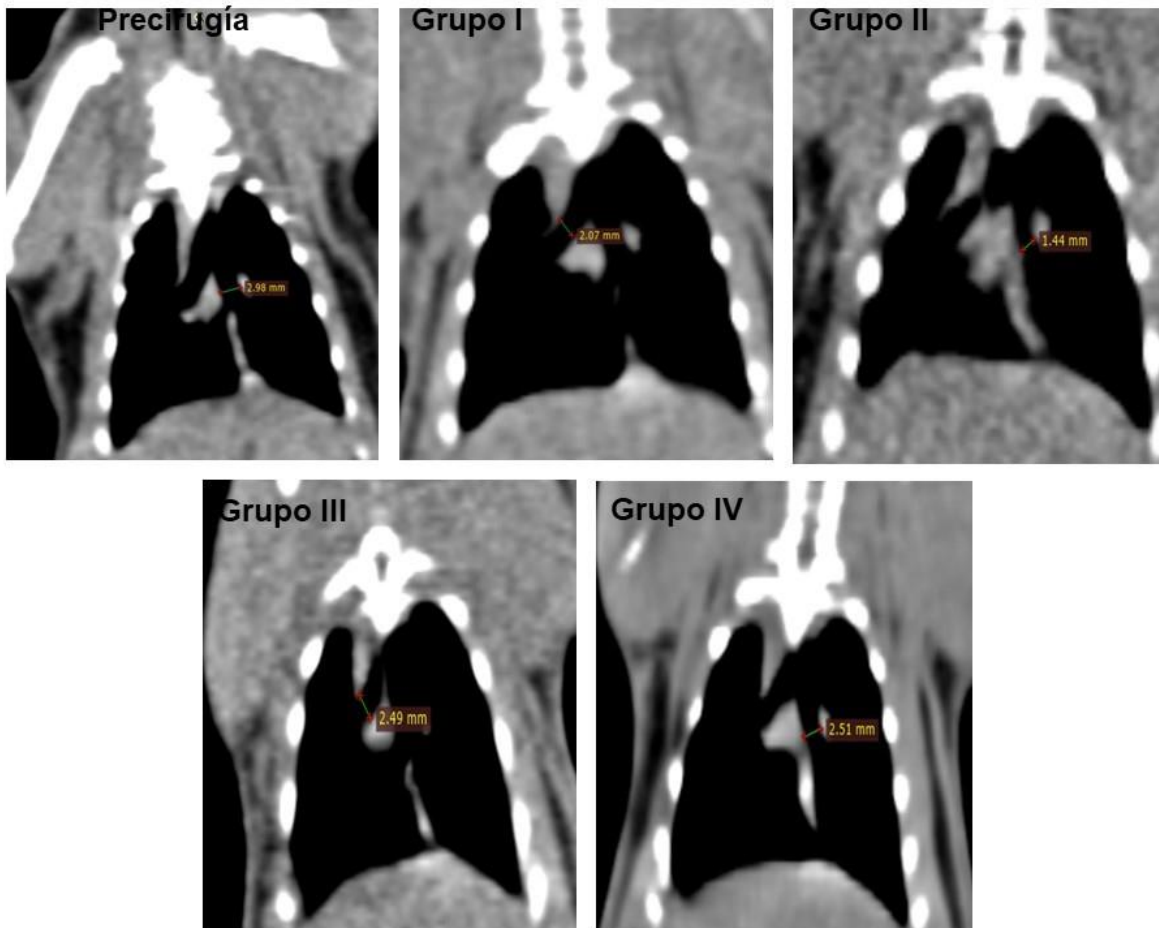


Figura 3. TAC en la que se observa la disminución de la luz bronquial, en un animal de cada grupo de estudio.

7.4 Hallazgos macroscópicos

Al final del estudio, macroscópicamente, se observó que post ATPM todos los animales sometidos a ATPM presentaron adherencias en comparación con lo observado precirugía ($p=0.001$, χ^2). También se observó que cinco de los animales de los grupos I y II (83%) desarrollaron adherencias grado 4 ($p=0.006$, Kruskal-Wallis), en comparación con los otros grupos de estudio (Cuadro 2). Cabe mencionar que un animal del grupo I presentó fístula y dos animales del grupo II

mostraron estenosis bronquial. Sin embargo, no fue estadísticamente significativo.

También, un animal del grupo I desarrollo empiema (Figura 4).

Adherencias postoperatorias

	PRECIRUGÍA	GRUPO I SIN TX	GRUPO II OMENTOPEXIA	GRUPO III PIRFE	CPVP
AUSENTE	5	0	0	0	0
ADHERENCIAS MÍNIMAS FÁCILMENTE DESPEGABLES	0	0	0	3	2
COMPLETA FÁCILMENTE DESPEGABLE	0	1	1	1	3
COMPLETA Y FIRME DE DIFÍCIL DESPEGAMIENTO	0	5*	5*	2	1

* $p < 0.006$, Kruskal Wallis.

Cuadro 2. Muestra el grado de adherencias al final del estudio en todos los animales sometidos a cirugía.

