
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

LA ADMINISTRACIÓN DE INDOMETACINA DURANTE EL EMBARAZO
AFECTA LA EXPRESIÓN DE GENES EN CEREBRO DE RATONES RECIEN
NACIDOS

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACEUTICA-BIOLOGA
PRESENTA
MÓNICA DARINKA RAMÍREZ QUIROZ

MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE PROF. RAFAEL RION ARRIOLA
VOCAL PROF. FERNANDO GARCÍA TAMAYO
SECRETARIO PROF. FRANCISCO HERNANDEZ LUIS
1º SUPLENTE PROF. ENRIQUE ORTEGA SOTO
2º SUPLENTE PROF. MARIA EVA GONZALEZ TRUJANO

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:
FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DE TEMA
DR. FERNANDO GARCÍA TAMAYO

SUPERVISOR TÉCNICO
M.EN C. MA. GUADALUPE REYES GARCÍA

SUSTENTANTE
MÓNICA DARINKA RAMÍREZ QUIROZ

ESTE TRABAJO SOLO SE PUDO REALIZAR GRACIAS A LA AYUDA PROPORCIONADA POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE APOYO AL PERSONAL ACADÉMICO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (DGAPA-UNAM) QUIENES APROBARON EL PROYECTO IN-221303, ME OTORGARON UNA BECA Y DIERON EL APOYO ECONÓMICO NECESARIO PARA REALIZARLO. LA COLABORACIÓN DE LA M. EN C. ISABEL GRACIA MORA, RESPONSABLE DEL BIOTERIO DEL EDIFICIO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA Y DE LA MVZ LUCÍA MACÍAS FUERON DE UN VALOR CONSIDERABLE. EL DR. ALFONSO ESCOBAR IZQUIERDO, JEFE DEL LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS NOS ORIENTO EN LOS ESTUDIOS HISTOLÓGICOS QUE FUERON NECESARIOS PARA LOS NÚCLEOS DE LAS AMÍGDALAS EN LOS CEREBROS DE RATONES RECIÉN NACIDOS Y SU TÉCNICA BEATRIZ GÓMEZ, QUIEN AYUDO A LLEVAR A CABO LOS CORTES DEL CEREBRO Y LAS TINCIONES PARA LOCALIZAR EL PLANO DONDE ESTABAN LOS NÚCLEOS. IGUALMENTE FUE GENEROSA E IMPORTANTE LA AYUDA DE LA DRA. ELIA B. NARANJO Y DE LA M. EN C. MARÍA GUADALUPE REYES, DE LOS DEPARTAMENTOS DE FARMACOLOGÍA Y BIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, RESPECTIVAMENTE, SIN CUYA COLABORACIÓN NO HUBIERA SIDO POSIBLE ORDENAR Y LLEVAR A CABO LAS ESTIMULACIONES CON LPS DE TODOS LOS RATONES RECIÉN NACIDOS Y LA OBTENCIÓN DE SUS CEREBROS A TIEMPOS COMPARABLES. GRACIAS A LA AYUDA DE LA M. EN C. MARÍA GUADALUPE REYES FUE POSIBLE APRENDER Y DESARROLLAR LOS PROCEDIMIENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR QUE SE APLICARON PARA OBTENER LAS MUESTRAS DE RNA DE LAS NEURONAS DE LAS AMÍGDALAS. LA TÉCNICA DE MICROARREGLO FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE LA UNIDAD DE MICROARREGLOS DEL INSTITUTO DE FISILOGÍA CELULAR, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. JORGE RAMÍREZ, Y EL BIÓLOGO JOSÉ LUIS SANTILLÁN QUIEN ME EXPLICÓ LA TEORÍA Y LA PRÁCTICA DE LA TÉCNICA DE MICROARREGLO Y ADEMÁS ME PROPORCIONÓ LAS DIRECCIONES CLAVES PARA OBTENER LOS MAPAS DE LAS DIFERENTES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN PARA INTERPRETAR LOS RESULTADOS.

EN ESTE MOMENTO DESEO EXPRESAR MI AGRADECIMIENTO A TODAS ESTAS PERSONAS QUE ME AYUDARON Y A LAS ENTIDADES DE LA UNAM QUE ME ABRIERON SUS PUERTAS PARA TENER ACCESO A SUS LABORATORIOS Y PODER DESARROLLAR LA INVESTIGACIÓN QUE ME PROPUSO MI DIRECTOR DE TESIS, EL DR. FERNANDO GARCÍA TAMAYO, A QUIEN TAMBIÉN DESEO EXPRESAR MI AGRADECIMIENTO DE UNA MANERA ESPECIAL.

**A MI MAMÁ MI MÁS SINCERO AGRADECIMIENTO,
POR EL APOYO Y CONFIANZA QUE EN MI DEPOSITASTE,
FINALMENTE TUS ESFUERZOS Y SACRIFICIOS SE VEN
REFLEJADOS EN MI ÉXITO PROFESIONAL,
SIN TU APOYO NUNCA LO HUBIERA LOGRADO**

**A MI HERMANA, POR SIEMPRE ESTAR A MI LADO,
DARME ÁNIMOS EN TODO MOMENTO Y SOBRE TODO
MUCHO AMOR**

**A MI ABUELITO, MI MÁS GRANDE EJEMPLO DE ESFUERZO
Y PERSEVERANCIA**

**A MI ABUELITA Y MIS TÍAS POR SIEMPRE ESTAR CONMIGO
Y COMPRENDER MIS ATAQUES DE LOCURA Y ESTRÉS**

**A FERNANDO, TU APOYO Y AMOR A LO LARGO DE TODO
ESTE TIEMPO NO ME PERMITIERON RENDIRME, ME DISTE
FUERZA PARA SALIR ADELANTE Y PENSAR QUE LO QUE
ESTÁ POR VENIR SIEMPRE ES MUCHO MEJOR**

**A TODOS MIS AMIGOS: PAMELA, MARIANA, MIRYAM, PAULINA,
OCTAVIO, VÍCTOR Y FRANCISCO. ESTOS FUERON LOS MEJORES
AÑOS DE MI VIDA, PASAMOS MOMENTOS INCREÍBLES, NUNCA
LOS VOY A OLVIDAR**

**A MI ASESOR, FERNANDO GARCÍA TAMAYO POR SU
PACIENCIA, ENSEÑANZAS Y COMPRENSIÓN, NO HUBIERA
PODIDO TENER A ALGUIEN MEJOR A MI LADO**



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
1. ANTI-INFLAMATORIOS.....	3
1.1 INFLAMACIÓN.....	3
1.2 INHIBICIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE PROSTAGLANDINAS POR ACCIÓN DE AINES.....	5
1.3 EFECTOS ADVERSOS DE LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES)	6
2.TOCOLÍTICOS.....	6
2.1 INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE PROSTAGLANDINAS	7
3.INDOMETACINA	8
3.1 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS.....	8
3.2 EFECTOS TÓXICOS.....	10
4.LAS CITOCINAS.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.1 PROPIEDADES GENERALES DE LAS CITOCINAS	11
4.2 RECEPTORES DE CITOCINAS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.3 LAS CITOCINAS EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA	16
4.4 LA INTERLEUCINA 1 (IL-1, CITOCINA PRO-INFLAMATORIA)	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.7
4.5 INTERLEUCINA 6 (IL-6, CITOCINA ANTI-INFLAMATORIA).....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.6 LA INDOMETACINA Y LAS CITOCINAS	22
5.LA AMIGDALA	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
6.MICROARREGLOS.....	29



OBJETIVO GENERAL	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
OBJETIVO PARTICULAR	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
HIPÓTESIS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
DISEÑO EXPERIMENTAL	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
METODOLOGÍA	37
PERFUSIÓN DE RATONES RECIÉN NACIDOS	37
EXTRACCIÓN DE CEREBROS	38
LOCALIZACIÓN DE LAS AMÍGDALAS Y EL HIPOTÁLAMO	38
ANIMALES	39
EXTRACCIÓN DE CEREBROS II	39
PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROARREGLO	40
RESULTADOS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
GENES QUE AUMENTARON SU EXPRESIÓN 2SD	44
GENES QUE DISMINUYERON SU EXPRESIÓN 2SD ...	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
DISCUSION	57
CONCLUSIONES	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BIBLIOGRAFÍA	66
DIRECCIONES EN INTERNET	73
APENDICE I	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
APENDICE II	76



Índice de Abreviaturas

- AINES. Antiinflamatorios no esteroideos
- BMP. Proteína morfogenética ósea
- c5a. Fragmento a del quinto componente de sistema del complemento
- cAMP. Adenosín monofosfato cíclico
- cDNA. Cadena de Ácido Desoxirribonucleico
- CI. Citocina inflamatoria
- COX-1. Ciclooxygenasa constitutiva
- COX-2. Ciclooxygenasa inducible
- DNA. Ácido desoxirribonucleico
- GTPasa. Guanosina trifosfatasa
- H₂O. Agua
- ICAM. Moléculas de adhesión intercelular
- IFN- α . Interferon alfa
- IFN- γ . Interferon gamma
- IFN- β . Interferon beta
- IL-1. Interleucina uno
- IL-1 β . Interleucina uno beta
- IL-4. Interleucina cuatro
- IL-6. Interleucina seis
- IL-Ra. Antagonista del receptor de Interleucina uno
- LPS. Lipopolisacáridos
- MAPK. Proteíncinasa activada por mitógeno
- mRNA. Ácido ribonucleico mensajero
- NaCl. Cloruro de sodio
- NK. Células asesinas naturales



- NO. Óxido nítrico
- PBS. Buffer de fosfatos
- PG. Prostaglandinas
- PGE. Prostaglandina E
- PGE2. Prostaglandina E de dos insaturaciones
- PGF_{2α}. Prostaglandina F alfa de dos insaturaciones
- PGG2. Prostaglandina G de dos insaturaciones
- PGH2. Prostaglandina H de dos insaturaciones
- PGI2. Prostaciclina de dos insaturaciones
- RMNf. Resonancia magnética nuclear funcional
- RNA. Ácido ribonucleico
- SSI. Solución salina isotónica
- STAT. Proteína transductora de señal y activadoras de la transcripción.
- TGF-α. Factor de crecimiento alfa
- TGF-β. Factor de crecimiento beta
- TLR. Receptor tipo Toll
- TNFα. Factor de necrosis tumoral alfa
- TNF-β. Factor de necrosis tumoral beta
- UV. Ultravioleta
- VCAM-1. Molécula de adhesión vascular





INTRODUCCIÓN

La Indometacina es un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (AINES) que interfiere con la síntesis de prostaglandinas (PG), la activación del factor de transcripción (NF κ B) y la producción de citocinas pro-inflamatorias. Por esa razón, además de uso específico para el tratamiento de las reacciones inflamatorias, se le utiliza como un antiinflamatorio y como terapia para retrasar las amenazas de parto prematuro y acelerar el cierre del conducto arterioso. La Indometacina tiene una toxicidad comprobada sobre el tubo digestivo y el sistema nervioso, pero se considera inocua su administración a neonatos. Sin embargo, como se conoce que para el desarrollo del cerebro fetal se necesita la producción de PG y citocinas inflamatorias (CI), así como la expresión de sus receptores, algunos creen posible que los AINES son neurotóxicos para el embrión. Nosotros también creemos que la administración de AINES durante el embarazo y en el periodo perinatal puede representar un riesgo, particularmente para el normal desarrollo del cerebro. El objetivo de este trabajo es conocer si la exposición prenatal a Indometacina cambia la expresión cerebral de genes relacionados con la síntesis de CI. La Indometacina se administró a un grupo de ratones hembra gestantes durante la segunda semana del embarazo en una dosis diaria de 50 μ g por vía oral, mientras que las ratonas control solo recibieron solución salina isotónica (SSI). Después del parto, los ratones de 3 días de edad fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis de lipopolisacárido (1 μ g) y 3 horas después fueron sacrificados, se obtuvieron los cerebros y se disecaron las amígdalas. Se realizó una mezcla aleatoria de las amígdalas disecadas de 25 ratones gestados en 10 madres diferentes que



recibieron el fármaco (experimentales) y otra mezcla con igual número de controles. Los tejidos se disolvieron en trizol y se extrajo el mRNA para después llevar a cabo su hibridación en un microarreglo con una base de 22,000 genes. En las muestras experimentales se identificaron los genes que están sobre-expresados (en relación al control) y se caracterizaron en bancos de genes. Los resultados sugieren que, administrada antes del nacimiento, la Indometacina puede alterar la expresión de algunos genes en las amígdalas del ratón recién nacido y que, posiblemente, esto puede afectar el desarrollo embrionario del cerebro del ratón e influir sobre la conducta del animal adulto, ya que esos genes están relacionados con la expresión de los receptores de citocinas inflamatorias. No están estudiados los mecanismos por los que estos cambios pueden afectar la conducta del animal adulto.



ANTECEDENTES

1. LOS ANTI-INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

Los anti-inflamatorios, analgésicos y antipiréticos son un grupo heterogéneo de compuestos que casi nunca tienen relación química alguna, pero que comparten algunas actividades terapéuticas y efectos adversos. El nombre más usado es el de *antiinflamatorios no esteroideos* (AINES), para diferenciarlos de las hormonas glucocorticoides que son anti-inflamatorios esteroideos. .

Se piensa que el aspecto más importante del mecanismo de acción de los AINES es la inhibición de la ciclooxigenasa (COX), enzima encargada de la biosíntesis de prostaglandinas y otros autocoides concomitantes, que participan activamente en los procesos inflamatorios.

1.1 Inflamación.

El proceso inflamatorio es una respuesta vascular que puede ser iniciada por diversos estímulos (agentes infecciosos, factores físico-químicos, interacciones antígeno-anticuerpo, etc.). Cada tipo de estímulo desencadena un tipo característico de reacción o de respuesta que constituye una variante relativamente menor del mismo fenómeno. La evolución de las reacciones inflamatorias sucede en tres fases diferentes y cada una al parecer es mediada por mecanismos distintos:

- 1) una fase transitoria aguda que se caracteriza por vasodilatación local, mayor permeabilidad capilar y salida de líquido y células fuera del vaso sanguíneo.



- 2) una fase sub-aguda tardía que se caracteriza por infiltración de leucocitos y fagocitos
- 3) una fase resolutive en la que se reparan los tejidos dañados inicialmente. Si esta tercera fase no termina, entonces el proceso inflamatorio se vuelve crónico y se advierten signos de degeneración y fibrosis tisulares con formación de granulomas.

La respuesta inflamatoria se acompaña sistemáticamente de enrojecimiento de la piel adyacente, aumento de la temperatura, edema y dolor. Este último síntoma, el dolor, es el principal motivo por el cual el paciente demanda un tratamiento. Algunos autores añaden la incapacidad funcional y la fiebre como otras características de la inflamación, pero la presencia de estos últimos síntomas es menos constante. El dolor y el aumento del volumen o edema son las manifestaciones más evidentes y molestas de la respuesta inflamatoria. Casi siempre los antiinflamatorios no esteroideos son clasificados como analgésicos leves. El dolor que acompaña a la inflamación y lesión tisular probablemente es una consecuencia de la estimulación local de las fibras del dolor y mayor excitabilidad de las neuronas centrales de la médula espinal.

La regulación de la temperatura corporal necesita un equilibrio finísimo entre la producción y pérdida de calor; el hipotálamo regula el punto "prefijado" en el que se conserva la temperatura del cuerpo. En la fiebre, el nivel de este punto "termorregulador" aumenta y los antiinflamatorios no esteroideos intervienen en su normalización.

La fiebre puede ser consecuencia de una infección o secuela de una lesión tisular, inflamación, rechazo de injerto u otros cuadros



patológicos. Un signo común de dichos cuadros es la mayor formación de citocinas, IL-1 β , IL-6, interferon alfa y beta y TNF α . Las citocinas incrementan las síntesis de PGE2 en órganos periventriculares cerebrales, en el área hipotalámica preóptica o muy cerca de ella, y PGE2, al aumentar la cantidad de cAMP, estimula al hipotálamo para elevar la temperatura corporal. Los AINES suprimen esta respuesta al inhibir la síntesis de PGE2.

1.2 Inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas por acción de los AINES

Los principales efectos terapéuticos de los AINES son consecuencia de su propiedad de inhibir la producción de prostaglandinas.

La primera enzima en la vía sintética de prostaglandina es la ciclooxigenasa. Esta enzima transforma el ácido araquidónico en productos intermediarios inestables, PGG2 y PGH2. Existen dos clases de ciclooxigenasa, llamadas ciclooxigenasa 1 (COX-1) y ciclooxigenasa 2 (COX-2). La COX-1 es una isoforma constitutiva que aparece en casi todas las células y tejidos normales, en tanto que COX-2 es inducida en casos de inflamación, por acción de las citocinas y mediadores de la inflamación.

El ácido araquidónico también puede ser transformado, por medio de la vía de la 5-lipooxigenasa, en diversos leucotrienos. Los antiinflamatorios no esteroideos inhiben a la enzima ciclooxigenasa y la producción de prostaglandinas, pero no suprimen las vías de la lipooxigenasa ni la formación de leucotrienos.



1.3 Efectos adversos de los antiinflamatorios no esteroideos (AINES)

La administración de AINES provoca la aparición de varios efectos adversos indeseables. El más frecuente es la irritación de la mucosa y la formación de úlceras gástricas o intestinales, que a veces se acompañan de anemia por la pérdida hemática resultante.

Los individuos que utilizan estos fármacos no selectivos durante largo tiempo tienen un riesgo tres veces mayor de sufrir lesiones gastrointestinales graves, en comparación con quienes no los usan.

El daño en el estómago que generan dichos fármacos puede surgir de dos mecanismos diferentes. La irritación local de las sustancias ingeridas permite la difusión retrógrada del ácido al interior de la mucosa gástrica y la inducción de daño tisular, pero la administración parenteral puede ocasionar también daño y hemorragia a causa de una disminución en la biosíntesis de las prostaglandinas en estómago y, en particular, PGI₂ y PGE₂ que actúan como agentes citoprotectores de la mucosa estomacal.

2. TOCOLÍTICOS

Los fármacos que se utilizan para disminuir la motilidad uterina y que por consiguiente retrasan el momento del nacimiento, se agrupan bajo las denominaciones de espasmolíticos uterinos o tocolíticos (de *tokos* = nacimiento y *lysis* = disolución). Su principal indicación obstétrica es el tratamiento del parto prematuro, para suprimir la motilidad uterina cuando ésta se inicia prematuramente entre la semana 24 y 37 de gestación, en las que el feto aún es inmaduro. Con el uso de los



espasmolíticos uterinos se intenta prolongar el embarazo más allá de la semana 37, con el fin de asegurar un mayor crecimiento, aumento de peso y de la maduración fetal, con la consiguiente reducción de la mortalidad perinatal (Velasco, 2003).

2.1 Inhibidores de la síntesis de Prostaglandinas

Puesto que las prostaglandinas participan en la motilidad uterina, los fármacos que inhiben su síntesis son candidatos a tocolíticos.