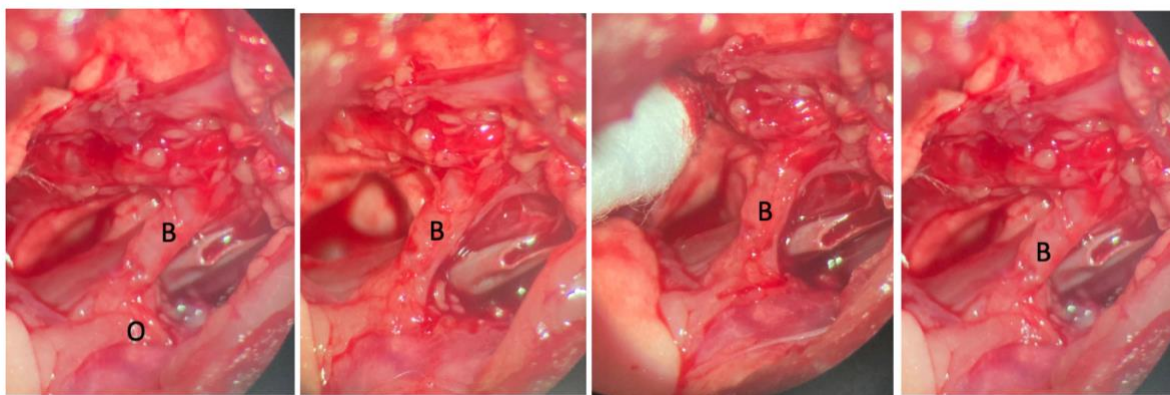
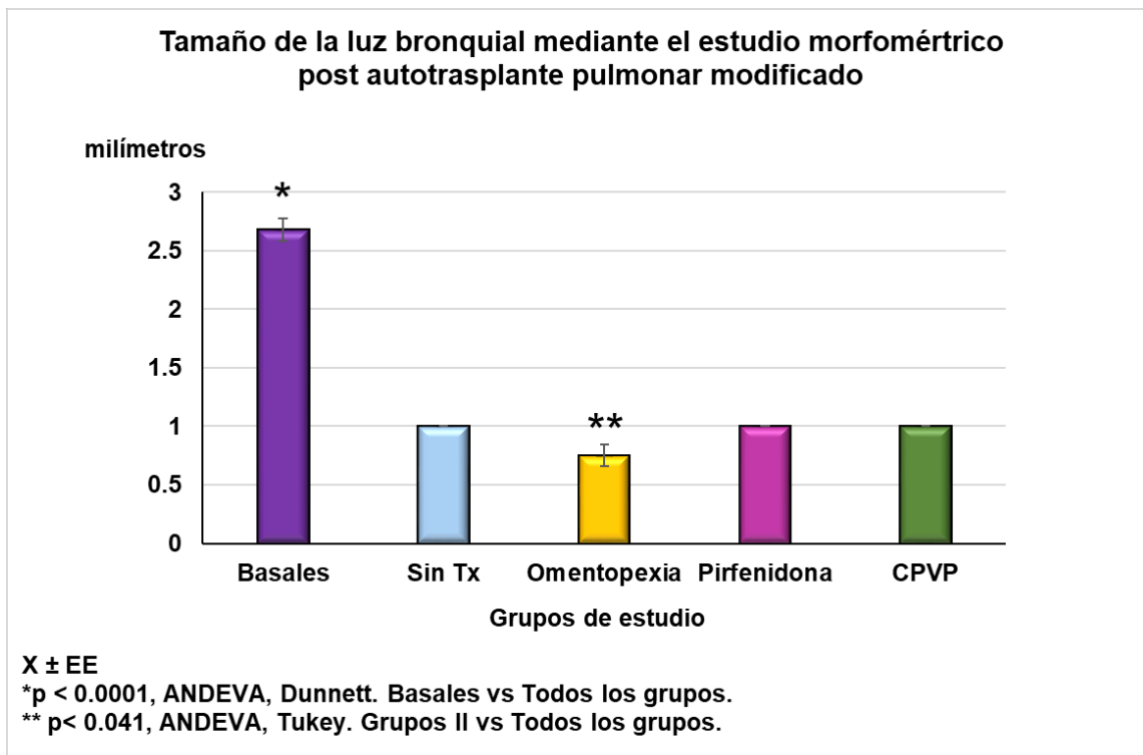


Figura 4. A y B), muestra las adherencias firmes y de difícil despegamiento. A); se observa la disminución de la luz bronquial a nivel de la anastomosis y D) muestra el empiema formado en un animal del grupo I, al final del estudio. (B=Anastomosis bronquial, O= omento).

7.5 Hallazgos morfométricos.

En la morfometría se observó disminución de la luz bronquial en todos los animales sometidos a ATPM vs los valores pre-cirugía ($p < 0.0001$, ANDEVA, Dunnett); sin embargo, la disminución mostrada por el grupo II fue mayor que la de los otros grupos de estudio ($p < 0.041$, ANDEVA, Tukey) (Gráfica 2) (Figura 5).



Grafica 2. Muestra la disminución de la luz bronquial al final del estudio en comparación con la luz pre-ATPM.

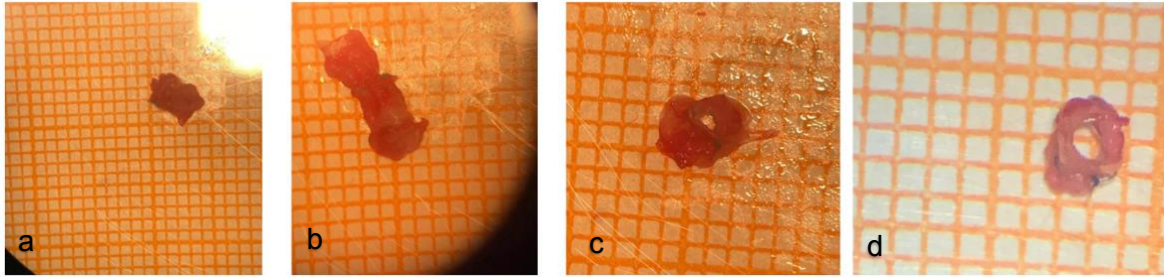


Figura 5. Muestra la disminución de la luz bronquial en un animal de cada grupo al final del estudio, a excepción de la imagen d) en donde se muestra luz bronquial conservada en el grupo que fue tratado con CPVP.

7.6 Hallazgos microscópicos

Microscópicamente, todos los anillos de controles presentaron apariencia normal. En todos los animales sometidos a ATPM se observaron zonas con pérdida parcial del epitelio; además cerca del sitio de la presentaron hiperplasia del cartílago ($p = 0.001$, Kruskal-Wallis). Todos animales del grupo I mostraron inflamación (4 leve y 2 moderada). En el grupo II, 2 leve y 1 moderado; mientras que en el grupo III, 1 inflamación leve y 1 moderado. En el grupo IV, solo 2 animales desarrollaron inflamación leve. Al comparar la presencia de esta entre todos los grupos de estudio, la menor inflamación mostrada por los grupos III y IV fue significativa ($p < 0.05$, Kruskal Wallis). Al evaluar la presencia de fibrosis se observó que los animales del grupo I desarrollaron mayor grado de fibrosis (moderada) en comparación con los otros grupos de estudio, en los que fue predominantemente leve; sin embargo, esto no fue significativo ($p > 0.05$, Kruskal Wallis). Además, en todos los grupos de estudio se observaron fibras de colágena desorganizadas ($p > 0.05$, Kruskal Wallis). La presencia de neovascularización en los grupos I, II y III fue leve, a diferencia del

grupo IV, en la que se observó moderada ($p < 0.05$, Kruskal Wallis) (Cuadro 3).
(Figura 6)

Hallazgos microscópicos en todos los grupos de estudio

		Tx			
		Sin Omentopexia	Pirfenidona	CPVP	
Neovascularización	Ausente	1	0	0	0
	Leve	5	6	6	1
	Moderado	0	0	0	5*
Inflamación	Ausente	0	3	4*	4*
	Leve	4	2	1	2
	Moderado	2	1	1	0
Fibrosis	Ausente	0	0	1	0
	Leve	3	5	4	5
	Moderado	3	0	0	1
	Severo	0	1	1	0

* $p < 0.05$, Kruskal Wallis

Cuadro 3. Muestra los cambios histológicos por grupo al concluir el estudio.

Todos los animales del grupo II desarrollaron calcificaciones ($p < 0.05$, Kruskal Wallis) y un animal del grupo IV, mostro hemorragia ($p > 0.05$, Kruskal Wallis).

Con respecto a la neovascularización, en los grupos I, II y III, la presencia de esta fue leve, a diferencia del grupo IV, en la que se observó moderada ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

7.7 Hallazgos inmunohistoquímicos

7.7.1 Expresión de VEGF

La evaluación inmunohistoquímica mostró que todos los bronquios sanos y los de los animales del grupo IV expresaron VEGF en la cicatriz de la anastomosis bronquial post ATPM a diferencia de los animales de los grupos I y III, en los que 2 y 1 animal (respectivamente) la presentaron; mientras que en el grupo II, el 50% (3 animales) lo expresaron. Con respecto al grado de expresión, el observado en los grupos I, II y III, fue leve; mientras que en el grupo IV fue moderada en 4 animales ($p < 0.001$, Kruskal Wallis) y severa en 2 ratas. (Cuadro 4) (Figura 6).

		Grupo de estudio				Basales
		Sin Tx	Omentopexia	PIRFE	CPVP	
VEGF	Ausente	4	3	5	0	0
	Leve	2	3	1	0	6
	Moderado	0	0	0	4*	0
	Severo	0	0	0	2	0

* $p < 0.05$, Kruskal Wallis

Cuadro 4. Muestra el grado de expresión de VEGF en la cicatrización bronquial post ATPM.

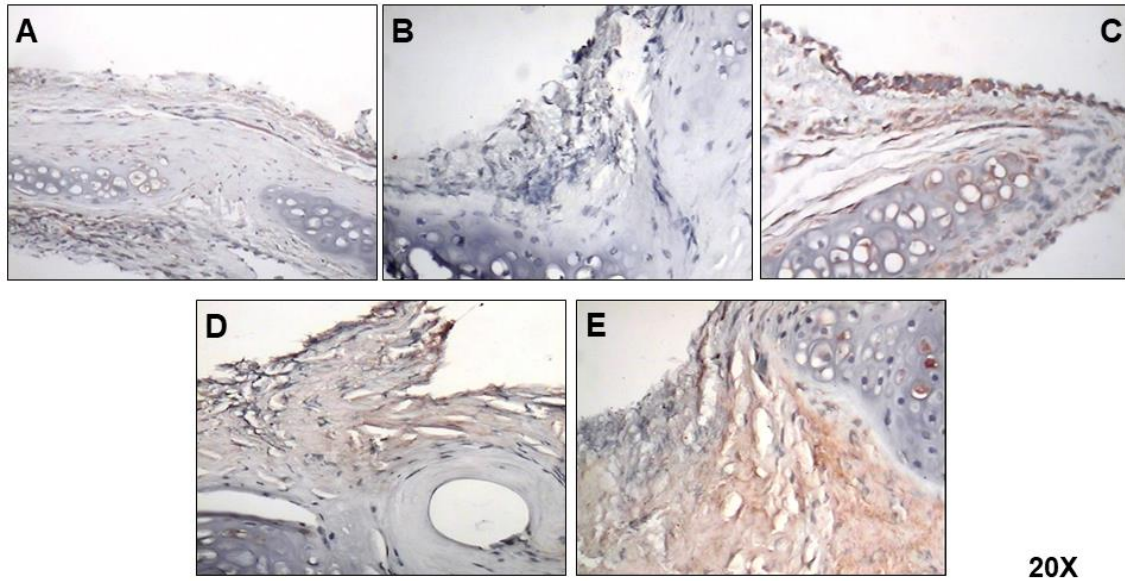


Figura 6. Muestra la expresión del VEGF en E) color marrón intenso en un animal del grupo IV (AB-CPVP) y la leve expresión en marrón débil en los otros grupos de estudio. A) Bronquio sano, B). AB-sinTx, C) AB-O) y D) AB-PIRFE.

7.7.2 Expresión de HIF-1 α .

En todos los bronquios de los animales del grupo IV, hubo expresión de HIF-1 α ; 2 de ellos de forma moderada y 4 severa ($p < 0.05$, Kruskal Wallis). En el grupo III, solo 4 ratas lo expresaron de forma leve. Así mismo, en el grupo II, solo el 50 % de las ratas operadas lo expresaron (1 leve y 2 de forma moderada); mientras que en el grupo I, también 4 ratas sometidas a ATPM lo expresaron, tres de ellos de forma severa y 1 moderada. En los anillos controles sanos solo 2 ratas lo expresaron de forma leve. Al compararla expresión del HIF-1 α la expresión de esta fue significativamente menor en los anillos bronquiales basales que en los otros grupos de estudio. Al comparar el grado de expresión, el mostrado por los animales del grupo IV fue superior al de los grupos ($p < 0.05$ Kruskal Wallis) (Cuadro 5).

		Grupo de estudio				Basales
		Sin Tx	Omentopex ia	PIRFE	CPVP	
HIF-1 alfa	Ausente	2	3	0	0	4
	Leve	0	1	2	0	2
	Moderad o	1	2	4	2	0
	Severo	3	0	0	4*	0

* p < 0.05, Kruskal Wallis

Cuadro 5. Muestra el grado de expresión de HIF-1 α en la cicatrización bronquial post ATPM.