Buena parte de los inhibidores de la síntesis de prostaglandinas dependientes de ciclooxigenasa son tocolíticos porque inhiben de forma reversible y proporcional a la dosis la motilidad espontánea e inducida por oxitocina y prostaglandinas en útero aislado de rata, así como la motilidad inducida por ácido araquidónico y $\text{PGF}_{2\alpha}$ en útero de cobayo *in situ*. Esta inhibición se produce también en el útero humano (Velasco, 2003).

El AINES más utilizado como agente tocolítico, es la Indometacina (25 mg cada 6 horas por vía oral). La Indometacina ha resultado más eficaz que el placebo en algunos estudios comparativos, pero su eficacia es inferior a la de los estimulantes β . Además, la Indometacina atraviesa rápidamente la barrera placentaria.

3. INDOMETACINA

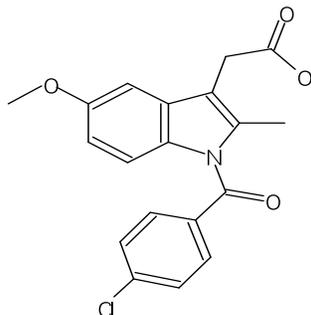


Figura 1. Indometacina o Ácido 1-(4-clorobenzoil)- 2-metil -5-metoxi -H-indol-3-acético;
 $C_{19}H_{16}NO_4Cl$

Descripción. Polvo amarillo, cristalino; inodoro; sabor ligeramente amargo, sensible a la luz, estable en el aire y estable al calor, en las condiciones habituales de temperatura ambiente; una forma polimórfica funde a alrededor de 155 °C, la otra alrededor de 162 °C (Remington, 1999)

Un gramo se disuelve en: 50 mL de etanol, 30 mL de cloroformo o 40 mL de éter; prácticamente insoluble en agua.

3.1 Propiedades farmacológicas

La Indometacina es un fármaco que posee notables propiedades anti-inflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Ejerce su efecto mediante la inhibición reversible, tanto de la COX-1 como de la COX-2 (Moskowitz, 1985). Además suprime la formación de NO, protegiendo de esta forma un daño tisular (Du y col. 1999; Berg y col. 1999)

Los efectos anti-inflamatorios de la Indometacina se manifiestan en sujetos con artritis reumatoide y otros tipos de estas enfermedades que



incluyen la gota. Se absorbe con rapidez y casi totalmente del tracto gastrointestinal después de la administración oral; los niveles plasmáticos máximos se alcanzan en 2 horas, puede demorarse si el fármaco se ingiere después de las comidas; el 97 % de la dosis se une a proteínas plasmáticas. Tiene una vida media de 2,6 a 11,2 horas; del 10% al 20% del fármaco se excreta sin alteraciones por orina.

Posee propiedades analgésicas diferentes de sus efectos anti-inflamatorios y hay datos de que actúa a nivel de sistema nervioso central y del periférico; es también antipirético. Es un potente inhibidor de la enzima ciclooxigenasa y también reduce el movimiento de los polimorfonucleares. Desacopla la fosforilación oxidativa a concentraciones supratrapéuticas y deprime la biosíntesis de los mucopolisacáridos.

Tiene usos en obstetricia y neonatología. Puede utilizarse como tocolítico para suprimir las contracciones uterinas en trabajo de parto pretérmino menor de 32 semanas de gestación; la inhibición de la síntesis de prostaglandinas reduce la frecuencia y fuerza de las contracciones uterinas. No obstante, algunos investigadores disputan esta aplicación con base en la toxicidad fetal y materna reconocida del fármaco (Katzung, 1999). Además, con la administración del anti-inflamatorio es posible controlar la insuficiencia cardíaca en neonatos causada por persistencia del conducto arterioso. Regularmente se aplica por vía intravenosa a dosis de 0.1 a 0.2 mg/kg peso cada 12 h, en un total de tres dosis. El tratamiento con Indometacina también puede disminuir la incidencia y gravedad de la hemorragia intraventricular en neonatos de bajo peso.



A pesar de todas estas indicaciones para su administración durante el embarazo, cuando faltan varias semanas para la fecha del parto, los AINES en general y particularmente la Indometacina representa un factor de riesgo muy grave para el desarrollo cerebral del producto. Esto se debe a que tanto las citocinas pro-inflamatorias como las prostaglandinas son moléculas necesarias para modular el desarrollo de un cerebro normal. Cuando los anti-inflamatorios inhiben o reducen su producción, parece probable que interfieren con esa función moduladora. Como no existen estudios completos sobre el grado en que los AINES administrados prenatalmente pueden afectar las diferentes funciones que puede tener el sistema nervioso durante la edad adulta, todavía no es posible evaluar su toxicidad en ese sentido. De todos modos, esos medicamentos deben administrarse con mucho cuidado durante el embarazo, así como en los recién nacidos y es importante aumentar las investigaciones que evalúen sus efectos sobre el sistema nervioso en desarrollo.

3.2 Efectos tóxicos

Los síntomas y complicaciones gastrointestinales consisten en anorexia, náuseas y dolor abdominal. Se han señalado úlceras solas o múltiples en toda la parte alta del tubo digestivo, a veces con perforaciones y hemorragia. La Indometacina reduce la producción de PGE_2 , la cual si bien es cierto que participa en la respuesta inflamatoria, la fiebre y la generación de estímulos dolorosos, también actúa como un protector de la mucosa del estómago. Por eso, al disminuir la producción de PGE_2 , son frecuentes la gastritis y la úlcera gástrica.



Los inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, como la Indometacina, se continúan utilizando porque pueden prolongar la gestación en los embarazos de término y de pretérmino. Su uso en el manejo de parto prematuro no ha sido suspendido a pesar de la preocupación que existe por su capacidad potencial de causar efectos adversos en el cerebro del feto. Más bien se le ha dado importancia a otro efecto tóxico colateral como es la posibilidad de que provoque un cierre prematuro del conducto arterioso y, como consecuencia, un aumento de la presión arterial en la circulación pulmonar. La ecocardiografía fetal puede detectar signos tempranos de constricción del conducto arterioso, y su uso puede permitir la administración continua de Indometacina en aquellos casos en los que no haya evidencia de constricción ductal. Sin embargo, el control de este efecto tóxico sobre el conducto arterioso no asegura que los AINES sean inocuos a nivel del sistema nervioso.

4. LAS CITOCINAS

4.1 Propiedades Generales de las Citocinas

Definición. Las citocinas son un conjunto heterogéneo de proteínas generalmente glucosiladas y de bajo peso molecular, secretadas principalmente por las células del sistema inmune, pero también por varias otras, como las células endoteliales, los keratinocitos, los fibroblastos, etc. Algunas de ellas tienen la función de moléculas "mensajeras" mientras que otras son mediadoras de diferentes actividades biológicas. Se pueden producir en respuesta a una estimulación inmunológica o inflamatoria con el fin de mediar y regular la amplitud y duración de dichas respuestas. Aún más, se conoce que una misma citocina puede ser producida por distintas células e incluso



que un mismo tipo de citocina puede realizar funciones diversas. (García, 1997)

Características. Las citocinas son mensajeros químicos que actúan a concentraciones muy bajas y son muy específicas gracias a la alta afinidad por sus receptores de membrana. A diferencia de los neurotransmisores, no se encuentran preformadas, sino que son sintetizadas cuando ocurre la estimulación de las células. La mayor parte de ellas son consideradas sustancias "pleiotrópicas", es decir, que actúan sobre varias células y tienen varias actividades biológicas diferentes. También son "redundantes", lo que significa que algunas de las actividades de una citocina pueden ser similares a las de otras citocinas. Además pueden ser antagónicas, es decir, que las actividades de ciertas citocinas pueden resultar completamente opuestas. (Piñol, 2000)

Las citocinas suelen actuar, fundamentalmente, de forma local, tanto sobre la misma célula que las produce (actividad autocrina), como sobre las células vecinas (actividad paracrina), más que en acciones sobre células y tejidos distantes de su producción. No obstante, algunas citocinas, especialmente las que tienen efectos inflamatorios como la IL-6, IL-1 y el TNF, actúan mediante difusión a través de la sangre en células diana distantes (actividad endocrina). (Piñol, 2000)

Clasificación. En los últimos años se han descubierto varias citocinas gracias al desarrollo de las técnicas moleculares que han permitido la clonación, así como su análisis y cuantificación, y cuya clasificación ha variado con el tiempo. Anteriormente, se denominaba a las citocinas en función del origen de la célula secretora. Hoy en día es más común



clasificarlas en familias según sus efectos. En la tabla se enumeran los principales componentes de las familias de citocinas. (García, 1997; García y Kaski, 2000)

Tabla 1. Familias o Grupos Principales de Citocinas

NOMBRE DEL GRUPO	PRINCIPALES COMPONENTES
Interleucinas (IL)	IL-1 a la IL-28
Interferones (IFN)	IFN- α , IFN- β e IFN- γ
Factores de Necrosis Tumoral (TNF)	TNF- α y TNF- β
Quimiocinas	Linfotactina, MIP-1, IL-8, RANTES
Factores Estimulantes de la Formación de Colonias (CSF)	G-CSF (para Granulocitos), M-GSF (para Macrófagos), GM-CSF (para Granulocitos y Monocitos ó Macrófagos)
Factores de Crecimiento (TGF)	TGF- α , TGF- β (Fibroblástico, Derivado de monocitos)

Desde un punto de vista general las citocinas pueden actuar como:

- Mediadores de la respuesta inmune innata (inflamación, quimiotaxis, activación de macrófagos, células NK) y adquirida (humoral y celular)
- Reguladores de la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos.
- Estimuladoras del crecimiento de los precursores hematopoyéticos.



Según sus funciones biológicas en el organismo, podemos dividir las citocinas en 3 grupos: inmunorreguladoras, pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

Tabla 2. Principales citocinas

INMUNORREGULADORAS	PRO-INFLAMATORIAS	ANTI-INFLAMATORIAS
IL-2	IL-1	IL-1Ra
IL-4	IL-2	IL-4
IL-10	IL-12	IL-6
TFN- α	IL-18	IL-10
TFN- \square	TNF- α	IL-11
	IFN- γ	TGF- β

Estas clasificaciones se modifican con relativa frecuencia porque todavía no se completa el estudio de las citocinas y cada año se descubren y se caracterizan nuevas moléculas y receptores para las mismas, así como también nuevas funciones que inicialmente no habían sido mencionadas.

4.2 Receptores de Citocinas

Definición y Características. Los receptores de citocinas son glucoproteínas de membrana que se caracterizan por ser específicos y de muy alta afinidad, los cuales están conformados por varias subunidades y cuya misión es la de transmitir la señal al interior de la célula y activar la transcripción.

Existen numerosos receptores para citocinas y algunas de las cuales pueden estimular a varios de ellos, activando distintas vías de señalización y provocando respuestas diferentes. En el caso de muchas

citocinas, la unión de la molécula con su receptor específico (acoplado a cinasas) induce su agrupación (Figura 2 -1), lo cual proporciona una señal que activa a las cinasas de la familia Janus (Jak), induciendo la fosforilación autocatalítica de residuos de tirosina. Las Jak activadas catalizan posteriormente la fosforilación de los residuos de tirosina en las regiones intracelulares del receptor de citocinas (Figura 2 -2). A estos residuos de fosfotirosina se unen las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT) a través de sus dominios SH2 (Figura 2 -3). Posteriormente las Jak catalizan la fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas STAT unidas, las cuales se disocian del receptor y se dimerizan para migrar al núcleo y activar la transcripción de genes que contengan secuencias específicas de unión a STAT (Figura 2 -4).

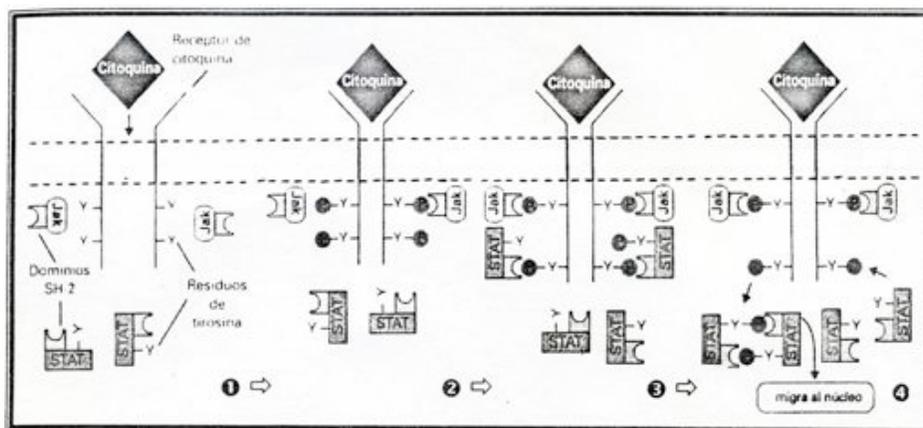


Figura 2. Mecanismo de activación de los receptores de citocinas (modificado de Roitt, 1997)

Como consecuencia de estas reacciones en cadena, se induce la transcripción de varios genes, cuyos productos son lo que median las actividades biológicas de las citocinas. Además de los receptores de membrana, en el suero se han detectado receptores solubles para las distintas citocinas, semejantes a los de membrana. Estos receptores solubles se encuentran en grandes cantidades y probablemente tienen



como misión regular negativamente la producción de las citocinas, actuando como antagonistas de los receptores de membrana. (Miyajima y col., 1992; Tan y col., 1993; Bach y col., 1998)

Por otra parte, cada vez que las citocinas se unen a sus receptores y estimulan a las células, también estimulan la producción de varios factores "supresores de la señalización de las citocinas", conocidos como SOCS, que regulan negativamente las actividades estimuladas.

4.3 Las citocinas en la respuesta inflamatoria

Función. La producción de citocinas, incluyendo las pro- y anti-inflamatorias, es una respuesta fisiológica a la lesión tisular. Su principal función es la coordinación de la eliminación de microorganismos invasores, la eliminación de tejidos lesionados y su sustitución por tejido sano. De esta forma se evita la estimulación excesiva del sistema inmune, que podría inducir reacciones de hipersensibilidad (García y Kaski, 2000).

Las citocinas que inician la respuesta inflamatoria son las IL-1 β y el TNF- α . Estas moléculas suelen actuar en compañía de otras citocinas como las IL-6, -8, -10, -11, -12, -18 y el IFN- γ . Además, cuando las citocinas actúan se producen multitud de mediadores de la inflamación, ya sean proteicos como el fragmento del complemento C5a o lipídicos como el factor activador plaquetario. Estos mediadores tendrán acciones sinérgicas, induciéndose su producción entre ellos y estimulando la producción de otras citocinas que frenarán o aumentarán las vías de autocontrol. Las citocinas también son responsables de la finalización correcta de la respuesta inflamatoria (Feldmann, 1994; García y Kaski, 2000).



4.4 La Interleucina 1 (IL-1, Citocina Pro-Inflamatoria)

La interleucina- 1 se definió inicialmente como un polipéptido derivado de los fagocitos mononucleares que aumentaba la respuesta de los timocitos a los activadores policlonales, es decir, como co-estimulador de la activación de las células T. Sin embargo, actualmente está claro que la principal función de la IL-1, es ser mediador de la respuesta inflamatoria del huésped en la inmunidad innata.

Se han detectado dos genes que codifican para dos tipos de IL-1, la IL-1 α y la IL-1 β ; y un tercer gen de la familia que codifica para el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra). La mayoría de las células nucleadas producen IL-1 (Figura 3). Sin embargo, los principales productores de IL-1 en la inflamación son los macrófagos (Giri y col., 1985). La IL-1 α y la IL-1 β se unen a dos tipos diferentes de receptores, el IL1RI (que se une mejor con la IL-1 α que con la IL-1 β) y el IL1RII (mejor con IL-1 β ; Dinarello y Wolf, 1993). El receptor I de IL-1 se encuentra en linfocitos T, fibroblastos, células endoteliales y hepatocitos. Por su parte, el receptor II se encuentra en linfocitos B, neutrófilos y células de la médula ósea. Sin embargo, es probable que algunas células expresen ambos tipos de receptores.

Las células que sintetizan citocinas como los monocitos y los macrófagos, no producen constitutivamente IL-1 sino que requiere estímulos para transcribir el gen. Diversos agentes endógenos y exógenos pueden proveer tal estímulo, por ejemplo productos microbianos como endotoxinas, exotoxinas, restos de pared celular de hongos, hemoaglutininas virales o la lesión al tejido por agentes físicos o químicos como cristales de urato y la radiación UV.



Los estímulos endógenos que inducen la producción de IL-1 incluyen: c5a (subcomponente del sistema complemento), otras citocinas como: TNF- α , TGF- β , la propia IL-1 y linfocinas (Speziale, 1996). También la bradicina induce la producción de IL-1 cuando actúa sobre receptores B₁ (Dray y Perkins, 1993)

Diversos factores inhiben la producción de IL-1, como los glucocorticoides y las prostaglandinas sin afectar la transcripción, mientras que la IL-10 inhibe fuertemente la transcripción. La IL-4 inhibe la producción de IL-1 e induce la producción de IL-1Ra. Recientemente se ha encontrado que la IL-6, que clásicamente había sido clasificada como una citocina pro-inflamatoria, también inhibe la producción de IL-14, además de inducir la producción de IL-1Ra y glucocorticoides anti-inflamatorios (Speziale, 1996; Ahmed e Ivashkiv, 2000).

Los efectos de la IL-1 son variados. Tiene un papel principal en la cascada inflamatoria, *in vitro* induce la liberación de PGE₂ por diversos tejidos, la producción de proteasas y el catabolismo del cartílago y del hueso, contribuyendo a la patogénesis de la inflamación crónica. Los efectos neuroendócrinos de la IL-1 incluyen acción sobre el hipotálamo lo que resulta en fiebre y producción del factor liberador de corticotrofina, la cual estimula la liberación de la hormona adrenocorticotrofica desde la hipófisis, que a su vez, induce la producción de glucocorticoides (Betancur y col., 1995; Turbull y River, 1999). En células como los macrófagos inducen la síntesis de IL-6, IL-8, de la misma IL-1 y del TNF- α , éste último está implicado en la actividad antiviral y proliferación de fibroblastos y de linfocitos T (Tartaglia y Goeddel, 1992). Además, el TNF- α es un potente inductor de los efectos

sistémicos de la inflamación como fiebre, hipotensión, taquicardia y respuesta de hormonas relacionadas con el estrés (Tracey y col., 1987).

En muchos de los efectos pro-inflamatorios se encuentran siendo responsables juntamente la IL-1 y el TNF- α . Entre ellos tenemos: la activación de la sintasa inducible del óxido nítrico, aumentando de esta forma la producción de NO y por ende el daño tisular (Meller y Gebhart, 1993). Además, las dos citocinas inducen un aumento en la actividad de COX-2, aumentando la síntesis de prostaglandinas. Ambas citocinas tienen un papel central en el inicio de los mecanismos de retroalimentación positiva de las reacciones inflamatorias, ya que promueven la leucocitosis en la médula ósea y el reclutamiento leucocitario. También aumentan la expresión de moléculas de adhesión intercelular como la ICAM-1 y la VCAM-1 pero no ICAM-2 (Libby y col., 1988). Además son unos de los mayores inductores de la síntesis hepática de marcadores de inflamación, como los reactantes de fase aguda (Gauldie y col., 1987).