8. DISCUSIÓN

El trasplante pulmonar (TP) puede presentar complicaciones en la cicatrización bronquial debido a la deficiente circulación bronquial e inmunosupresión que alteran la angiogénesis, neovascularización y una adecuada cicatrización (2,3,11,12,13,52). Aunque hasta la fecha se han intentado diferentes estrategias para solucionar este problema, ninguno ha mostrado ser 100% exitoso (2), por lo que al igual que en otros tejidos (tráquea, piel etc) es necesario probar el uso de MDC con el fin regular dicha cicatrización postrasplante (67,68); por esta razón en este estudio, evaluamos el efecto del tratamiento con PIRFE y CPVP sobre la expresión del VEGF y el HIF-1 α en la CBPT y su relación con los cambios clínicos, tomográficos, macroscópicos y microscópicos en ratas con ATxPM.

En este estudio utilizamos el modelo de autotrasplante pulmonar modificado porque este elimina el fenómeno de rechazo, sin embargo; administramos inmunosupresores para que ejercieran su efecto sobre la cicatrización bronquial y así poder evaluar directamente el efecto que tienen los MDC sobre la anastomosis bronquial tratada con inmunosupresores, como lo han descrito otros autores (80).

En este estudio todos los animales mostraron estridor en la primera semana postcirugía, debido a la sección y la sutura utilizada en la reanastomosis del bronquio ocasionaron irritación e inflamación de la mucosa de la anastomosis y la formación de moco, como lo han descrito varios autores que han estudiado el uso de MDC en las estenosis traqueales (67,68,70).

Por otro lado, la reducción de la luz bronquial postrasplante observada en los animales del grupo II en los estudios tomográficos y morfométricos indicaron la

presencia de estenosis bronquial y esta fue la responsable de disnea que mostraron estos animales. Sin embargo estos hallazgos no coinciden con los observado en otros estudios en los que se ha utilizado el colgajo de omento para proteger la anastomosis bronquial postrasplante, los cuales han reportado que favorece la formación temprana de una red de capilares, a partir del cuarto día postcirugía, los cuales se originan en el epiplón que rodea el bronquio, favoreciendo así una buena cicatrización. También mencionan que la estenosis bronquial postrasplante que se produce a nivel de la anastomosis o más distalmente puede ser originada como una manifestación de rechazo celular, lo cual no se pudo haber presentado en nuestro estudio porque se trata de un autotrasplante (2, 81, 82). Además, la disminución de la luz bronquial también pudo ser ocasionada porque el epiplón permitió mantener una mayor migración natural de células inflamatorias hacia el tejido dañado, con la consecuente formación de tejido de granulación; como se ha observado en otros modelos de autotrasplante de la vía aérea (83,84). Cabe mencionar, que la presencia de estenosis bronquial en el grupo II no se vio influenciada por el tratamiento inmunosupresor ya que los esteroides no evitan las complicaciones postoperatorias tempranas de la anastomosis bronquial después del trasplante de pulmón como lo mencionó Kim et al. al evaluar el uso preoperatorio de corticosteroides en las complicaciones en la cicatrización bronquial postrasplante (85). Así mismo, pudo ser ocasionado porque estos animales solo recibieron la inmunosupresión, a diferencia de los grupos III y IV que recibieron la PIRFE y la CPVP, respectivamente, los cuales son MDC que tienen propiedades antiinflamatoria y antifibróticas (67). Se debe de hacer mención que los grupos tratados con los moduladores de la cicatrización no presentaron estenosis

bronquial, ni disnea porque el mecanismo de acción de estos favorece la cicatrización con menor fibrosis e inflamación tanto macroscópica como microscópica (67).

En cuanto a las adherencias, estas se presentaron por la manipulación quirúrgica y fueron más severas en los grupos I y II, porque estos animales no recibieron tratamiento con MDC. La presencia de adherencias en el grupo II puede deberse al aumento de la migración de células inflamatorias, sobre todo de macrófagos hacia el sitio donde se presenta la inflamación (anastomosis bronquial) y esto a su vez produce rápidamente una capa de fibrina para permitir la adhesión a esa zona y en el transcurso de unos días la fibrina empezará a organizarse, favoreciendo la migración de fibroblastos y la producción de colágeno que termina con la formación de densas adherencias (86).

En relación a la inflamación y fibrosis microscópica, esta se presentó con mayor frecuencia e intensidad en las ratas del grupo I y II, ya que no recibieron tratamiento con efecto antiinflamatorio, mientras que la mayoría de las ratas de los grupos III y IV (tratados con pirfenidona o CPVP) no se identificó la presencia de inflamación, porque estos fármacos inhiben la respuesta inflamatoria mediada por las células dendríticas con lo cual inhibe la activación de los linfocitos T y de los macrófagos, al inhibir a este último grupo celular, también se inhiben la producción de citocinas proinflamatorias como la IL-1, TNF alfa, TGF- β y PDGF (87-89). En cuanto a la fibrosis, se ha observado en la cicatrización traqueal, que ambos medicamentos regulan la proliferación de fibroblastos y su transformación a miofibroblastos, por medio de la inhibición de las citocinas y factores de crecimiento. Como TNF α y TGF-

β Dentro del mecanismo de acción antifibrótico de la CPVP inhibe la expresión de PDGF, IL-1 β , TNF α , favoreciendo el recambio de los componentes del tejido conjuntivo con la consecuente eliminación de proteínas fibrosas (70, 89, 90).

Por otro lado, la neovascularización (NV) observada histológicamente fue mayor en el grupo IV, coincide con lo observado en los estudios experimentales de tráquea en los que se menciona que la CPVP estimula la NV sin embargo aún se desconoce su mecanismo. En relación a nuestros hallazgos de NV del grupo III, no concuerdan con lo descrito en otros estudios, ya fue mínima lo cual nos hace pensar que posiblemente su uso en combinación con los inmunosupresores, no permite que la PIRFE tenga sus efectos proangiogénicos como se ha observado en otros tejidos. Cabe mencionar que su expresión también fue leve en la mayoría de las ratas en el grupo II, esto se puede explicar porque según lo reportado en estudios de injertos traqueales devascularizados, el colgajo pediculado de eiplón no puede mantener con éxito la vascularidad en segmentos largos durante tiempos prolongados, ya que el suministro de sangre desde el eiplón puede verse interrumpido debido a que su pedículo recorre una larga distancia a través de un defecto en el diafragma (81,82). La presencia de neovascularización leve en el grupo sin tratamiento, se puede explicar, porque no hubo reestablecimiento de la circulación bronquial de manera inmediata, debido a la ausencia de anastomosis de los vasos bronquiales, sin embargo se ha demostrado en diversos estudios el establecimiento de una red precoz de vasos que rodea a la anastomosis desde los primeros 14 días (72), y que a partir de la 4ª semana una fina red de circulación bronquial es detectable (92).