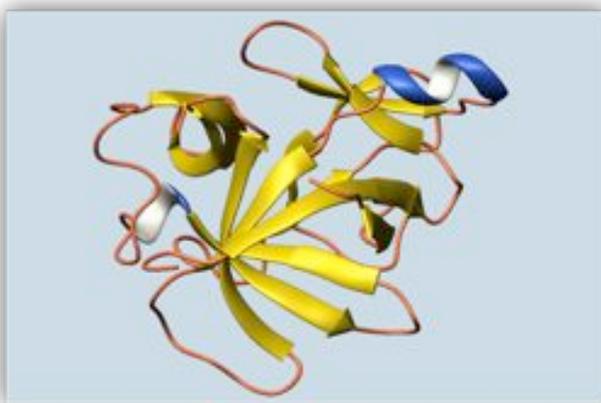


Figura 3. Estructura Macromolecular de la IL-1 (citocina pro -inflamatoria)



4.5 Interleucina 6 (IL-6, Citocina Anti-Inflamatoria)

La Interleucina- 6 es una citocina de aproximadamente 26 kD que es sintetizada por los fagocitos mononucleares, las células endoteliales vasculares, los fibroblastos y otras células en respuesta a la IL- 1, y en mayor medida, al TNF.

La forma funcional de la IL-6 es un homodímero; cada subunidad forma un dominio globular de cuatro hélices α (figura 4).

Anteriormente se clasificaba a la IL-6 como una citocina pro-inflamatoria, porque es inducida por los estímulos inflamatorios, tal y como ocurre con la IL-1 β y el TNF- α (Ivashkiv, 1996), pero nuevas investigaciones han demostrado que esta citocina, tiene un mayor efecto anti-inflamatorio, porque inhibe la expresión de moléculas de adhesión y proteasas ambas *in vivo* e *in vitro* (Oh y col., 1998; Ahmed e Ivashkiv, 2000), induce la expresión de la IL-10, conocida como una citocina anti-inflamatoria, la cual disminuye la función de los macrófagos y es uno de los principales inhibidores de la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (De Waal y col., 1991; Moore y col., 1993; Chomarat y col., 1993). Entre otros efectos anti-inflamatorios importantes de la IL-10 se encuentra la inhibición de la producción de NO, intermediarios de oxígeno, así como la inhibición de la adherencia de macrófagos. (Moore y col., 1993).

La IL-6 es una citocina pleiotrópica, ya que puede actuar sobre diferentes tejidos estimulando funciones distintas, teniendo un papel muy importante en la respuesta inmune e inflamatoria (Reyes y García, 1993). Esta citocina se produce principalmente por los monocitos

estimulados, fibroblastos y células endoteliales (Sironi y col., 1989). Los principales estímulos fisiológicos para la producción de la IL-6 en los monolitos son la IL-1 y las endotoxinas bacterianas (Bauer y col., 1988). La IL-6 actúa enlazándose con un receptor específico de alta afinidad (IL6R), que está ampliamente distribuido en las células linfoides y no linfoides (Coulie y col., 1987). El IL6R está formado por dos glucoproteínas de membrana: gp80, que se liga a IL-6 con baja afinidad (Hirano y col., 1988), y gp130, que se liga al complejo IL-6gp80 y transluce la señal a través de la membrana plasmática (Hibi y col., 1990). Los monocitos, hepatocitos, linfocitos B activados y linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ expresan gp80 de IL6R (Wognum y col., 1993). La IL-6 induce la diferenciación terminal de los linfocitos B (Muraguchi y col., 1988), el crecimiento y la diferenciación citotóxica de linfocitos T (Takai y col., 1988) y estimula la producción normal de células sanguíneas (Leary y col., 1988). La IL-6 es otro regulador importante de la síntesis hepática de proteínas de fase aguda (Gauldie y col., 1989).

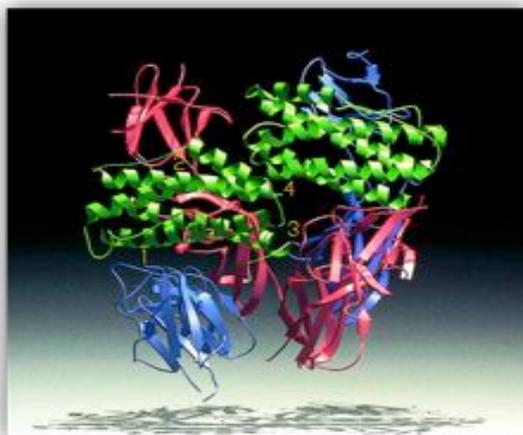


Figura 4. Estructura Macromolecular de la IL-6, IL-6R y el hexámero gp130 (citocina anti-inflamatoria)



4.6 La Indometacina y las Citocinas

Al igual que en otros AINES, se ha investigado el efecto de la Indometacina sobre el sistema inmune y en especial sobre la producción de las citocinas que intervienen en la respuesta inflamatoria, como la IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , etc. En este aspecto se ha reportado que los AINES afectan la concentración de citocinas de distintas maneras, pero la mayoría de este grupo de fármacos inhibe su producción. (Bessler y col., 1999; Fiebich y col., 1999; Housby y col., 1999).

Recientes estudios han determinado el efecto de la Indometacina sobre la producción de citocinas que intervienen, tanto en la respuesta inmune como en la inflamatoria. A diferencia de los fármacos antiinflamatorios esteroides, la Indometacina aumenta la producción de IL-2, aumentando de esta forma el desarrollo de la respuesta inmune (Tanaka, y col., 1998), pero inhibe la producción de la IL-1Ra (antagonista del receptor de IL-1) y de la IL-10 (citocina anti-inflamatoria), lo que sugiere que la administración de Indometacina provoca un estado de mayor inflamación (Tour y col., 2000), sin embargo, la Indometacina también actúa sobre otras citocinas inflamatorias.

Al revisar en la literatura el efecto de la Indometacina sobre la producción de IL-1 e IL-6, se encontraron discrepancias. Algunos investigadores han demostrado que este fármaco inhibe la producción de estas dos citocinas (Du y col., 1999). Mientras que otros estudios han reportado que la Indometacina aumenta su producción (Rainsford y col., 1997). Más aún, se han publicado trabajos que informan que la Indometacina no tiene efecto sobre estas citocinas (Caldwell y col., 1999).



En todos los estudios mencionados, hay al menos un experimento tanto *in vivo* como *in vitro* tanto en animales como en humanos, lo que sugiere que estas variables no intervienen o explican los diferentes resultados encontrados, posiblemente una de las variables que podría explicar las discrepancias encontradas, son las condiciones experimentales, lo que justifica en cierta forma el diseño de nuevos experimentos sobre la respuesta inflamatoria y sus tratamientos.

5. LA AMIGDALA

El complejo amigdaloides es el mayor elemento del sistema límbico. De todas las estructuras subcorticales, la amígdala es la que se ha relacionado de un modo más consistente con la emoción, tanto en animales como en humanos. La identificación de la amígdala como una región relacionada con la emoción se inicia a partir de los trabajos realizados por Klüver y Bucy. Estos estudios mostraron que tras la extirpación bilateral del lóbulo temporal anterior de las amígdalas estos animales presentaban reacciones de ira, miedo, mansedumbre, hiperoralidad, cambios en los hábitos alimenticios e hipersexualidad.

La amígdala también está relacionada con la modulación de la respuesta endocrina, con el mecanismo efector visceral y con complejas reacciones del comportamiento como el miedo y la angustia. Cada amígdala es descrita como un conjunto de grupos neuronales en la parte media e inferior de cada lóbulo temporal del cerebro en el área encefálica contigua al hipocampo. El complejo amigdaloides se divide principalmente en dos grupos nucleares: el grupo corticomedio y el basolateral.

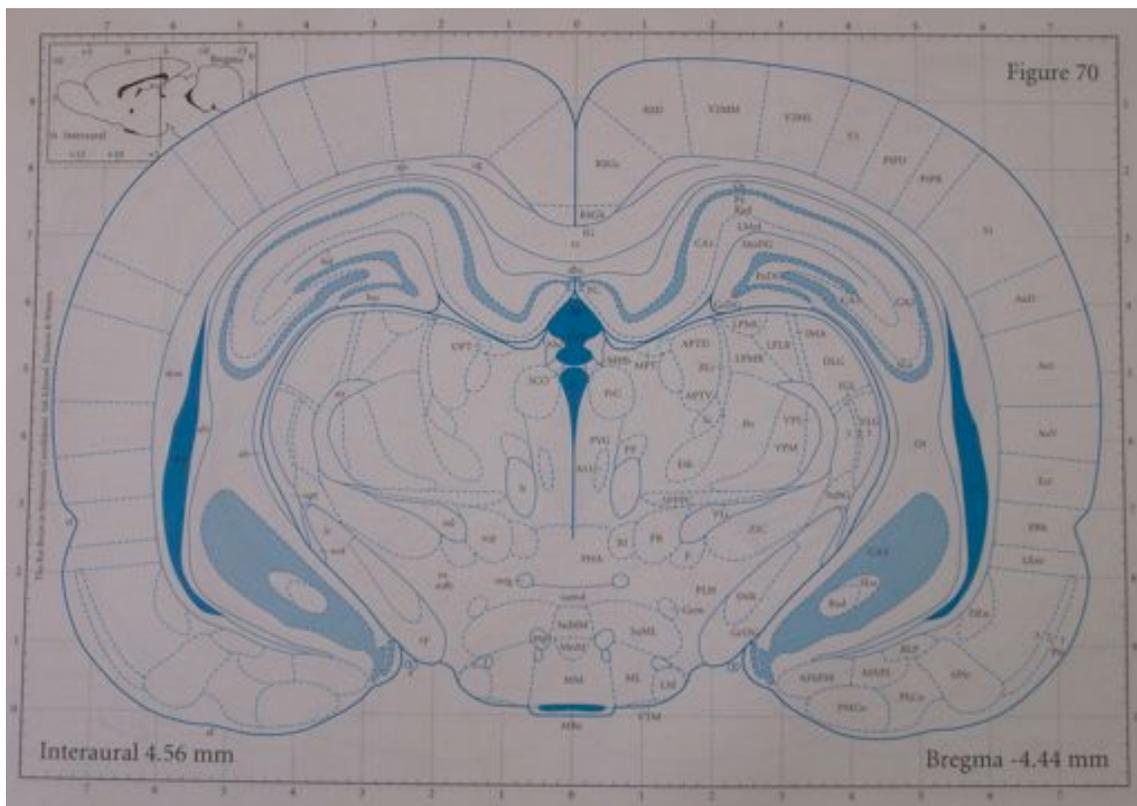
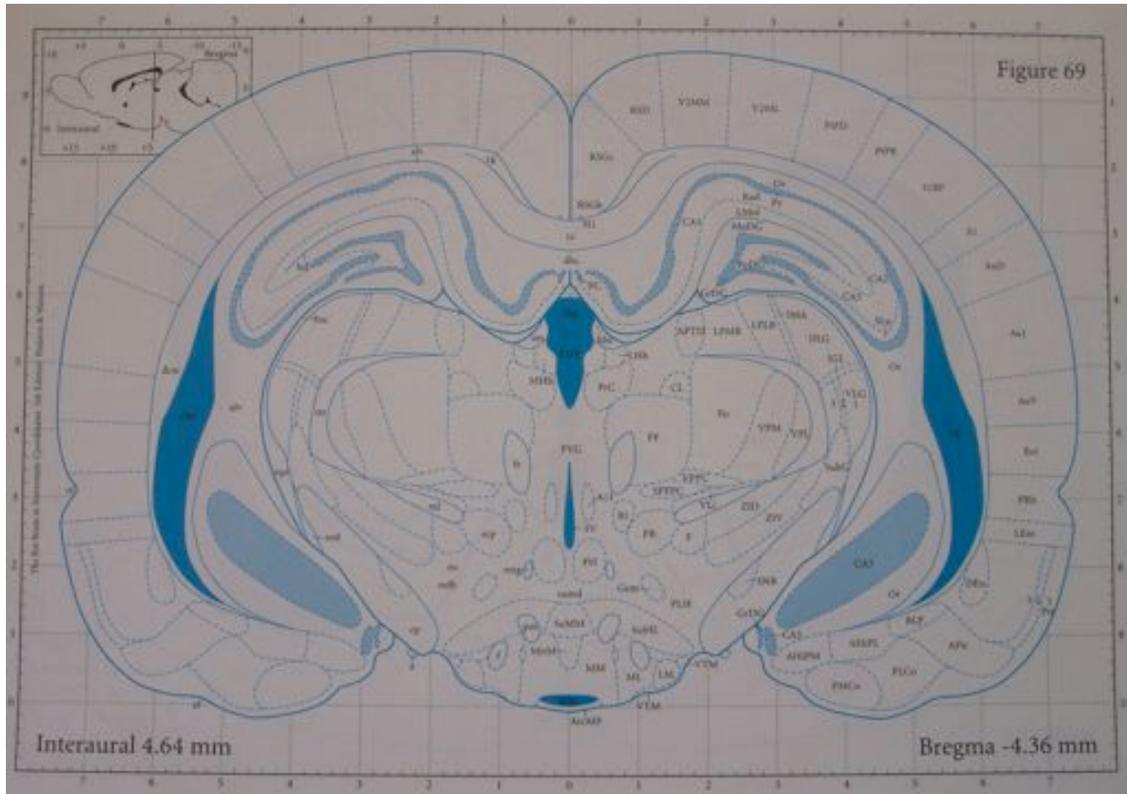


Figura 5. Corte transversal del cerebro de ratón, **af**: tejido amigdalario.

El grupo basolateral comprende los núcleos lateral, basolateral, basomedial y central. El grupo de estructuras corticales conectadas con la amígdala comprende al núcleo medio, el área amígdalo-hipocampal, al núcleo cortical anterior y posterior, a la corteza periamigdalóide, y al núcleo del tracto olfativo lateral. (Fig. 6)

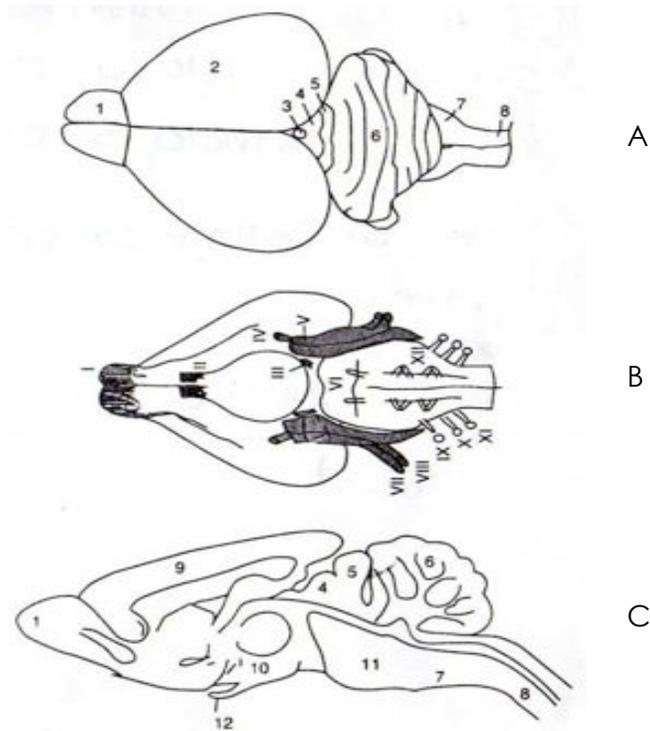


Figura 7. Cerebro de ratón, (A) vista dorsal, (B) vista ventral, (C) corte medio.

En humanos, la participación de la amígdala en la conducta emocional se ha estudiado a partir tanto de pacientes con afectación amigdalina como de sujetos neurológicamente normales mediante el empleo de técnicas de neuroimagen funcional. (Sánchez-Navarro y col. 2004). La extirpación de la amígdala se ha empleado en humanos con fines terapéuticos, en concreto para reducir la agresividad, violencia e hiperactividad. La extirpación bilateral de la amígdala reduce el número de episodios agresivos. Los estudios con pacientes con lesión amigdalina

también han puesto de manifiesto la implicación de esta estructura en el condicionamiento emocional.

En cuanto a la participación diferencial de la amígdala izquierda y derecha en la función emocional, se ha sugerido la existencia de una posible asimetría. A la amígdala izquierda se le ha relacionado con la codificación y extracción de las características estímulares de la emoción así como con los procesos del lenguaje emocional, mientras que la amígdala derecha se encuentra implicada en los mecanismos de recuperación de la información emocional.

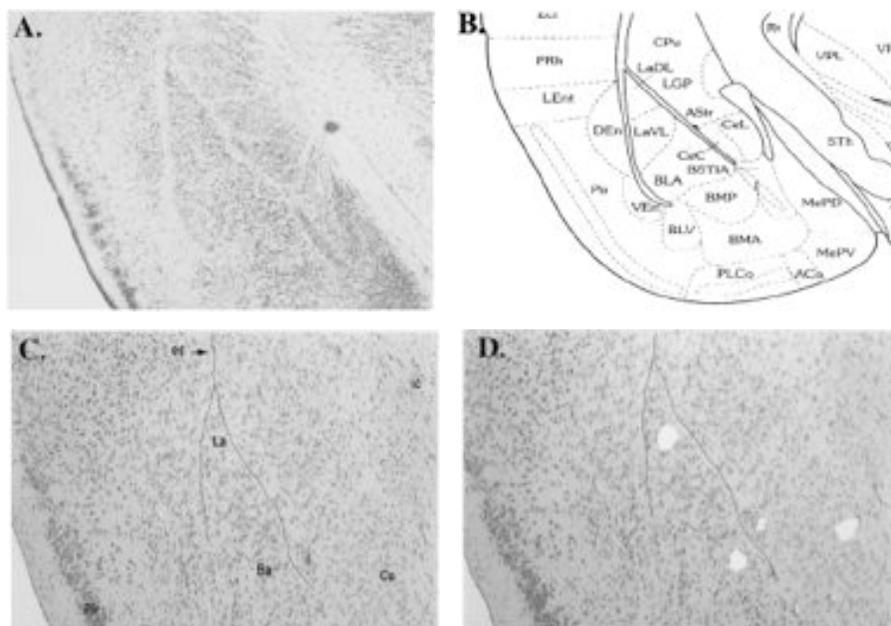


Figura 8. Disección anatómica de la amígdala. (A) Fotografía y (B) diagrama del complejo amigdalario de ratón (Franklin y Paxinos, 1997). (C) Microfotografía del complejo amigdalario y estructuras relacionadas. Se puede observar la cápsula externa (ec), el núcleo lateral (La), el núcleo basolateral (Ba), el núcleo central amigdaloides (Ce) y el núcleo intercalado (i). (D) Es la misma microfotografía que (C), después de una disección y aspiración de las porciones La, Ba, Ce e i.

En estudios con sujetos neurológicamente normales en los que se han empleado técnicas de neuroimagen funcional, se ha observado que la amígdala se activa durante la respuesta de miedo condicionado, (LaBar



et al. 1995) durante el procesamiento de caras emocionales y durante la visión de imágenes de contenido desagradable. La mayor activación ante expresiones de miedo se producía en la amígdala izquierda y la corteza periamigdalina. En un estudio en el que se registraba la actividad amigdalina mediante resonancia magnética nuclear funcional (RMNf) durante una tarea en la que los sujetos tenían que seleccionar cuál de entre tres palabras era la más desagradable o la más neutra, encontraron mayor activación de la amígdala derecha ante las palabras desagradables. (Tabert et al., 2001)

Los estímulos auditivos de risa y llanto producen activación en la amígdala derecha, siendo mayor dicha activación en la amígdala derecha que en la izquierda para ambos tipos de estímulos. En general, los resultados obtenidos mediante técnicas de neuroimagen funcional indican que la amígdala, por lo menos ante estímulos aversivos, interviene de forma significativa en el procesamiento de los mismos, no siendo posible, poder atribuir con certeza una especialización lateralizada a cada amígdala.

Tomando en conjunto, los resultados procedentes tanto de estudios de pacientes con lesiones amigdalinas como de estudios de neuroimagen funcional en sujetos normales, la amígdala es necesaria para responder de un modo estereotipado y universal a los estímulos que engendran o señalan peligro, siendo su finalidad la de preparar al organismo de forma rápida para entrar en acción, sin necesidad de que éste debe realizar un procesamiento cognitivo complejo. (Paradiso et al., 1999)

En relación a los ratones recién nacidos, como los utilizados en nuestro experimento, no se pudo encontrar literatura sobre el grado de



maduración que tienen los diferentes núcleos de las amígdalas. No formó parte del estudio conocer si la Indometacina podía interferir con el desarrollo de las neuronas de alguno de los grupos de neuronas que fueron mencionados, ni tampoco se intentó un estudio histológico comparativo entre las amígdalas de los ratones expuestos al fármaco y los animales control. Las amígdalas fueron seleccionadas como el área del cerebro a estudiar después de la exposición a la Indometacina a causa de que varios experimentos clínicos previos mostraron que los animales expuestos prenatalmente al fármaco estaban irritables y se estresaban con mayor facilidad que los de los grupos control. En este trabajo nosotros tampoco tratamos de establecer una asociación entre los cambios en la expresión de genes a causa de la exposición prenatal a la Indometacina y las probables lesiones y alteraciones funciones de esta región del cerebro de los ratones.

6. MICROARREGLOS

Los Microarreglos de DNA constituyen una de las armas más poderosas y versátiles de la investigación genómica y genética en la actualidad. Estas técnicas permiten usar la creciente información de secuencias del genoma para medir en forma paralela y cuantitativa la expresión de los genes a través del RNA mensajero de decenas de miles de genes simultáneamente. (Benitez Bribiesca, 2004)

No hace muchos años, la mayoría de los investigadores interesados en observar cambios en los niveles de expresión de los genes, tenían que estudiarlos uno por uno. Actualmente con la tecnología de los Microarreglos diseñada por Brown P.O. y Botstein D. en 1999, es posible



hacer preguntas a todos los genes de un conjunto de células de un organismo determinado, en un solo experimento.

Para realizar en microarreglo, se llevan a cabo diferentes pasos. Lo primero es seleccionar el tejido que va a ser estudiado y las condiciones experimentales o clínicas en las cuales se va a realizar el estudio. Una vez que se tiene la muestra de células, el paso siguiente es la obtención de RNA. El aislamiento de RNA para un microarreglo no difiere de los protocolos habituales para purificar RNA total. Solo se debe de tomar en cuenta que es necesario obtenerlo lo más concentrado posible (se requiere al menos 30 μg de RNA total) y que se le deben hacer un corrimiento electroforético preliminar para asegurarse de que no se encuentra desnaturalizado antes de iniciar el microarreglo. Para ello se recomienda utilizar muestras obtenidas recientemente. Una vez obtenido el RNA, se utiliza la síntesis in vitro del cDNA de cadena sencilla. Y en seguida se procede a la hibridización del microarreglo. No difiere significativamente de las condiciones que se utilizan para realizar un experimento tipo Southern o Northern.

Las superficies sobre las que se pueden imprimir los microarreglos de DNA son dos, las membranas de materiales como la nitrocelulosa o el nylon y las laminillas de vidrio o epóxico, semejantes a las que se utilizan para microscopía. Estas últimas son las más utilizadas, ya que permiten tener un mejor control sobre el diámetro de las aplicaciones y la distancia entre ellas.

Estas laminillas se pueden conseguir con diferentes recubrimientos como: poli-lisina, aminos y aldehídos, las cuales permiten la unión química del DNA con la superficie.

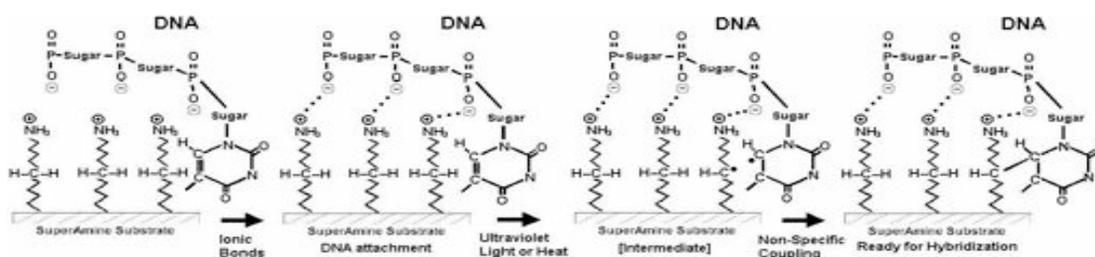


Figura 9. Ejemplo de la superficie sobre la que se pueden imprimir los Microarreglos y del mecanismo para el entrecruzamiento del DNA a la laminilla.

Existen dos tipos de lectores de Microarreglos: los lectores con cámaras digitales y los lectores confocales. En los primeros se registra la imagen fluorescente como si se tomara una fotografía, en los lectores confocales se hace una reconstrucción de la imagen utilizando fotomultiplicadores para registrar la señal.

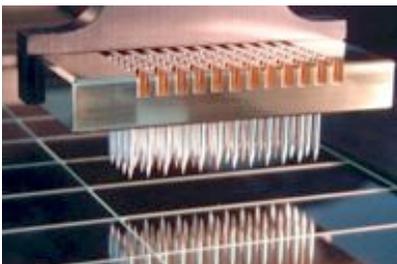


Figura 10. Fotografía de la cabeza, los aplicadores y las laminillas en un impresor de microarreglo de contacto.

En ambos tipos de lectores se utiliza un láser para excitar las moléculas fluorescentes unidas al cDNA y poder obtener la imagen de cada una de las muestras contenidas en el microarreglo. Este procedimiento se hace para cada uno de los fluoróforos obteniéndose dos imágenes, una para el fluoróforo Cy3 (rojo) y una para el fluoróforo Cy5 (verde) (Figura 11). Para la obtención de estas imágenes se debe ajustar la intensidad del láser y la sensibilidad de la cámara o de los fotomultiplicadores, de tal forma que ambas imágenes den valores semejantes de fluorescencia total. Comúnmente para lograr esto, en los Microarreglos se colocan

controles o marcadores que se utilizan para ajustar la señal de fluorescencia para ambos fluoróforos. Una vez obtenidas estas imágenes, pueden ser combinadas para obtener un aspecto visual del microarreglo. En la Figura 12 se muestra un ejemplo, en el que podemos observar puntos amarillos, verdes, rojos y un sin número de tonalidades entre el verde y el rojo. Si para este experimento se marcó la muestra experimental en rojo y la control en verde, todos aquellos puntos que se ven rojos o tonalidades anaranjadas, pueden ser interpretados como genes que aumentaron su expresión.

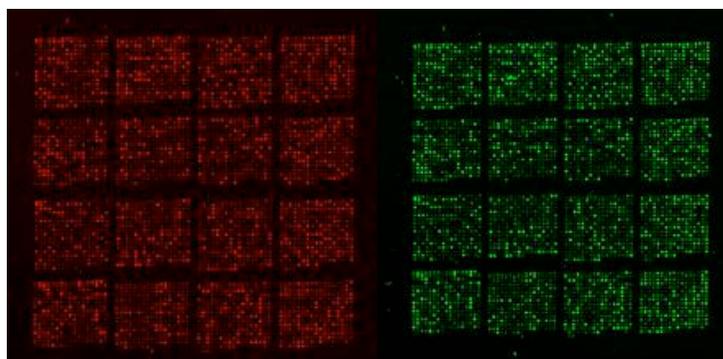


Figura 11. Imagen de fluorescencia para un microarreglo hibridizado con una sonda marcada con dUTP-Cy3 (rojo) y una sonda marcada con dUTP-Cy5 (verde).

Los puntos verdes o tonalidades entre el amarillo y el verde serán aquellos genes que disminuyeron su expresión. Y finalmente los puntos amarillos representan a los genes que en ambas condiciones se expresan de igual forma.

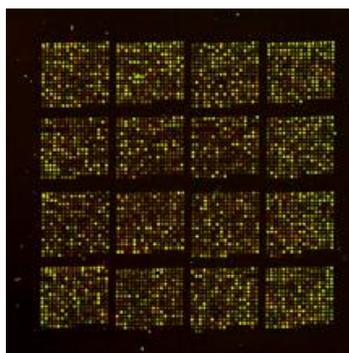


Figura 12. Imagen combinada de las imágenes de la figura 4.



Interpretación de los resultados. Para la interpretación de resultados se requiere del análisis estadístico, el cual puede ser realizado con programas comerciales. Básicamente y utilizando los mRNA libres que tiene el citoplasma de un conjunto de células, se trata de discriminar entre los miles de datos obtenidos, aquellos que son significativos y que representan un cambio real, es decir identificar aquellos genes que se encuentran encendidos y se sobre-expresan significativamente y también aquellos otros que se encuentra apagados. (Ramírez y col., 2003)



OBJETIVO GENERAL

Determinar si la exposición prenatal a Indometacina afecta la expresión cerebral de genes en el ratón recién nacido.

OBJETIVO PARTICULAR

- Conocer si, en las amígdalas de ratones recién nacidos expuestos a Indometacina durante su desarrollo embrionario, ocurren cambios en la expresión de los genes que codifican para proteínas que participan la síntesis de citocinas inflamatorias.

HIPÓTESIS

Cuando los ratones recién nacidos, que habían estado expuestos prenatalmente a la Indometacina, son retados con agentes estresantes como los lipopolisacáridos, la síntesis de citocinas inflamatorias en las amígdalas del cerebro es diferente a la que se puede observar cuando los ratones de esa misma edad no han estado expuestos prenatalmente a ese mismo medicamento antiinflamatorio.



DISEÑO EXPERIMENTAL

Para estudiar el efecto de la exposición prenatal a la Indometacina sobre la expresión de genes en el cerebro ratones recién nacidos, primero fue necesario obtener las madres gestantes. Para ello, durante una noche se cruzaron quince ratones hembras Balb/c de 4 meses de edad con ratones machos de la misma edad. Los animales fueron separados al día siguiente y las ratonas se dividieron en 2 grupos de 10 y 5 animales cada uno. A las ratonas del primer grupo se les iba a administrar la Indometacina por vía oral (50 µg / dosis) a partir del séptimo día de la gestación y durante 6 días, mientras que los animales del segundo grupo se les iba a administrar el mismo volumen (50 uL) de solución salina isotónica por la misma vía y durante el mismo tiempo. El primer grupo contenía un número mayor de ratonas porque (por la experiencia con experimentos anteriores y a pesar de tener estandarizada la dosis) se esperaba que por efecto de la administración del fármaco se perdieran algunos embarazos o que, inmediatamente después del nacimiento, algunas madres practicaran el canibalismo con sus crías.

Una vez que los ratones nacieron, los animales de las diferentes camadas fueron separados aleatoriamente. Del total de ratones recién nacidos se tomaron al azar 25 animales de cada grupo (con y sin una exposición prenatal a la Indometacina). Estos a su vez fueron divididos en 2 subgrupos, uno de 13 y otro de 12 ratones, a todos los cuales se les administró vía intraperitoneal 0.1 mL de LPS o solamente solución salina por la misma vía, esto para facilitar el sacrificio de los ratones. A las tres horas de haberles administrado el LPS o la SSI, se sacrificó cada ratón y se obtuvo su cerebro, se separaron las amígdalas y se guardaron en Trizol. Cada vial fue congelado a -20°C. Se realizó una



mezcla al azar de las muestras obtenidas en las mismas condiciones experimentales y se extrajo el mRNA para posteriormente realizar un estudio de Microarreglo.



METODOLOGÍA

Perfusión de ratones recién nacidos

La perfusión se realizó como paso previo al estudio histológico, ya que es necesario tener el cerebro del ratón completamente libre de sangre para poder localizar la región donde se encontraban a esa edad los principales núcleos amigdalinos. Además se deja reposar en formaldehído para así lograr que se conserve y que mantenga una cierta dureza para poder hacer los cortes necesarios. Posteriormente, durante los experimentos para obtener las muestras de amígdala y sus correspondientes ácidos mieloicos, ya la perfusión de los ratones no se llevó a cabo.

Procedimiento

1. Se anestesiaron 7 ratones recién nacidos con éter
2. Se abrió el torax a la altura de las costillas verdaderas
3. Se localizó el corazón y se perfundió con 2 mL con solución de formaldehído al 10%
4. Se cortó la cabeza y se colocó en formaldehído al 10%
5. Se dejó reposar 1 semana
6. Se transfirió la cabeza a una solución de PBS pH 7.4 y se mantienen en refrigeración



Extracción de Cerebros

Procedimiento

1. A las cabezas que se encontraban en PBS se les quito toda la piel que cubre al cráneo
2. Con las pinzas se quitaron cuidadosamente las meninges
3. Se hizo un corte en la parte posterior baja del cráneo y a lo largo de esté
4. Se retiró cuidadosamente todo el cráneo
5. De manera cuidadosa se introdujo una espátula por uno de los extremos de la parte baja del cerebro y se retiró íntegramente, sin lastimar ninguno de los lóbulos
6. El cerebro se colocó en PBS

Localización histológica de las amígdalas

Los cerebros se llevaron al Departamento de Neurología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la dirección del Dr. Escobar Izquierdo, quien nos explicó. Una vez perfundido el cerebro, se le hicieron los cortes que eran necesarios y después las tinciones de los mismos, con hematoxilina-eosina, para localizar exactamente dónde se encuentran las amígdalas en el cerebro de los ratones recién nacidos. Una vez localizadas las amígdalas, se procedió a seguir con el paso siguiente, es decir, con la administración de la Indometacina durante la segunda semana de la gestación de un grupo de ratonas.

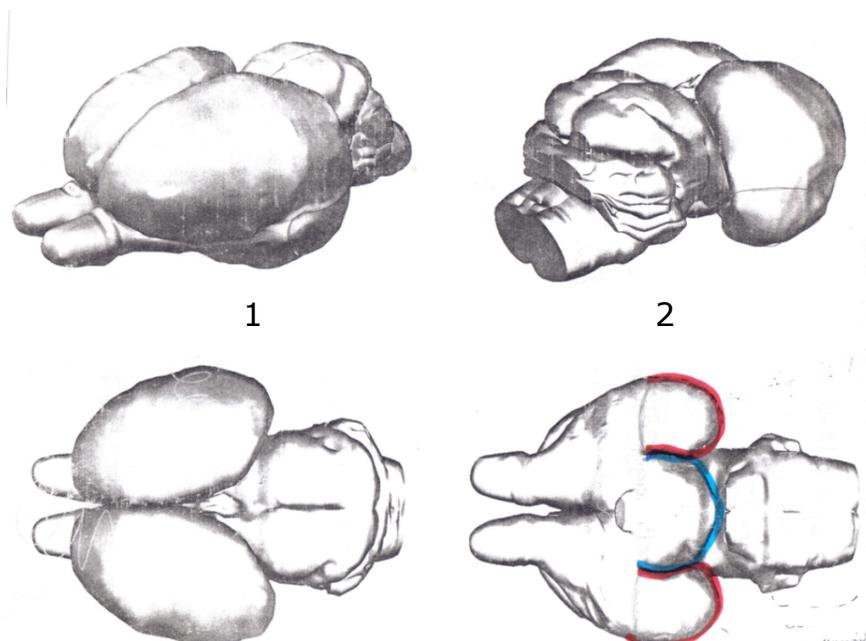


Figura 13. Imagen del Cerebro y del Tronco encefálico de ratón 1: vista anterior izquierda, 2: vista posterior derecha. En rojo se observa el área amigdalara y en azul se observa el hipotálamo.

Animales

Para obtener las hembras gestantes se utilizaron 15 ratones hembras de 4 meses de edad con un peso corporal promedio de 25 g, provenientes del bioterio del Edificio E de la Facultad de Química de la UNAM. Después de su apareamiento durante una noche, se mantuvieron en cajas de policarbonato con rejillas de acero inoxidable, en un cuarto con filtración de aire y ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Todos los animales tuvieron libre acceso a comida y agua.

Extracción de Cerebros II

La extracción de cerebros de los ratones recién nacidos se realizó bajo condiciones de asepsia, en campana de flujo laminar y colocando el material sobre una cama de hielo.



Procedimiento

1. Se etiquetaron los viales, se les agregó 200 μ L de Trizol a cada uno de ellos y se colocaron en hielo
2. Se limpió con alcohol todo el material y se introdujo a la Campana de Flujo Laminar
3. Se prepararon charolas con hielo, sobre las cuales se colocaron los viales y las cajas petri sobre las que se realizó la disección
4. La extracción de cerebros se realizó de acuerdo a los pasos 1-5 de la "Extracción de cerebros"
5. Se localizaron las amígdalas y se cortaron cuidadosamente con una navaja estéril
6. Se colocaron en el vial con trizol correspondiente
7. Se mezclaron perfectamente con la ayuda de un agitador vortex
8. Todos los viales se conservaron el hielo

Preparación de muestras para microarreglo

Se realizó una mezcla de todas las amígdalas seleccionadas para cada uno de los dos grupos experimentales, es decir, el grupo de los ratones prenatalmente expuestos a la Indometacina y el de los ratones cuyas madres solo fueron tratadas con SSI. Posteriormente se realizó la extracción del RNA y, después una electroforesis en agarosa para comprobar la integridad del RNA en las dos muestras. Éstas se llevaron a la Unidad de Microarreglos de DNA del Instituto de Fisiología Celular para que se realizara un Microarreglo.