La evaluación inmunohistoquímica mostró que todos los bronquios hubo expresión de VEGF porque esta es una proteína que esta involucrada en la vasculogénesis (formación *de novo* del sistema circulatorio embrionario) y en la angiogénesis (crecimiento de vasos sanguíneos provenientes de vasos preexistentes). Además porque su expresión esta regulada por diversos mecanismos, entre los que sobresale la hipoxia (como la que se produjo al seccionar el bronquio) y la presencia de citocinas proinflamatorias. También se expresó porque la hipoxia estimuló la producción de HIF-1 α que se observó en este estudio, y esto estimuló la producción de VEGF (32) . Cabe mencionar que hubo mayor neovascularización microscópica en los animales del grupo IV porque la CPVP estimula la producción de este factor como lo observó Castro et.al. (33) al estudiar su expresión en en el síndrome del túnel del carpo y su asociación con la aplicación de Colágeno y Polivinipirrolidona. in vitro. Este hallazgo de nuestro estudio puede responder a lo reportado en otros estudios en los que se utilizó la CPVP para modular la cicatriz traqueal y que mencionan que los animales tratados con este fármaco presentan una mejor neovascularización, pero no saben cuál fue la vía que la estimulo (68,70). Con base en esto se podría pensar que uno de los mecanismos responsables de la neovascularización estimulada por la CPVP es a través de producción del VEGF. Por otro lado, en este estudio se observó expresión de HIF-1 α en la cicatriz bronquial de todos los grupos de estudio porque la sección de este ocasionó falta de aporte sanguíneo e hipoxia en el sitio de la anastomosis y este es un factor que se produce por la hipoxia; sin embargo, se observó menor expresión de este factor en los anillos bronquiales sanos porque en estos no se realizó ningún procedimiento quirúrgico y no se presentó hipoxia, lo cual ocasiono la degradación del mismo, ya

que es muy lábil en presencia de oxígeno (32-35). En este estudio encontramos una mayor expresión del mismo en el grupo IV, posiblemente porque todavía tenían áreas sin perfusión, aun después del reestablecimiento del flujo sanguíneo y todavía mostraban zonas hipóxicas. Por otro lado, también pudo ser ocasionado porque aunque sea leve presentan un grado de inflamación crónica como lo describieron algunos autores que han estudiado la presencia de este factor en el ligamento de pacientes con síndrome del túnel del carpo tratados con CPVP y mencionan que tanto el HIF-1 α y el VEGF se expresan en este ligamento porque se encuentran en una fase crónica de la enfermedad; sin embargo la CPVP modifica la matriz extracelular e incrementa la proliferación de poblaciones celulares, específicamente las células del endotelio vascular (33).

9. CONCLUSIÓN

La administración SC por cuatro semanas de CPVP en ratas con ATxPM mejora la producción de HIF1 y VEGF en la cicatriz de la anastomosis bronquial y mejora la cicatrización macroscópica y microscópica bronquial; además de favorecer la buena evolución clínica y tomográfica.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- García CL, Salermo TA, Panos AL, Pham SM. Estado Actual del Trasplante Pulmonar. *Gac Méd Méx.* 2007; 143: 323-32.
- 2.- Anile M, Diso D, Rendina EA, Venuta F. Airway anastomosis for lung transplantation. *J Thorac Dis.* 2016; 8: S197-S203. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2016.01.67.
- 3.- Potestio C, Jordan D, Kachulis B. Acute postoperative management after lung transplantation. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2017; 31: 273-284. doi: 10.1016/j.bpa.2017.07.004
- 4.- Santillán-Doherty P, Jasso-Victoria R, Olmos-Zúñiga R, Sotres-Vega A, Argote-Greene LM, Escalante-Tattersfield T, et al. Trasplante de pulmón. *Rev Investig Clin.* 2005; 57 (2): 350-357.
- 5.- Valapour M, Lehr CJ, Schladt DP, Smith JM, Goff R, Mupfudze TG, et al. OPTN/SRTR 2021 Annual Data Report: Lung. *Am J Transplant.* 2023; 23(2 Suppl 1): S379-S442. doi: 10.1016/j.ajt.2023.02.009.
- 6.- Chambers DC, Perch M, Zuckermann A, Cherikh WS, Harhay MO, Hayes D Jr, et al; International Society for Heart and Lung Transplantation. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-eighth adult lung transplantation report - 2021; Focus on recipient characteristics. *J Heart Lung Transplant.* 2021; 40(10): 1060-1072. doi: 10.1016/j.healun.2021.07.021.

- 7.- U.S. Department of Health and Human Services. Organ Procurement Transplantation Network. OPTN/SRTR annual reports 2022. <https://optn.transplant.hrsa.gov/data/view-data-reports/national-data/#>
- 8.- Centro Nacional de Trasplantes. Registro Nacional de Trasplantes, Reporte anual 2020 de donación y trasplantes en México. 2020; 55.
- 9.- Wong-Jaén M, Chavarría-Martínez U, Fuentes-Puga V, Anaya-Medina G, Sánchez-Salazar S, et al. Trasplante pulmonar en México en tiempo de pandemia por COVID-19. Rev Mex Cir Torac Gen. 2020; 1 (2): 67-72. doi.org/10.35366/101152
- 10.- Parada MT. Selección de donantes y receptores en trasplante pulmonar: procedimientos generales. Rev Médica Clínica Las Condes. 2010; 21 (2): 194-198. doi:10.1016/S0716-8640(10)70524-1.
- 11.- Tejwani V, Panchabhai TS, Kotloff RM, Mehta AC. Complications of Lung Transplantation: A Roentgenographic Perspective. Chest. 2016; 149 (6):1535-1545. doi: 10.1016/j.chest.2015.12.019.
- 12.- Noriega López A. Evaluación de biomarcadores como factor pronóstico del daño por isquemia reperfusión en el trasplante pulmonar revisión sistemática y meta-análisis. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. 2022.
- 13.- Bos S, Vos R, Van Raemdonck DE, Verleden GM. Survival in adult lung transplantation: where are we in 2020? Curr Opin Organ Transplant. 2020 Jun;25(3):268-273. doi: 10.1097/MOT.0000000000000753.
- 14.- Barbul A, Efron DT, Kavalukas SL. Cicatrización de heridas. En: Brunicardi F, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Matthews JB, et al, eds. *Principios de cirugía, 10e*. McGraw Hill; 2015.

- 15.- Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010 89 (3): 219-229. doi: 10.1177/0022034509359125.
- 16.- Guerra A, Belinha J, Jorge RN. Modelling skin wound healing angiogenesis: A review. *J Theor Biol*. 2018; 459: 1-17. doi: 10.1016/j.jtbi.2018.09.020.
- 17.- Guarín-Corredor C, Quiroga-Santamaría P, Landínez-Parra NS. Wound healing process of skin, endogenous fields related and chronic wounds. *Rev Fac Med*. 2013; 61 (4): 441-448.
- 18.- Senet P. *Physiologie de la cicatrisation cutanée*. EMC. Dermatologie. 2007; 98-040-A-10.
- 19.- Cambronero Ulate P, Cerdas Fernández A, Chang Chen V. Pathophysiology of pathological scarring. *Revista Médica Sinergia*. 2022; 7: e820. doi.org/10.31434/rms.v7i5.820.
- 20.- Gurtner, G., Werner, S., Barrandon, Y. *et al*. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008; 453, 314–321. doi.org/10.1038/nature07039
- 21.- Novak ML, Weinheimer-Haus EM, Koh TJ. Macrophage activation and skeletal muscle healing following traumatic injury. *J Pathol* 2014; 232 (3): 344–355. doi: 10.1002/path.4301. Erratum in: *J Pathol*. 2014; 233(3):319.
- 22.- Dipietro LA, Reintjes MG, Low QE, Levi B, Gamelli RL. Modulation of macrophage recruitment into wounds by monocyte chemoattractant protein-1. *Wound Repair Regen*. 2001; 9 (1): 28-33. doi: 10.1046/j.1524-475x.2001.00028.x.
- 23.- Dorris E. R, Russell J, et al Post-intubation subglottic stenosis: aetiology at the cellular and molecular level, *Eur Respir Rev* 2021; 30 (159): 200218. doi: 10.1183/16000617.0218-2020.

- 24.- Cruz AA. Biología de la cicatrización. Rev Asoc Colomb Dermatol. 2003; 11:45-62.
- 25.- Darby IA, Laverdet B, Bonté F, et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. Clin Cosmet Investig Dermatol 2014; 7: 301.
- 26.- Blakaj A, Bucala R. Fibrocytes in health and disease. Fibrogenesis Tissue Repair. 2012; 5(Suppl 1): S6. doi: 10.1186/1755-1536-5-S1-S6.
- 27.- Eldridge L, Wagner EM. Angiogenesis in the lung. J Physiol. 2019; 597:1023-1032. doi: 10.1113/JP275860.
- 28.- Jiménez-Andrade GY, González-Espinosa C. Inflamación y angiogénesis: el papel facilitador de las células cebadas en el desarrollo del melanoma. Residente. 2011;6(2):111-119.
- 29.- Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. Biomed Res Int. 2015; 549412. doi: 10.1155/2015/549412.
- 30.- Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. J Clin Invest. 1999;103(9):1227-30. doi: 10.1172/JCI6869.
- 31.- Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. Cardiovasc Res. 2001; 49(3):507-21. doi: 10.1016/s0008-6363(00)00281-9.
- 32.- Basain Valdés, J., Valdés Alonso, M., Miyar Pieiga, E., Pérez Martínez, M., Duany Alvarez, D., & Alfonso Romero, M. Factor inducible por hipoxia como mecanismo molecular regulador de la homeostasis del oxígeno y su respuesta ante

la hipoxia a nivel celular en la obesidad. *Panorama. Cuba y Salud*, 2017; 12(3), 66-73.

33.- Castro Alba PJ. Expresión de Factor Inducible de Hipoxia HIF 1 α y VEGF implicados en el síndrome del túnel del carpo y su asociación con la aplicación de Colágeno y Polivinipirrolidona in vitro. Tesis de Maestría. Instituto Politecnico Nacional: México; 2011.

34.- Arvelo F y Cotte C. Hipoxia en la malignidad del cáncer. Revisión. *Invest Clin*. 2009; 50(4): 529-46.

35.- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(14):7987-92. doi: 10.1073/pnas.95.14.7987.

36. Ben-Yosef Y, Miller A, Shapiro S, Lahat N. Hypoxia of endothelial cells leads to MMP-2-dependent survival and death. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005; 289(5): 1321-31. doi: 10.1152/ajpcell.00079.2005.

37.- Keely S, Glover LE, MacManus CF, Campbell EL, Scully MM, Furuta GT, Colgan SP. Selective induction of integrin beta1 by hypoxia-inducible factor: implications for wound healing. *FASEB J*. 2009 May;23(5):1338-46. doi: 10.1096/fj.08-125344.

38.- Hong WX, Hu MS, Esquivel M, Liang GY, Rennert RC, McArdle A, Paik KJ, Duscher D, Gurtner GC, Lorenz HP, Longaker MT. The Role of Hypoxia-Inducible Factor in Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3(5):390-399. doi: 10.1089/wound.2013.0520

39. Xiong A, Liu Y. Targeting Hypoxia Inducible Factors-1 α As a Novel Therapy in Fibrosis. *Front Pharmacol.* 2017; 8:326. doi: 10.3389/fphar.2017.00326.
- 40.- Kaya A, Poyraz B, Celik G , Ciledag A , Gulbay BE, Savas H, El factor de crecimiento endotelial vascular en los derrames pleurales benignos y malignos. *Arch Bronc.* 2005;41(7):376–9. doi:10.1157/13076967
- 41.- Saavedra JS, Zúñiga LF, Freyre SI, Muñoz GW, Salguero C. El rol de VEGF en la angiogénesis fisiológica y tumoral. *Revista Medicina* 2017; 39 (3): 190-209.
- 42.- Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol.* 2001;106(4):148-56. doi: 10.1159/000046610.
- 43.- Jászai J, Schmidt MHH. Trends and Challenges in Tumor Anti-Angiogenic Therapies. *Cells.* 2019 Sep 18;8(9):1102. doi: 10.3390/cells8091102.
- 44.- Carmeliet P, Moons L, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med.* 2001; 7(5):575-83. doi: 10.1038/87904.
- 45.- Dvorak H. F. "Angiogenesis: update 2005." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005: 3 8) 1835-1842. Accessed August 11, 2023. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01361.x>
46. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 2004; 9: 283-9. doi: 10.2741/1184.
- 47.- Salem C, Vidal A, Mariangel P, Concha M. Cicatrices hipertróficas y queloides. *Cuad. Cir.* 2002; 16: 77-86. <https://doi.org/10.4206/cuad.cir.2002.v16n1-13>