RESULTADOS DEL MICROARREGLO

La administración de Indometacina por vía oral, alteró la expresión de diferentes genes involucrados en la producción de citocinas inflamatorias. La mayoría de los 22,000 genes analizados no cambiaron. Solamente 50 aumentaron su expresión y 308 la disminuyeron. De todos éstos últimos, la mayoría de ellos estaban relacionados con el desarrollo cerebral, es decir eran neurotrofinas, etc. Sin embargo, en este trabajo nosotros solamente seleccionamos, para el estudio de los mapas de sus vías de señalización, los genes relacionados con la síntesis de citocinas inflamatorias.

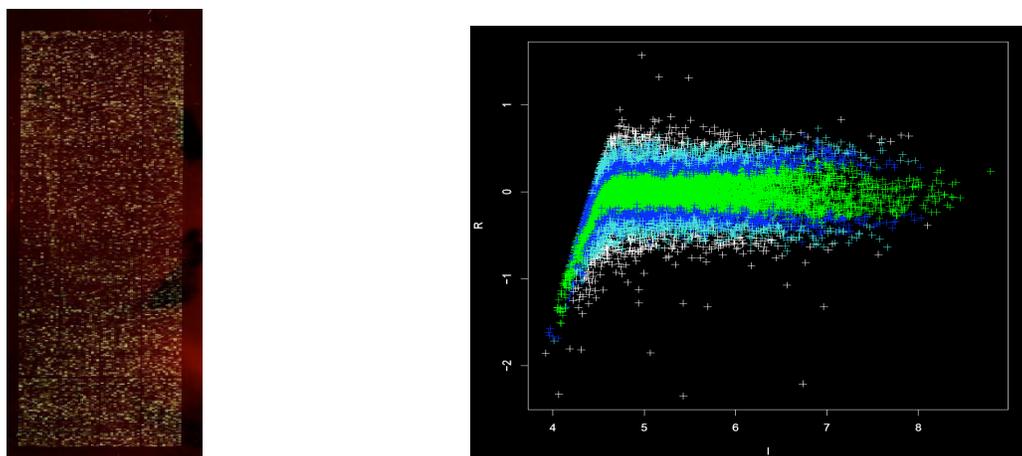


Figura 14. Distribución de la expresión de los genes estudiados (2SD) en los animales INDO (+) en relación al control.

Al seleccionar los genes que codificaban proteínas relacionadas con la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, se encontró una cantidad no esperada de genes que tenían alterada su expresión (encendidos o apagados) más de dos desviaciones estándar con respecto al control. Cinco genes relacionados con la síntesis de citocinas inflamatorias tenían aumentada significativamente su expresión y cinco genes con la síntesis de citocinas inflamatorias tenían disminuida su expresión. Sus nombres,



símbolos y el proceso en el cual están involucrados se enlistan en las tablas 3 y 4.

Los resultados muestran cambios en la expresión de una serie de genes, particularmente de un grupo que está relacionado con la modulación de la reacción inflamatoria. Entre estos se puede mencionar a la proteína acopladora MyD88, Socs y otros que se enlistan en la tabla 3 y 4. Además se incluyen las principales vías de señalización en las que están involucradas estos genes, mismos que se presentan en las figuras 14 – 26.

Brevemente, se añade una explicación de las funciones que tienen cada uno de estos genes, las cuales fueron tomadas como criterio para seleccionarlas e incluirlas en nuestro estudio.

Tabla 3. Genes que aumentaron su expresión 2SD con respecto al control

SÍMBOLO	NOMBRE	PROCESO EN EL QUE ESTÁ INVOLUCRADO
Myd 88	Receptor tipo Toll de IL-1	Producción de citocinas
Oprm 1	Receptor Opioide	Comportamiento
Socs 3	Supresor de la señalización de citocina 3	Producción de citocinas
Nfat2	Activador del factor nuclear de células T	Producción de citocinas
Ifha	Familia del Interferon alfa	Respuesta de defensa
Chrd	Chordin	Producción de citocinas Proinflamatorias



Tabla 4. Genes que disminuyeron su expresión 2SD con respecto al control

SÍMBOLO	NOMBRE	PROCESO EN EL QUE ESTÁ INVOLUCRADO
Smad 9	Homologo Mad 9	Desarrollo del cerebro
Ptgs2	Prostaglandin - endoperoxido sintasa 2	Biosíntesis de Prostaglandinas
Xcl 1	Ligando 1 de Quimiocinas	Producción de citocinas
Gdf5	Factor de crecimiento 5	Actividad de citocinas
Nf1	Neurofibromatosis 1	Desarrollo del Sistema Nervioso Periférico

Genes que aumentaron su expresión 2SD

A continuación se muestran los mapas de las vías de señalización de algunos de los genes que presentan una alteración en su expresión.

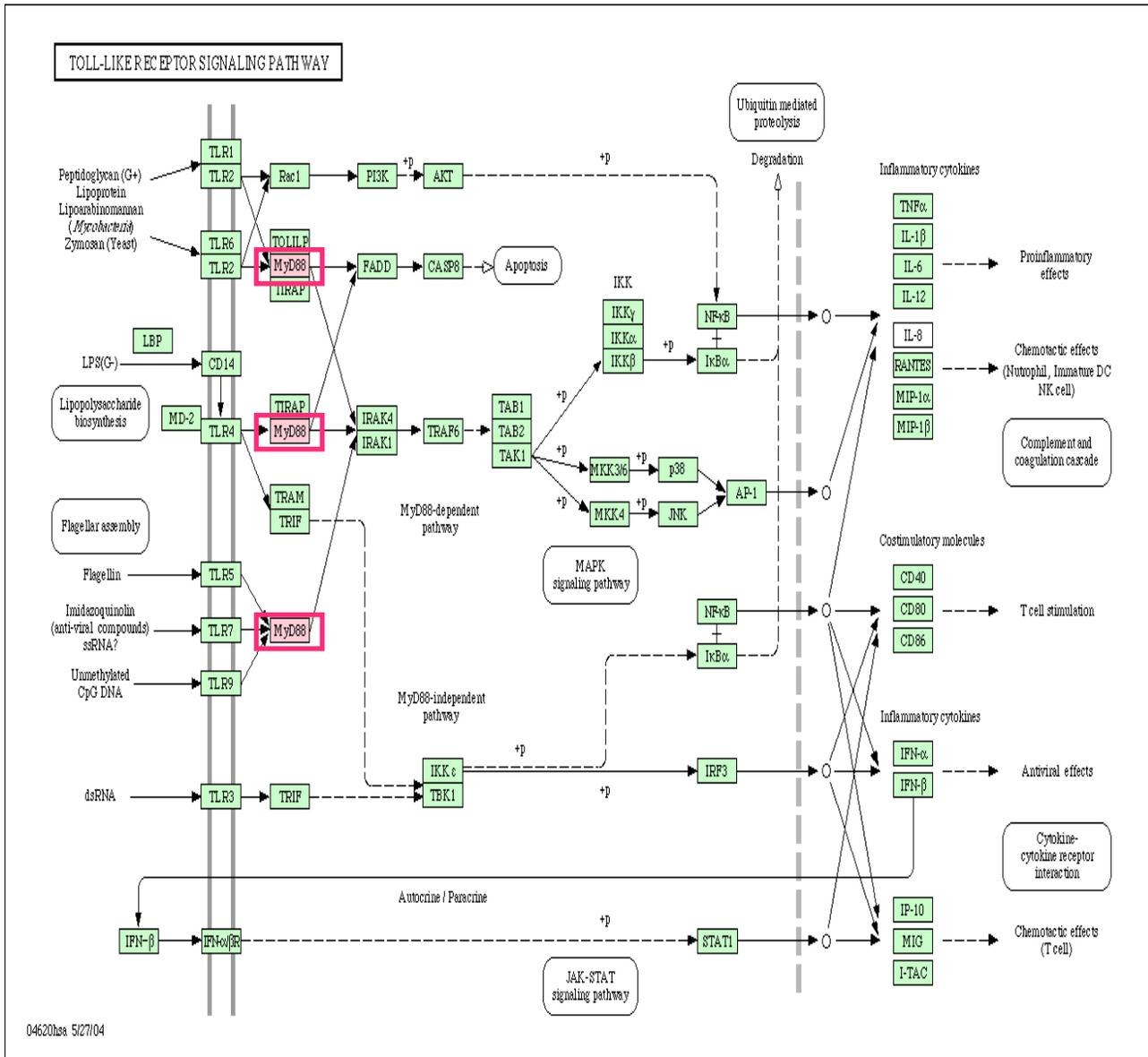


Figura 15. Mapa de las vías de señalización del Toll-like Receptor (TLR) en las cuales interviene el gene para la proteína acopladora **MyD88**, que participa como una proteína acopladora para la señal que estimula la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (TNF α , IL-8, IL-6, IL-1 y varios factores quimiotácticos) y cuya expresión se encontró significativamente aumentada en las amígdalas de los animales expuestos a la Indometacina.

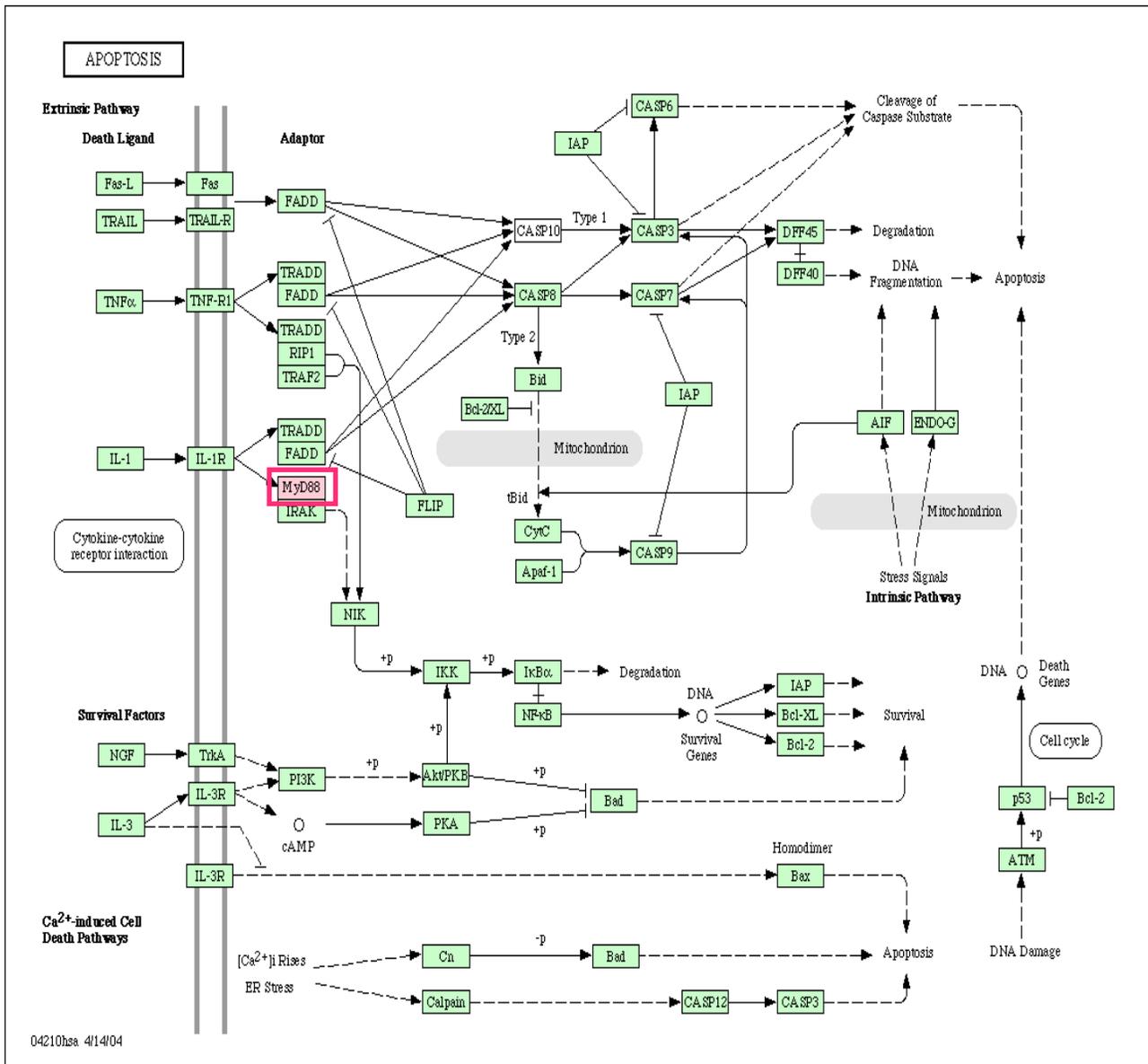


Figura 16. Mapa de las vías de señalización que pueden conducir a la apoptosis a partir de la estimulación de receptores de membrana por citocinas pro-inflamatorias y otras moléculas, mostrando nuevamente que la sobre-expresión del MyD88 puede comprometer la sobrevivencia de la célula.

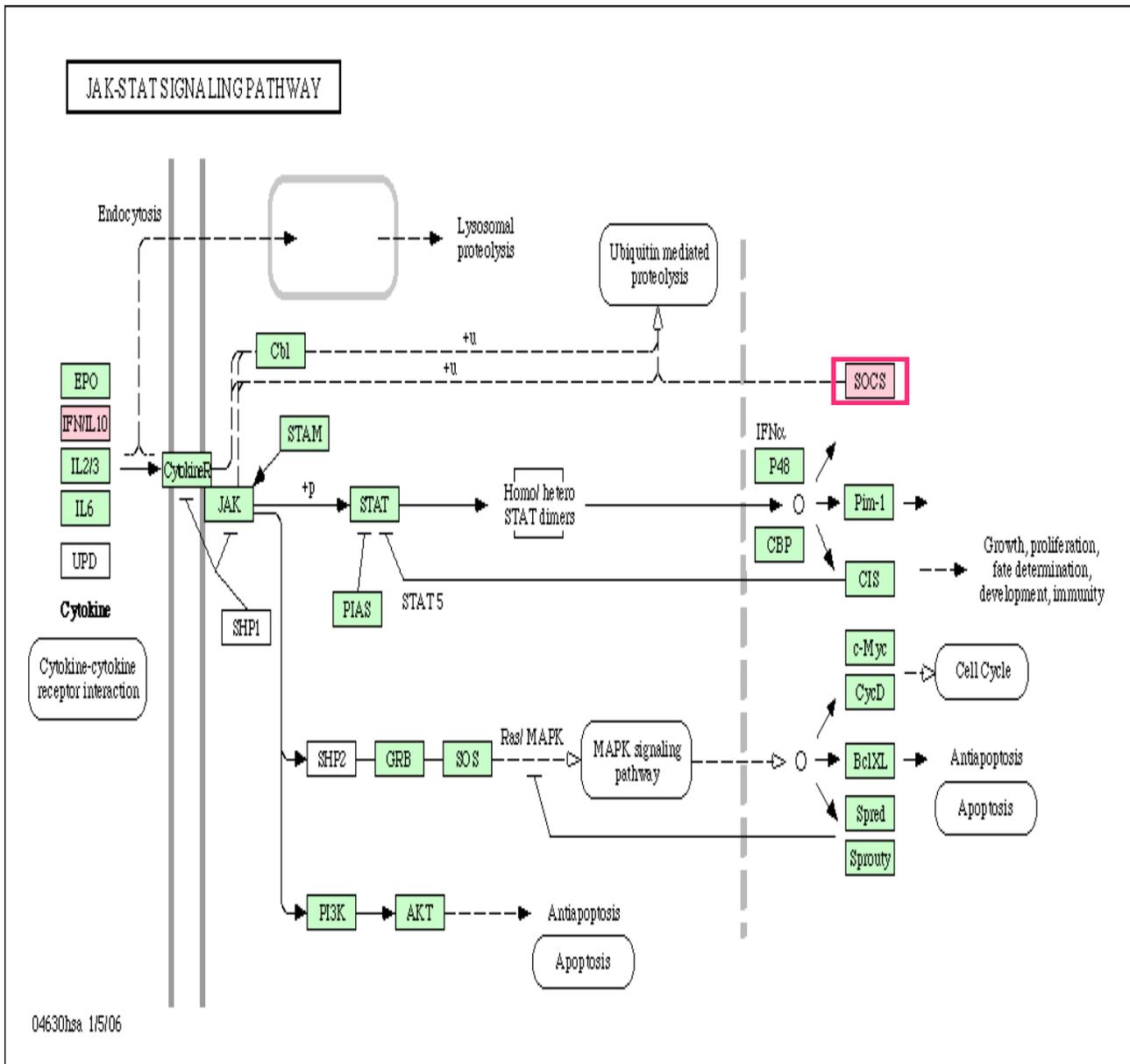


Figura 17. Ruta de señalización de Jak-stat se muestra la interacción de citocinas (IL-6, IL-10, IFN, etc) con sus receptores específicos y la activación de los factores de transcripción que participan en la señalización de los mensajes para la proliferación celular y el control las respuestas inmunológicas inflamatorias a través de la sobreexpresión del factor supresor de la estimulación de citocinas (SOCS).

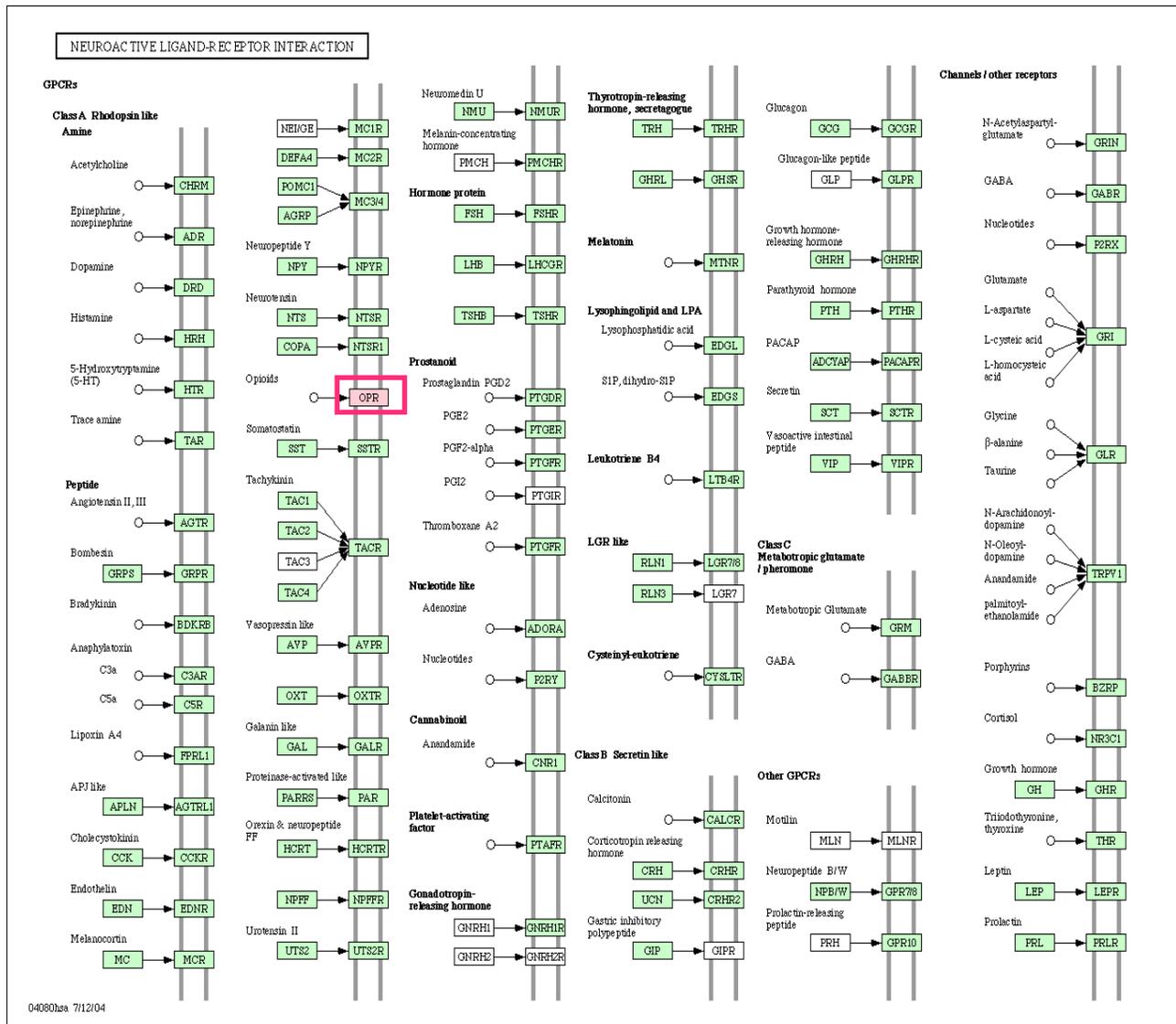


Figura 18. Ruta metabólica de interacción neuroactiva ligando-receptor. Se muestra una lista de los receptores opioides, prostanoides, hormonales y de otras sustancias relacionadas con las reacciones inflamatorias y el control de su síntesis. Los resultados del microarreglo señalan una sobreexpresión significativa de los genes que intervienen en la síntesis de los receptores para opioides (OPR). Los opioides son moduladores negativos de la actividad de los macrófagos, que son células productoras de citocinas pro-inflamatorias.