- 48.- Rahban SR, Garner WL. Fibroproliferative scars. Clin Plast Surg. 2003; 30(1):77-89. doi: 10.1016/s0094-1298(02)00069-x
- 49.- Nedelec B, Ghahary A, Scott PG, Tredget EE. Control of wound contraction. Basic and clinical features. Hand Clin. 2000;16(2):289-302.
- 50.- Chen WY, Rogers AA. Recent insights into the causes of chronic leg ulceration in venous diseases and implications on other types of chronic wounds. Wound Repair Regen. 2007 Jul-Aug;15(4):434-49. doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00250.x.
- 51.- De Pablo Gafas A. Broncoscopia en el trasplante pulmonar. En Diaz-Agero Alvarez P, Flandes Aldeyturriaga J. Monografías NEUMOMADRID, Broncoscopia diagnóstica y terapéutica; Madrid: Vol X , Ed Ergon C; 2007; pp 175-188.
- 52.- King-Biggs MB, Dunitz JM, Park SJ, Kay Savik S, Hertz MI. Airway anastomotic dehiscence associated with use of sirolimus immediately after lung transplantation. Transplantation. 2003 ;75(9):1437-43. doi: 10.1097/01.TP.0000064083.02120.2C.
- 53.- Borro JM. Advances in immunosuppression after lung transplantation. Med Intensiva. 2013; 37:44-49. doi.org/10.1016/j.medin.2012.05.011.
- 54.- Altamirano C, Martínez R, Chávez E, Altamirano C, Espino I, Nahas L. Current concepts of the approach and treatment of normal and pathological wound healing: a literature review. Rev. argent cir. plást. 2019; 25: 11-15.
- 55.- Shigemura N, Tane S, Noda K. The Bronchial Arterial Circulation in Lung Transplantation: Bedside to Bench to Bedside, and Beyond. Transplantation. 2018 102(8):1240-1249. doi: 10.1097/TP.0000000000002180.
- 56.- Raspollini MR, Amunni G, Villanucci A, Baroni G, Boddi V, Taddei GL. Prognostic significance of microvessel density and vascular endothelial growth

factor expression in advanced ovarian serous carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2004 Sep-Oct;14(5):815-23.

57.- Randi AM, Smith KE, Castaman G. von Willebrand factor regulation of blood vessel formation. *Blood*. 2018 Jul 12;132(2):132-140. doi: 10.1182/blood-2018-01-769018.

58.- Randi AM, Laffan MA. Von Willebrand factor and angiogenesis: basic and applied issues. *J Thromb Haemost*. 2017;15(1):13-20. doi: 10.1111/jth.13551.

59.- Benavides J. Reparación de heridas cutáneas. *Rev asoc col dermatol cir. dermatol*. 2008; 16: 29-35.

60.- Liu XL, Liu LD, Zhang SG, Dai SD, Li WY, Zhang L. Correlation between expression and significance of δ -catenin, CD31, and VEGF of non-small cell lung cancer. *Genet Mol Res*. 2015 Oct 28;14(4):13496-503. doi: 10.4238/2015.October.28.10.

61.- Burgos-Panadero R, Tadeo Cervera I, Blanquer-Maceiras M. Fibronectina: Estructura y Función. Análisis cuantitativo con imagen microscópica. *Rev Soc Esp Heridas*. 2015; 5: 6-11.

62.- Senet P. Fisiología de la cicatrización cutánea. *Dermatol*. 2016; E - 98-040-A-10.

63.- Ferranti-Ramos A, Garza-Garza G, Bátiz-Armenta J, Martínez-Delgado G, De la Garza-Álvarez F, Martínez-Menchaca HR, et al. Matrix metalloproteinases and their participation in the healing process *Med UIS*. 2017; 30: 55-62. doi.org/10.18273/revmed.v30n2-2017006.

64.- Donahue TR, Hiatt JR, Busuttill RW. Collagenase and surgical disease. *Hernia*. 2006; 10: 478-85. DOI: 10.1007/s10029-006-0146-7.

- 65.- Mohan R, Chintala SK, Jung JC, Villar WV, McCabe F, Russo LA, Lee Y, McCarthy BE, Wollenberg KR, Jester JV, Wang M, Welgus HG, Shipley JM, Senior RM, Fini ME. Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration. *J Biol Chem.* 2002; 277(3):2065-72. doi: 10.1074/jbc.M107611200.
- 66.- López-Armada MJ, Vaamonde-García C, Caramés B, Lires-Deán M, Cillero-Pastor B, Blanco García FJ. Evidence of Inflammatory Mechanisms in Osteoarthritis. *Reumatol Clin.* 2007; 3 Suppl 3: S23-S27.
- 67.- Olmos-Zuñiga JR, Silva-Martínez M, Jasso-Victoria R, Baltazares-Lipp M, Hernández-Jiménez C, Buendía-Roldan I, Jasso-Arenas J, Martínez-Salas A, Calyeca-Gómez J, Guzmán-Cedillo AE, Gaxiola-Gaxiola M, Romero-Romero L. Effects of Pirfenidone and Collagen-Polyvinylpyrrolidone on Macroscopic and Microscopic Changes, TGF- β 1 Expression, and Collagen Deposition in an Experimental Model of Tracheal Wound Healing. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:6471071. doi: 10.1155/2017/6471071.
68. Olmos-Zuñiga JR, Baltazares-Lipp M, Hernández-Jiménez C, Jasso-Victoria R, Gaxiola-Gaxiola M, Silva-Martínez M, Iñiguez-García MA, González-González AI, Vázquez-Minero JC, Luna-Flores A, Solis-Alanis N, Baltazares-Lipp ME. Treatment with Hyaluronic Acid and Collagen-Polyvinylpyrrolidone Improves Extracellular Matrix Assembly for Scarring after Tracheal Resection. *Biomed Res Int.* 2020; 2020:3964518. doi: 10.1155/2020/3964518.