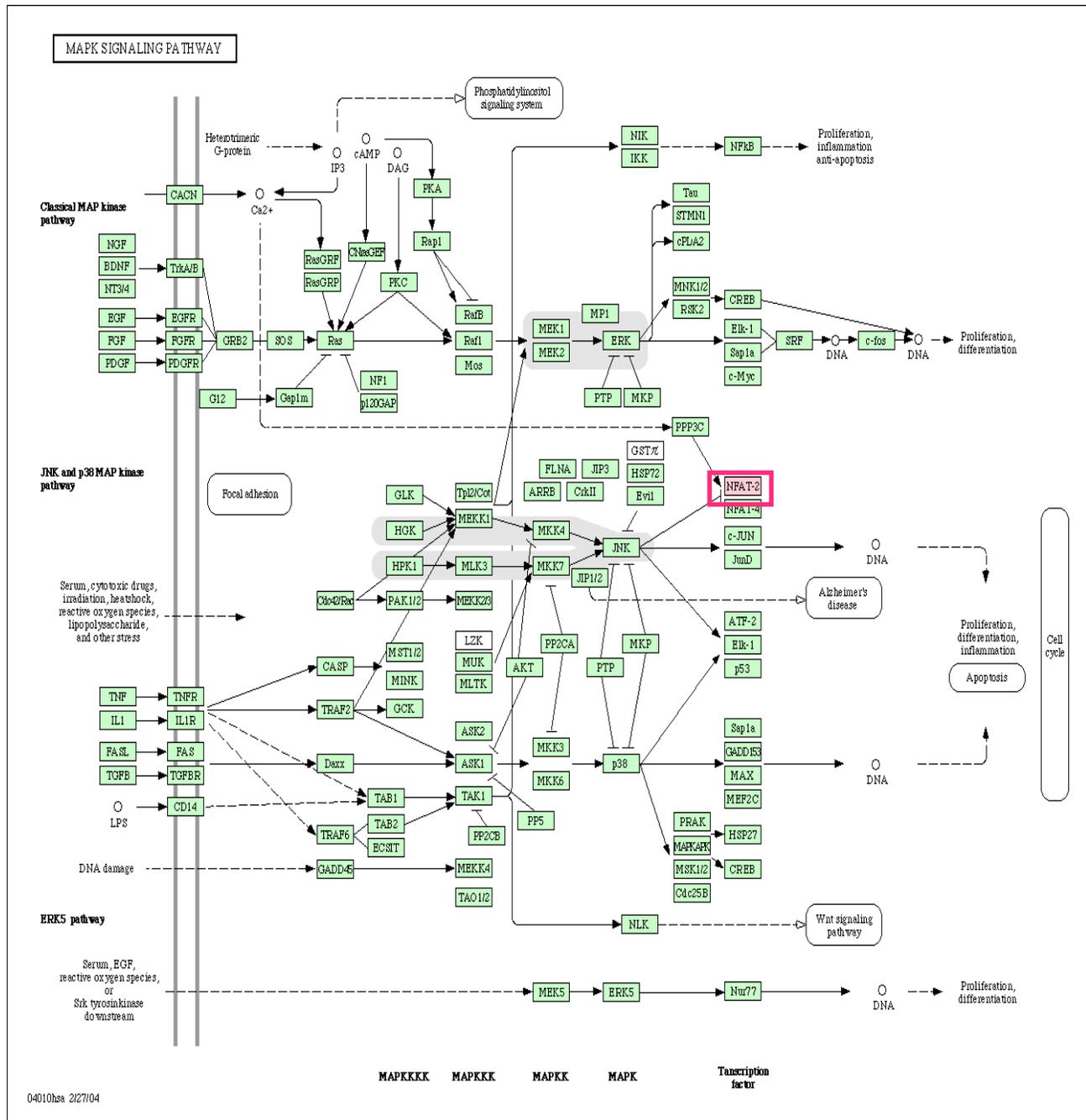


Figura 19. Mapa de las vías de señalización de las MAPK en las cuales interviene el gene para el factor de transcripción NFAT-2 que participa en los procesos de proliferación, diferenciación e inflamación y que fue encontrado sobreexpresado en las amígdalas de los ratones expuestos a la Indometacina prenatalmente.

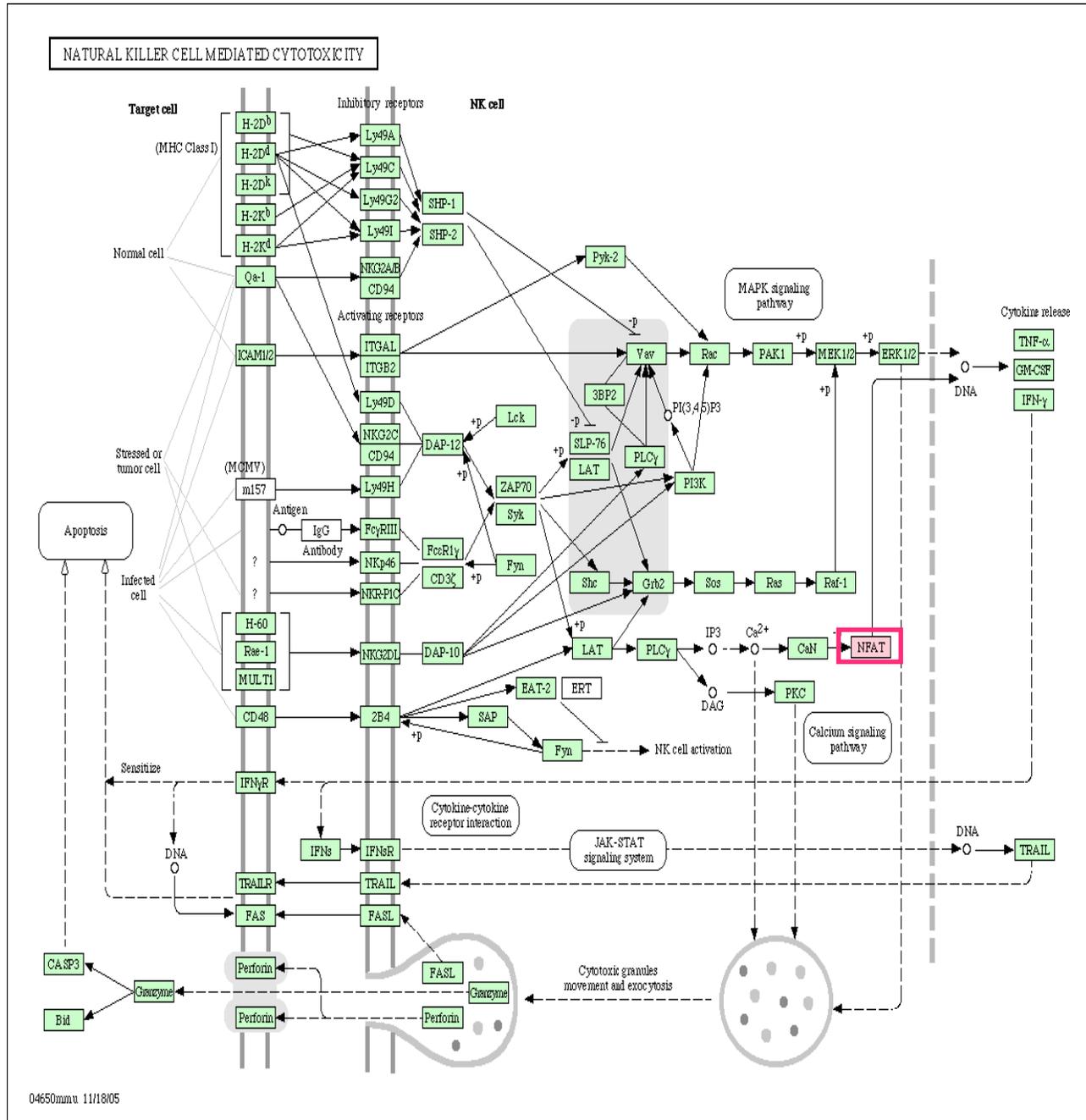


Figura 20. Mapa de las vías de señalización en las cuales interviene el gene para el factor de transcripción NFAT (en color rosa), que en las células asesinas está relacionado con la citotoxicidad mediada por NK, también está relacionado con la liberación de las citocinas inflamatorias TNF α e IFN γ y con el factor el factor estimulante de la formación de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), todas ellas relacionadas con la respuesta de las células que participan en las reacciones inflamatorias. Este gene fue encontrado significativamente sobreexpresado.

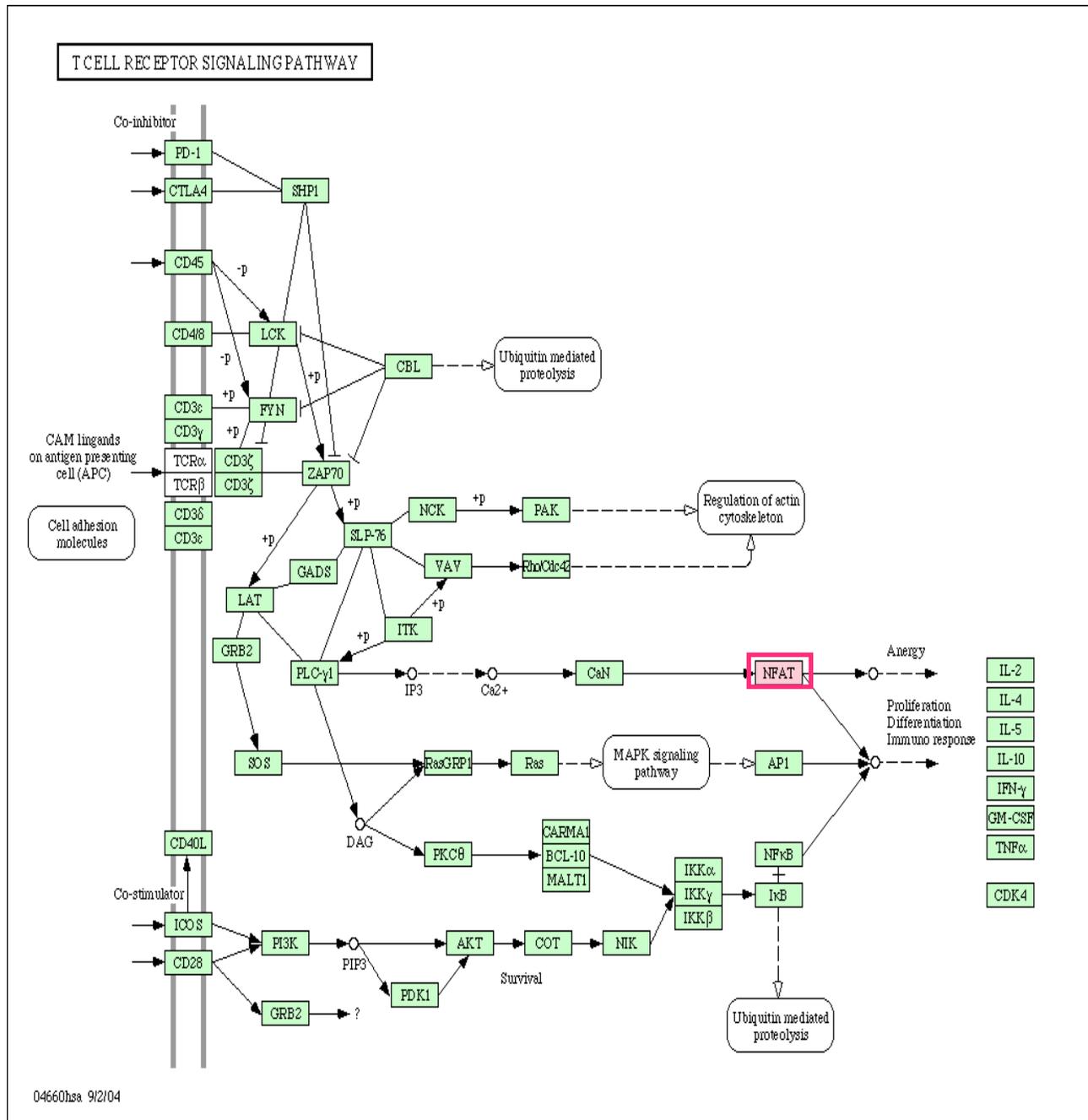


Figura 21. Mapa de las vías de señalización para el receptor de las células T, en las cuales interviene el gene para el factor nuclear de las células T activadas (NFAT), este influye en la síntesis de varias citocinas pro- y anti-inflamatorias, como IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF α e INF γ , este gen se encontró significativamente sobreexpresado en las amígdalas de los ratones expuestos a la Indometacina prenatalmente.

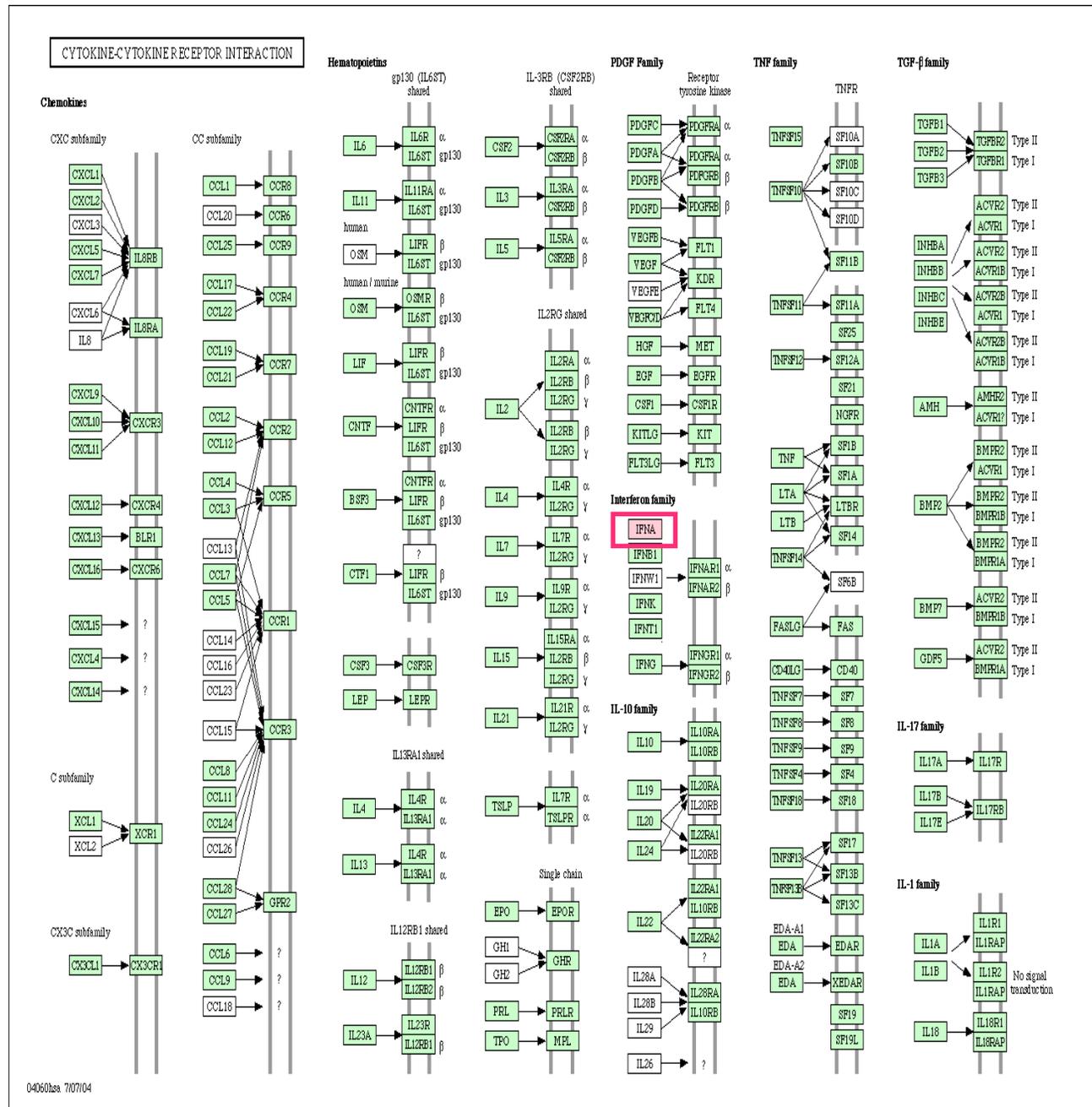


Figura 22. Ruta metabólica de interacción citocina-citocina, muestra algunos genes (IFNA) relacionados con la síntesis de los receptores para interferones alfa y beta. El IFNA se encontró sobreexpresado en las amígdalas de los ratones expuestos a la Indometacina.