- 69.- Giménez-Candela RM, González-Freire L, Veiga-Villaverde AB, Crespo-Diz C. Efectividad y seguridad de pirfenidona en la fibrosis pulmonar idiopática. Rev. OFIL-ILAPHAR. 2022; 32(2): 189-192.
- 70.- Silva, M. Cambios en la expresión de proteínas profibróticas de la matriz extracelular, post-aplicación de moduladores de la cicatrización en ratas con estenosis traqueal; Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM. 2018. Repositorio institucional de la UNAM.
- 71.- Loeza MP, De la Peña MNC. Tratamiento con colágena polivinilpirrolidona y fortalecimiento isotónico excéntrico en desgarró suprarrotuliano. Reporte de un caso. Rev Mex Med Fis Rehab. 2014;26:66-68.
- 72.- Penilla Acasuso IG, Marín González MG, Krötzsch Gómez E, Salgado Curiel RM, Cano Colín S. Efectos de la mezcla de colágena-PVP, sobre el metabolismo y proliferación celular de fibroblastos gingivales humanos cultivados. Rev Odont Mex. 2008; 12 (4): 184-191. doi.org/10.22201/fo.1870199xp.2008.12.4.15626.
- 73.- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Estados Unidos Mexicanos. AFÍA. Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062ZOO-1999. Mexico City. Diario Oficial de la Federación. 1999.
- 74.- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health U.S.A. Mexican edition Sponsored by the National Academy of Medicine, CDMX, Mexico. 2002.

75.- Baile E, Jasso Victoria R, Sotres Vega A, Selman Lama M, Villalba Caloca J, Arreola JL, Olmos R, Pare P, Santillan Doherty P. Tracheobronchial blood flow after a modified canine lung autotransplant: effect of omental wrapping. *Transplantation Proc.* 1992; 24(5): 2024-2029.

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

77.-Luna Flores A. Efecto de la asistencia mecánica ventilatoria y preservación pulmonar prolongada sobre la producción y expresión de IL-8 en el trasplante pulmonar experimental. Tesis Maestría en Ciencias. UNAM. 2014. .Repositorio institucional de la UNAM.

78.- Veiga A, Rendal M, Matheu G, Andión C. Sánchez J, Segura R. Cambios histopatológicos en arterias humanas sometidas a procesos de isquemia fría y criopreservación. *Angiología.* 2004; 56 (2): 97-105. doi.org/10.1016/S0003-3170(04)74854-3.

79.- Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PloS One.* 2014;9 (5) E96801.doi: 10.1371/journal.pone.0096801.e96801.

80.- Santillán Doherty P, Jasso Victoria R, Olmos Zúñiga R, Arreola Ramírez JL, Vanda Cantón B, Sotres Vega A, et al. Efecto de la prednisona, la azatioprina y la ciclosporina A sobre la cicatrización bronquial. *Cir Ciruj.* 1998, 7; 66: 65-71.

- 81.- Lima O, Goldberg M, Peters WJ, Ayabe H, Townsend E, Cooper JD. Bronchial omentopexy in canine lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1982 Mar;83(3):418-21.
- 82.- Morgan E, Lima O, Goldberg M, Ferdman A, Luk SK, Cooper JD. Successful revascularization of totally ischemic bronchial autografts with omental pedicle flaps in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1982;84(2):204-10
- 83.- Hillel AT, Namba D, Ding D, Pandian V, Elisseeff JH, Horton MR. An in situ, in vivo murine model for the study of laryngotracheal stenosis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;140(10):961-6. doi: 10.1001/jamaoto.2014.1663.
- 84.- Silva-Martínez M, Olmos-Zuñiga JR, Calyeca J, Baltazares-Lipp M, Gaxiola-Gaxiola M, Nachón-Acosta A, Pensado-Piedra LE, Juárez-Hernández F, Sotelo-Robledo R, Jasso-Victoria R, Luna-Flores A, Vázquez-Minero JC. Clinical, Histological, and Profibrotic Extracellular Matrix Protein Changes in a Model of Tracheal Stenosis Induced by Cervical Tracheal Autotransplantation. *J Invest Surg.* 2022;35(7):1551-1561. doi: 10.1080/08941939.2022.2081388.
- 85.- Kim HE, Paik HC, Kim SY, Park MS, Lee JG. Preoperative Corticosteroid Use and Early Postoperative Bronchial Anastomotic Complications after Lung Transplantation. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg.* 2018; 51(6):384-389. doi: 10.5090/kjtcs.2018.51.6.384
- 86.- Di Nicola V. Omentum a powerful biological source in regenerative surgery. *Regen Ther.* 2019; 11:182-191. doi: 10.1016/j.reth.2019.07.008.
- 87.- Ruwanpura SM, Thomas BJ, Bardin PG. Pirfenidone: Molecular Mechanisms and Potential Clinical Applications in Lung Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2020;62(4):413-422. doi: 10.1165/rcmb.2019-0328TR.

- 88.- Furuzawa-Carballeda J, Rojas E, Valverde M, Castillo I, Diaz de León L, Kröttsch E. Cellular and humoral responses to collagen-polyvinylpyrrolidone administered during short and long periods in humans. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003;81(11):1029-35. doi: 10.1139/y03-101
- 89.- Olmos-Zúñiga JR, Hernández-Jiménez C, Díaz-Martínez E, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, Gaxiola-Gaxiola MO, Villalba-Caloca J, Baltazares-Lipp M, Santillán-Doherty P, Santibáñez-Salgado JA. Wound healing modulators in a tracheoplasty canine model. *J Invest Surg.* 2007; 20(6):333-8. doi: 10.1080/08941930701772140
- 90.- Loeza MP, De la Peña MNC. Tratamiento con colágena polivinilpirrolidona y fortalecimiento isotónico excéntrico en desgarro suprarrotuliano. Reporte de un caso. *Rev Mex Med Fis Rehab.* 2014;26(2):66-68.
- 91.- Siegelman SS, Hagstrom JW, Koerner SK, Veith FJ. Restoration of bronchial artery circulation after canine lung allotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1977 ;73(5):792-5.
- 92.- Pearson FG, Goldberg M, Stone RM, Colapinto RF. Bronchial arterial circulation restored after reimplantation of canine lung. *Can J Surg.* 1970 Jul;13(3):243-50.