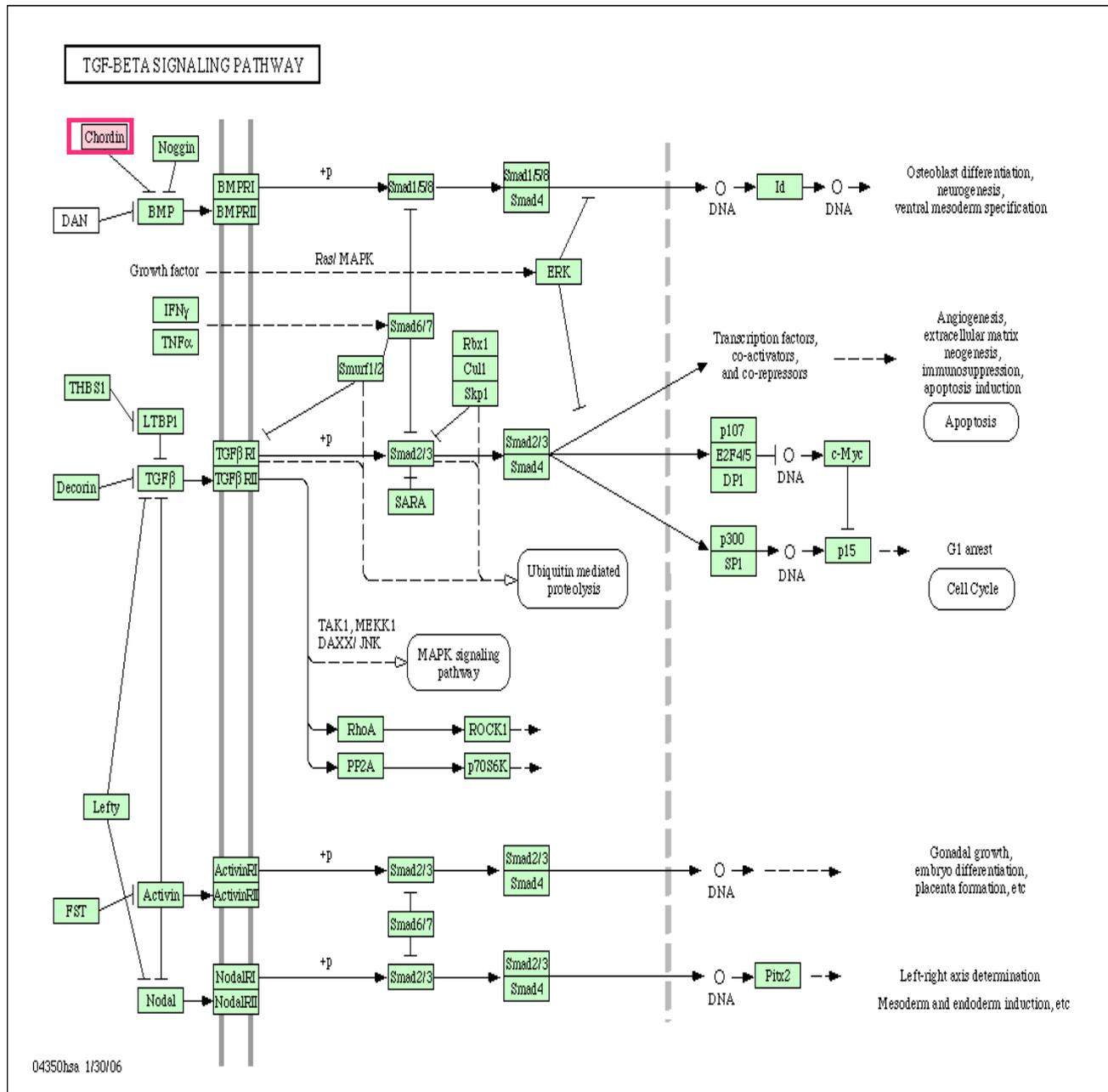


Figura 23. Mapa de las vías de señalización para la síntesis de la citocina TGF-β, en las cuales se muestra que el gene (en color rosa) Chordin que es necesario para el control de las citocinas pro-inflamatorias y el desarrollo del sistema nervioso central, se encuentra significativamente sobreexpresado.

Genes que disminuyeron su expresión 2SD

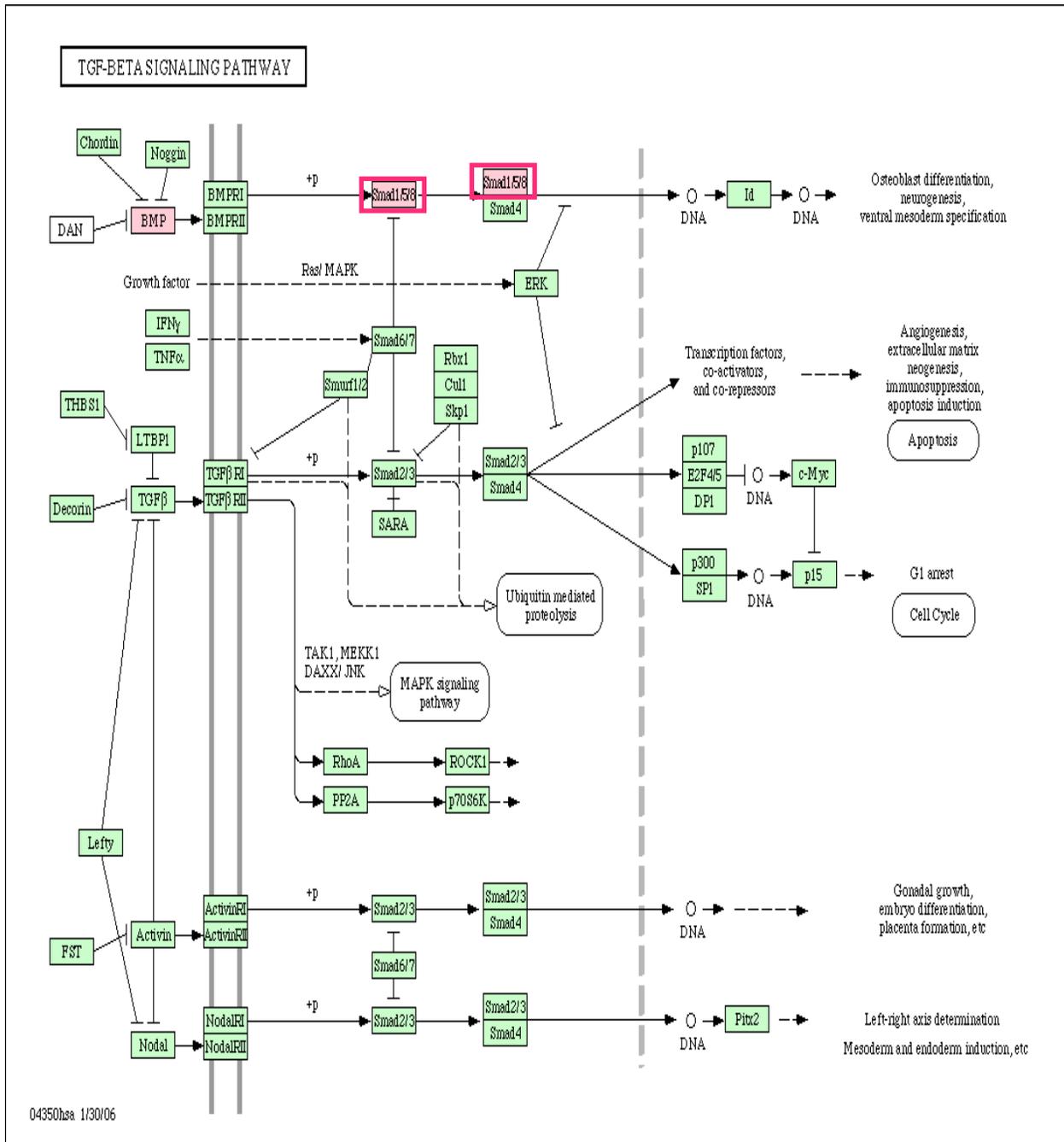


Figura 24. Ruta de Señalización de TGF-β. Smad 58 es un gen involucrada en el desarrollo de la parte media y posterior del cerebro.

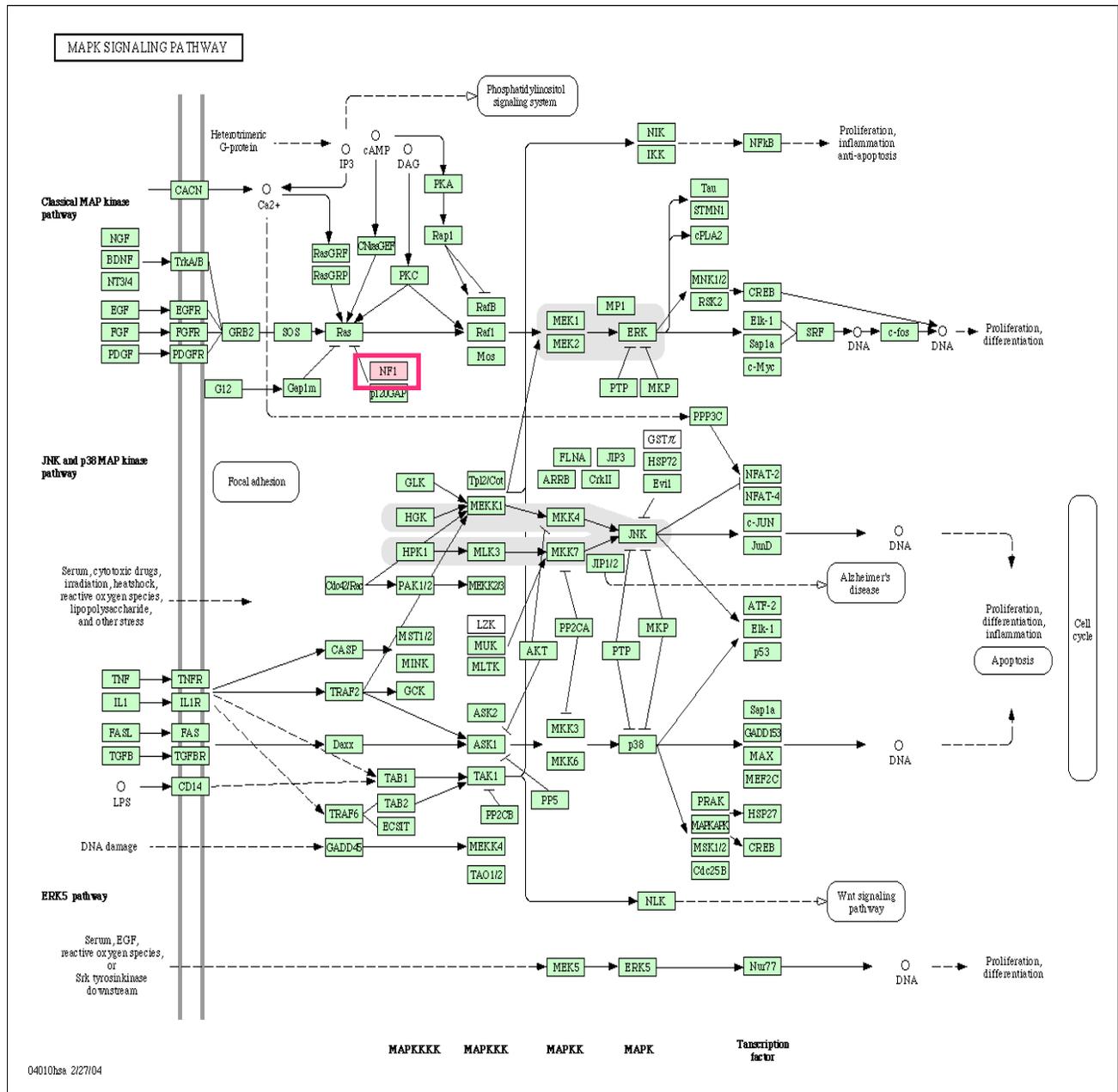


Figura 27. Ruta de Señalización de MAPK. Nf1 es un gen involucrado en el desarrollo del sistema nervioso simpático y periférico, y en el desarrollo de la parte anterior del cerebro.



DISCUSION

La Indometacina es un fármaco que se ha usado desde hace muchos años como un potente analgésico, antipirético y anti-inflamatorio, sin embargo, presenta varios efectos secundarios, principalmente sobre el tracto gastrointestinal del paciente. En la actualidad el uso de la Indometacina ha disminuido debido a la gran cantidad de AINEs con menor toxicidad que se encuentran en el mercado.

Los médicos obstetras utilizan la Indometacina como un tocolítico, es decir, la administran para evitar partos prematuros a través de una reducción de las contracciones de la musculatura del útero. No se encuentran en la literatura estudios que prueben la inocuidad de Indometacina administrada al final del embarazo o que demuestren que este fármaco anti-inflamatorio que inhibe la producción de prostaglandinas y citocinas pro-inflamatorias no tiene efectos secundarios sobre el feto cuando se administra durante la gestación.

Como es abundante la literatura en favor de que las prostaglandinas y las citocinas pro-inflamatorias participan en el desarrollo del cerebro durante el periodo embrionario y como los AINES inhiben la síntesis de estas dos clases de moléculas mediadoras de la inflamación, algunos reumatólogos consideran prudente evitar hasta donde sea posible la administración de Indometacina a la mujer embarazada y aún a los recién nacidos. De todos modos, las sospechas de que la Indometacina puede interferir con el desarrollo del cerebro se apoyan en un razonamiento teórico.



En realidad, después de los accidentes teratológicos con la talidomina y de las pruebas a favor de que el diazepam y otros medicamentos administrados durante el embarazo puedan interferir con el desarrollo normal del producto, hoy en día el sentido común y la buena práctica de la medicina aconsejan no administrar ningún medicamento a la mujer embarazada. Sin embargo, eso no impide que, experimentalmente y sobre animales de laboratorio, se continúen los estudios para completar el espectro de la toxicidad que tienen algunos fármacos de uso corriente.

El otro aspecto interesante que tiene el estudio de la probable toxicidad de la Indometacina consiste en que sus manifestaciones comprometen la conducta bajo el control del área límbica y, además, en que éstas suelen presentarse tardíamente en los adultos y no en la edad neonatal. En estudios preliminares desarrollados en el Laboratorio de Inmunología del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM, en colaboración con académicos de los laboratorios de investigación en Psicología de la Universidad Intercontinental de México, se ha podido comprobar que los ratones adultos que habían estado expuestos prenatalmente a la Indometacina eran más irritables que sus controles no expuestos a ningún medicamento. Los resultados de las pruebas llevadas a cabo para medir el grado de ansiedad e irritabilidad de los animales mostraron una diferencia significativa (resultados no publicados). Por estos antecedentes fue que seleccionamos las amígdalas como la zona del cerebro que debía ser estudiada los ratones expuestos prenatalmente a la Indometacina.

Las pruebas llevadas a cabo para estandarizar el modelo experimental revelaron resultados iniciales que permitieron ajustar las dosis y el



tiempo de administración. Por ejemplo, dosis altas provocaban la interrupción del embarazo y la pérdida del experimento. Asimismo, la administración de la Indometacina durante los primeros 7 días de la gestación, también provocaba abortos aún cuando se utilizaran dosis bajas. La dosis administrada también tuvo que ser disminuida después de comprobar un elevado porcentaje de canibalismo entre las madres después del parto. Esto también obligaba a trabajar con números elevados de madres gestantes y de todos modos se perdía un elevado número de animales problema. Nunca se pudo constatar si esa conducta era a causa de que los animales nacían muertos, o porque no controlaban bien la temperatura corporal y la madre los eliminaba aún estando vivos, o porque la Indometacina afectaba la conducta materna. Pero después de varias pruebas reduciendo la dosis de Indometacina administrada, fue posible encontrar cantidades relativamente seguras, que no permitían observar casos de canibalismo.

La selección de la amígdala para diseccionarla en animales recién nacidos también representó otro problema. Lo primero que se tuvo que encontrar fue la localización anatómica de las amígdalas en el cerebro de un ratón recién nacido, ya que los libros consultados sobre embriología del ratón no precisaban este dato y los atlas utilizados para cirugía estereotáctica no traían las imágenes de la localización de los núcleos de las amígdalas a esa edad. Fue entonces necesario probar que los animales de una semana de edad tenían ya núcleos celulares en la zona amigdalina y encontrar los niveles de corte cerebral que eran necesario practicar para poder llevar a cabo estudios histológicos preliminares. Todas estas pruebas fueron realizadas con la ayuda de especialistas en neurología. Nosotros reconocemos que faltaron experimentos cuyos resultados hubieran sido muy interesantes. Por



ejemplo, el sacrificio de embriones de ratón de 7 días de edad (cuando se inició la administración de la Indometacina a la madre) y el estudio histológico del cerebro para revelar el estado del desarrollo de las amígdalas a esa edad. Sin embargo, consideramos que esos objetivos no formaban parte del presente proyecto y podrían ser alcanzados más adelante con otros estudios.

Tomando en cuenta todos los resultados preliminares que se ha mencionado, se decidió que las amígdalas eran la porción del cerebro que resultaba más conveniente estudiar después de una exposición prenatal a la Indometacina, ya que en ella se encuentran núcleos de las células encargadas de controlar el comportamiento, principalmente las emociones y las respuestas de miedo y angustia.

Otro punto que tuvo que ser discutido antes de iniciar los experimentos fue si los animales recién nacidos debían ser estudiados tal cual estaban, unos expuestos a la Indometacina y otros no o, si debían ser estresados antes de darles muerte. Nosotros tomamos en cuenta que los LPS son toxinas de bacterias gram negativas que inyectadas al cuerpo representan un reto estresante y se decidió que todos los animales del experimento que fueron sacrificados debían recibir una dosis de LPS tres horas antes de su muerte. El estudio no incluyó grupos control de ratones recién nacidos, expuestos o no a la Indometacina, que no recibieron LPS. Todos los resultados por consiguiente han sido referidos como característicos de una población de ratones recién nacidos (expuestos o no a la Indometacina) que fueron estresados mediante una inyección con LPS. No formó parte de los objetivos establecer diferencias entre los estresados y los que no recibieron esa clase de estímulo. Las razones fueron de orden



económico, ya que el análisis de las muestras por microarreglo es costoso y no se pudo diseñar un modelo experimental para estudiar todas las variables. Se puede decir que los resultados de la presente tesis proporcionan una información que debe ser tomada como preliminar, ya que revela alteraciones que deben ser confirmadas y completadas más adelante. Por eso los resultados sugieren un efecto tóxico muy interesante, pero que debe ser confirmado.

Para tratar de solucionar algunos de los problemas o dificultades que representaba realizar una serie amplia de estudios por microarreglo, se procedió al diseño de experimentos por medio de los cuales se llevó a cabo una selección al azar de muestras de cerebro procedentes de diferentes ratones que habían sido paridos por diferentes madres. De este modo se arreglaron dos grandes grupos de muestras obtenidas de diferentes ratones de diferentes madres. Un primer grupo se obtuvo con muestras de las amígdalas de animales que habían estado expuestos prenatalmente a la Indometacina y el segundo grupo fueron muestras tomadas de animales que no estuvieron expuestos a ese mismo fármaco. Los dos grupos de animales habían sido estresados tres horas antes de morir. Las muestras de cada grupo se mezclaron aleatoriamente dando como resultado varios subgrupos, de los cuales solo fueron seleccionados dos (uno de cada grupo) para el estudio por microarreglo.

Desde el momento de la extracción de los cerebros se pudo observar a simple vista que existían diferencias entre los dos grupos de animales, el experimental y el control. Así por ejemplo, cuando se les administró el LPS por vía intraperitoneal, los ratones experimentales no se dejaban inyectar, pese a su tamaño, porque hacían movimientos bruscos con las



patas, a diferencia de los ratones control, los cuales no pusieron ningún tipo de resistencia. La Interleucina 1 es una molécula estresante que puede actuar a nivel del hipotálamo y estimula el eje hipotálamo-hipófisis- adrenales. Sin embargo, los animales de los dos grupos tenían los mismos pesos. Los animales enfermos o visiblemente con un comportamiento o color de la piel diferente al del resto fueron desechados.

El microarreglo reveló que en las muestras experimentales existía una serie de genes que se encontraban sobreexpresados o con una expresión disminuida con respecto al control. Se seleccionaron aquellos que presentaban dos desviaciones estándar por arriba y por abajo del control. Y de todos los genes, se escogieron solamente los que estaban relacionados con la producción de citocinas inflamatorias, principalmente IL-1 e IL-6. Con estos datos se buscaron las rutas metabólicas en las cuales están involucrados dichos genes. Se deja constancia, sin embargo, aunque esto no estuvo entre los objetivos del trabajo, que los resultados del microarreglo también mostraron una alteración importante en la expresión de una gran cantidad de genes relacionados con el desarrollo del sistema nervioso central y con el comportamiento. Estos resultados pueden ser motivo, más adelante, de otros estudios para aclarar si existe o no una relación entre los cambios en la conducta de los animales adultos y la administración prenatal de la Indometacina.

De entre los genes que se encuentran sobreexpresados, nos pareció interesante el de la proteína acopladora MyD88, porque participa en una vía de señalización que activa los factores de transcripción que se necesitan para aumentar la síntesis de una gran cantidad de citocinas pro-inflamatorias. MyD88 está relacionada con la respuesta de



protección ante patógenos y está relacionada con el receptor de la IL-1 y el TLR. Sin embargo, en este momento y con los resultados obtenidos, nosotros no podemos proponer ninguna relación entre la sobreexpresión del gene para MyD88 y alguna alteración en los mecanismos que participan en las reacciones inflamatorias y/o en el desarrollo embrionario del sistema nervioso central.



CONCLUSIONES

1. Las amígdalas de los ratones recién nacidos expuestos a Indometacina durante su desarrollo embrionario tienen más de 50 genes sobreexpresados \pm 2DS, en relación a los resultados obtenidos en las amígdalas de los ratones testigo.
2. De los genes sobreexpresados, 5 de ellos codifican para la síntesis de proteínas relacionadas con la inducción de la síntesis o el transporte citoplásmico de citocinas inflamatorias.
3. De los 5 genes relacionados con la síntesis de las proteínas proinflamatorias y que están sobreexpresadas a causa de la exposición prenatal a la Indometacina, el más importante es el gene de la proteína MyD88, una molécula acopladora de los receptores de IL-1 (IL-1R) y de los receptores parecidas a Toll (TLR). MyD88 forma parte de las vías de señalización que participan en la síntesis de varias citocinas inflamatorias.
4. Simultáneamente y como era de esperar, el microarreglo de los mismos mRNA obtenidos de las amígdalas de ratones expuestos a la Indometacina mostró una disminución en la expresión de los genes para ciclooxigenasa (COX).
5. Se observó que la conducta de los ratones recién nacidos que habían estado expuestos prenatalmente a la Indometacina (administrada a sus madres) era diferente a la de los ratones control, cuyas madres solo recibieron SSI. Los primeros animales



mostraban signos de irritabilidad y mayor motilidad que sus controles.

6. Aunque los resultados obtenidos son preliminares y deben ser confirmados antes de ser aceptados, todos ellos sugieren que la exposición a la Indometacina no es recomendable mientras no termine el desarrollo de los sistemas nervioso e inmune.



APENDICE I

Preparación de Soluciones

- **Amortiguador de Fosfatos (PBS)**

Fosfato de sodio monobásico.....2.622 g

Fosfato de sodio dibásico.....21.716g

- Solución A. (0.2 M) Fosfato de sodio monobásico.
Disolver el fosfato de sodio monobásico en 95 mL de Agua
- Solución B (0.2 M) Fosfato de sodio dibásico
Disolver el fosfato de sodio dibásico heptahidratado en 405 mL de Agua

Para obtener PB 0.1 M pH 7.4 mezclar:

- 95 mL de Solución A con 405 mL de Solución B y 500 mL de Agua
- Ajustar pH 7.2-7.4

→ PBS Amortiguador de Fosfatos Salina

Agregar 7.2 g de Cloruro de Sodio (NaCl) por litro de PB

- **Formaldehído**

PBS.....200 mL

Paraformaldehido puro.....8 g

Hidróxido de Sodio.....0.8g

- Agregar Paraformaldehido puro al PBS
- Calentar a 50 – 60°C con agitación continua
- Agregar Hidróxido de Sodio (NaOH) hasta disolución total



- Almacenar a 4°C

Nota: Preparar 1 día antes de utilizarse

- **Lipopolisacarido**

LPS Bacteriano de *E. coli* (serotipo 026: B6; Sigma)....5 µg

Medio RPMI1640 suplementado estéril (Gibco BRL)....1 mL

- Solubilizar y filtrar con membrana de 0.22 µm
- Guardar en congelación -20°C

- **Indometacina (INDO)**

Indometacina (Sigma).....3 mg

H₂O/Tween

1%.....3 mL

Es recomendable preparar la Indometacina el día de su uso y mantenerla en refrigeración.

- **Solución Salina Isotónica**

NaCl (Baker).....0.85 g

H₂O destilada.....100 mL

- Solubilizar y filtrar con membrana de 0.22 µm
- Guardar a temperatura ambiente.



APENDICE II

Material y Equipo

Perfusión de ratones recién nacido

- 7 ratones recién nacidos Balb/c
- Hilo
- Lámpara con lupa
- Base de vidrio
- Pinzas de disección
- Tijeras
- Probeta de 50 mL
- Piseta
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Maskin tape
- Parafilm
- Vaso de precipitados de 50 mL
- Pinzas mostaza
- Jeringas de 2 mL

Soluciones

- Solución de formaldehído al 10 %¹
- Solución buffer de fosfatos a pH 7.4

¹ Apéndice I



Extracción de Cerebros

- Lámpara con lupa
- Tijeras
- Pinzas de disección
- Espátula
- Vaso de precipitados de 100 mL

Soluciones

- Solución buffer de fosfatos pH 7.4²

Extracción de cerebros II

- Guantes estériles
- 100 Cajas petri estériles
- Alcohol
- Algodón
- Jeringas 31G 0.5 mL
- Navajas de un solo filo estériles
- Pinzas de disección
- Tijeras
- Espátula
- Viales estériles
- Gradillas
- Micropipetas
- Puntas estériles
- Bandejas para hielo
- Campana de Flujo laminar

² Apéndice I



Soluciones

- Lipopolisacarido¹
- Trizol



BIBLIOGRAFÍA

- ☑ Ahmed ST., Ivashkiv LB. Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and Stat activation by inflammatory and stress pathways. J. Immunol. 2000; 165: 5227-5237.
- ☑ Altman J, Bayer S. Atlas of prenatal rat brain development. CRC. 1995:
- ☑ Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN- γ receptor: a parading for cytokine receptor signaling. Ann. Rev. Immunol. 1998; 266: 1375 - 1377
- ☑ Bauer J, Ganter U, Geiger T, Jacobshagen U, Hirano T, Matsuda T, et al. Regulation of interleukin-6 expression in cultured human blood monocyte and monocyte derived macrophages. Blood. 1988; 72: 1.134 - 1.140
- ☑ Benítez L. Los Microarreglos de DNA y su aplicación clínica. Acta Médica Grupo Angeles. 2004. 125 - 126
- ☑ Berg J, Fellier H, Christoph T, Grarup J, Stimmeder D. The Analgesic NSAID Iornoxicam inhibits cyclooxygenase (COX)-1/-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and the formation of interleukin (IL)-6 in vitro. Inflamm. Res. 1999; Jul; 48(7): 369 - 379
- ☑ Bessler H, Mendel C, Straussberg R, Gurany N, Aloni D, Sirota L. Effects of dexamethasone on IL-1 β , IL-6 and TNF- α production by mononuclear cells of newborns and adults. Biol. Neonate. 1999; 75 (4): 225 - 233
- ☑ Betancur c, Borrel J, Guaza C. Cytokine regulation of corticosteroid receptors in the rat hippocampus: Effects of interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide. Neuroendocrinology. 1995; 62: 47 - 54



- ☑ Caldwell Ft Jr, Graves DB, Wallence BH. The effect of indomethacin on the cytokine cascade and body temperature following burn injury in rats. Burns. 1999; Jun; 25 (4): 283 – 294
- ☑ Chang S, Hee L, Seung H, et al. Microarray analysis of gene expression in chondrosarcoma cells treated with bee venom. Toxicon. 2005; 45: 81 - 91
- ☑ Chomarat P, Rissoan MC, Banchereau J, Miossec P. Interfeon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. J Exp Med. 1993; 177: 523 – 527
- ☑ Coulie PG, Vanhecke A, Van Damme J, Cayphas S, Poupart P, De Wit L et al. High – affinity sites for human 26 kDa protein (interleukin 6, B cell stimulatory factor -2, interferon \square 2) different from those of thpe I interferon (alpha, beta) on lymphoblastoid cells. Eur J Immunol. 1987; 17: 1435 – 1440
- ☑ De Waal Malegyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, De Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produce by monocytes. J Exp Med. 1991; 146: 3.444 – 3.451
- ☑ Dinarello CA, Wolff SM. The role of interleukin -1 in disease. N ENgl J Med. 1993; 328: 106 – 113
- ☑ Dongxu S, Ding A. MyD88-mediated stabilization of interferon- γ - induced cytocine and chemokine mRNA. Nat Immun. 2006; 7 (4): 375 - 381
- ☑ Dray A, Perkins M. Bradykinin and inflammatory pain. Trends Neurisci. 1193; 16: 99 – 104
- ☑ Du ZY, Li XY. Inhibitory effects of indomethacin on interleukine-1 and nitric oxide production in rat microglia in vitro. Int. J. Immunopharmacol. 1999; Mar; 21(3): 219 – 225



- ☑ Feldman M. Cooperación celular en la respuesta de anticuerpos. En: ROitt I. Inmunología. Londres: Salvat, 1994; 7: 1 -16
- ☑ Fiebich BL, Hofer TJ, Lieb K, Hull M, Butcher RD, Schumann G, Schulze-Osthoff K, Bauer J. The non-steroidal anti-inflammatory drug tepoxalin inhibits interleukin-6 and alpha1-antichymotrypsin synthesis in astrocytes by preventing degradation of IkappaB-alpha. Neuropharmacology.1999; Sep; 38(9): 1325 – 1333
- ☑ Fox J, Barthold S. The mouse in biomedical research. Normative biology, husbandry and models. American College of Laboratory. Animal Medicine Series. Elsevier. 2007; 2ª Ed: Vol. 3: 7
- ☑ Franklin KBJ, Paxinos G. The mouse brain in stereotaxis coordinates. San Diego, CA: Academic Press, 1997
- ☑ Fu – Chun H, Guo – Jun Z, Yogendra R, et al. Repeated neonatal handling with maternal separation permanently alters hippocampal GABA_A receptors and behavioral stress responses. PNAS. 2003; 100 (21): 12213 - 12218
- ☑ García MX, Kaski JC. Cardiopatía isquémica: marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular. Rev. Cubana Med. 2000; 39(2): 120 -140
- ☑ García Tamayo F. Fundamentos de Inmunología. Textos Universitarios. UNAM. México. 1997: 349 – 391
- ☑ Gauldie J, Richards C, Harnish D. Interferon beta/B cell stimulating factor type 2 shares identity with monocyte – derived hepatocyte stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. Proc Nat Acad Sci. 1987; 84: 7.251 – 7. 261
- ☑ Gauldie J, Richards C, Northemann W, Fey G, Baumann H. IFNb2/BSF2/IL -6 is the monocyte derived HSF that regulates



- receptor – specific acute phase gene regulation in hepatocytes.
Ann NY Acad Sci. 1989; 557: 46 – 57
- ☑ Gennaro A. Remington. Farmacia. Ed. Panamericana. 1999; 19 (2): 1843 -1844
 - ☑ Gersham W, Dianne M, O'Dell M, Eberwine H. Gene expression profiling in the amygdale: An approach to examine the molecular substrates of mammalian behavior. Physiol Behav. 2001; 73: 841 – 847
 - ☑ Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Mc Graw-Hill. 2001; 10 (1, 2): 697 – 706, 716 - 717
 - ☑ Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirato T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL -6 signal transducer, gp 130. Cell.1990; 63: 1.149 – 1.157
 - ☑ Hirano T, Taga T, Yamasaki K. A multifunctional cytokines, IL - 6/BSF -2 and its receptor. In: Proceedings of the 17th Symposium of the Collegium Internationale << Allergy and Inflammation>>. 1988: From Gene Cloning to the Clinical Parctice
 - ☑ Housby JN, Cahill CM, Chu B, Prevelide R, Brickford K, Stevenson MA, Calderwood SK. Non – steroidal anti-inflammatory drugs inhibit the expression of cytokines and induce HSP70 in human monocytes. Cytokine. 1999; May; 11 (5): 347 – 358
 - ☑ Ivashkiv LB. Cytokine expression and cell activation in inflammatory arthritis. Adv. Immunol. 1996; 63: 337
 - ☑ Katzung, B. Farmacología básica y clínica. Manual Moderno. México. 1999; 7: 681
 - ☑ Leary AG, Ikebuchi K, Hirai Y, Wong GG, Yang YC, Clark SC et al. Synergism between interleukin -6 and interleukin -3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells:



- Comparison with interleukin -1a. Blood. 1988; 71: 1.759 – 1.763
- ☑ Libby P, Warnen SJC, Friedman GB. Interleukin -1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induce the release of growth factor inhibitory prostanooids. J Clin Invest. 1988; 88: 487 – 498
 - ☑ Meller ST, Gebhart GF. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. Pain. 1993; 52: 127 – 136
 - ☑ Miyajima A, Kitamura N, Harada T, Yokata K, Arai K. Citocyne receptors and signal transduction. Annual Review of Immunology. 1992; 10: 295 – 331
 - ☑ Moore KW, O'Garra A, De Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin -10. Annu Rev Immunol. 1993; 11: 165 – 190
 - ☑ Moskowitz RW. Sustained-release indomethacin in the comprehensive management of osteoarthritis. Am J. Med. 1985; 25(79): 13 -23
 - ☑ Muraguchi A, Hirano T, Tang B, Matsuda T, Horii Y, Nakajima K et al. The essential role of B – cell stimulatory factor 2 (BSF -2/IL - 6) for the terminal differentiation of B – cells. J Exp Med. 1998; 67:332 – 344
 - ☑ Oh JW, Van Wagoner NJ, Rose – John S, Benveniste EN. Role of IL -6 receptor in inhibition of VCAM -1 gene expression. J Immunol. 1998; 161: 4992
 - ☑ Palkovits M, Brownstein M. Maps and Guide to microdissection of the rat brain.1988: 130, 134
 - ☑ Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier. 2005; 5° Ed.: 69 -70



- ☑ Piñol JF, Paniagua EM. Citocinas, gastritis crónica y *Helicobacter pylori*. Rev. Cubana Hematol Inmunol. Hemoter. 2000; 16 (3): 184 – 189
- ☑ Rainsford KD, Ying C, Smith FC. Effects of meloxicam, compared with other NSAIDs, on cartilage proteoglycan metabolism, synovial prostaglandin E2, and production of interleukins 1, 6 and 8, in human and porcine explants in organ culture. The Journal of pharmacy and pharmacology. 1997; Oct; 49 (10): 991 – 998
- ☑ Ramírez J, Chavez L, Santillan JL y Guzman S. Microarreglos de DNA. Mensaje Bioquímico. 2003; 23: 97 – 120
- ☑ Reyes García MG, García Tamayo F. La importancia de IL -6 como mediador de las interacciones neuroendocrinoinmunológicas. Acta Bioquim. Clin. Latinoamer.1993; 27: 333
- ☑ Roitt I. El complemento en: Inmunología. Cuarta Edición. Harcourt Brace. España. 1997: 13.1 – 13.16
- ☑ Sanchez – Navarro JP, Román F. Amígdala, corteza prefrontal y especialización hemisférica en la experiencia y expresión emocional. 2002; 20 (2): 223 -240
- ☑ Shinji M, Shinji T, Hironori U, et al. Induction of Claudin- 4 by nonsteroidal Anti-inflammatory drugs and its contribution to their chemopreventive effect. Cancer Res. 2005; 65 (5): 1868 - 1875
- ☑ Sironi M, Breviario F, Prozerpio P. IL -1 stimulates IL -6 production in endotelial cells. J Immunol. 1989; 142: 549 – 555
- ☑ Speziale N. Inflamación en: Margini RA. Inmunología e Inmunoquímica. Quinta edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1996: 435 – 472
- ☑ Takai Y, Wong GG, Clark SC, Burakoff SJ, Hermann SH. B cell stimulatory factor -2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. J Immunol. 1998; 140: 508 – 511



- ☑ Tan LR, Waxman K, Scannell G, Loli G, Grnager GA. Trauma causes early release of soluble receptors for tumor necrosis factor. J Taum. 1993; 34 (5): 634 – 638
- ☑ Tanaka K, Tanaka H, Kanemoto Y, Tsuboi I. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on immune fuctions of human peripheral blood mononuclear cells. Immunopharmacology. 1998; Nov; 40 (3): 209 – 217
- ☑ Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. Immunol Today. 1992; 13: 151 – 153
- ☑ Tracey KJ, Lowry SF, Fahey TJ III, Albert JD, Fong Y, Hesse D et al. Cachectin/tumour necrosis factor induces lethal shock and stress hormone response in the dog. Srug Gynecol Obstet. 1987; 164: 415 – 422
- ☑ Turbull AV, River CL. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal-Axis by Cytokines: Actions and mechanism of action. Physiological Rev. 1999; 79: 1 – 71
- ☑ Velasco, A et al. Farmacología Fundamental. Mc Graw-Hill. España. 2003: 621 - 623
- ☑ Wognum AW, Van Gils FC, Wagemaker G. Flow cytometric detection of receptors for interleukin -6 on bone marrow and peripheral blood cells of humans and Rhesus monkeys. Blood. 1993; 81: 2.036 – 2.043



DIRECCIONES EN INTERNET

- The EMBO Journal
http://www.nature.com/emboj/journal/v16/n5/fig_tab/7590092f4.html

- Proteins and Enzymes
<http://160.114.99.91/astrojan/prot2t.htm>

- The edinburgh mouse atlas Project
<http://genex.hgu.mrc.ac.uk/>