



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

“Expresión del RNA mensajero para IL-1 β y TNF- α en cicatriz hipertrófica posquemadura”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M. EN C. LUZ EUGENIA ALCANTARA QUINTANA

DIRECTOR DE TESIS : Dr. en IBB. Edgar Kröttsch Gómez

CÖMITE TUTORAL : Dr. en C. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Dr. en C. Rolando Hernández Muñoz

México, D. F.

JUNIO 2012



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de enero de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ALCANTARA QUINTANA LUZ EUGENIA** con número de cuenta **93269774** con la tesis titulada: **"EXPRESIÓN DEL RNA MENSAJERO PARA IL1 β Y TNF- α EN CICATRIZ HIPERTROFICA POSQUEMADURA"** realizado bajo la dirección del: **DR. EDGAR KRÖTZSCH GÓMEZ**

Presidente:	DR.	MARCO ANTONIO GERBÓN CERVANTES
Vocal:	DR.	LUIS ARTURO BAIZA GUTMÁN
Secretario:	DR.	ANDRES ELIU CASTELL
Suplente:	DRA.	TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
Suplente:	DR.	ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ

El Comité Académico aprobó que la integración del jurado se realizara a solicitud de la alumna, con **cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base en lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Sin otro particular, me es grato enviarme un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 01 de febrero de 2012

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas en donde realice mis estudios de maestría y doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca número 172575, y por el apoyo a través del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social # SALUD-2004-01-088.

A mi comité tutorial:

Dr. Marco Cerbón, Rolando Hernández y Edgar Krötzsch por su guía en la realización del trabajo.

DEDICATORIAS

A mi hija Hannya Barrón por sus sonrisas en los momentos de frustración

A mi familia por darme motivos suficientes para cumplir mis metas

A la M en C. Nayeli Rodríguez Fuentes y familia, por su amistad incondicional durante todos estos años

A mis amigos de toda la vida por siempre estar, en las buenas y en las malas

Al Dr. Marco Cerbón por ser un ejemplo de investigador y ser humano

A cada una de las personas que me tropecé en el camino de la realización de esta tesis, por que su apoyo me permitió al fin alcanzar esta meta

*“Si alguna vez no te dan la sonrisa esperada, sé generoso y da la tuya.
Porque nadie tiene tanta necesidad de una sonrisa, como aquel que no sabe
sonreír a los demás”*

Dalai Lama

**“Expresión del RNA mensajero para
Interleucina 1 β (IL-1 β) y Factor de
Necrosis Tumoral α (TNF- α) en cicatriz
hipertrófica posquemadura”**

I.	Resumen	1
II.	Abstract	2
III.	Introducción	3
	III.1.1 Proceso de Cicatrización Normal	3
	III.1.2 Fase Temprana	3
	III.1.3 Fase Intermedia	5
	III.1.4 Fase Tardía	6
	III.1.5 Fase Final	7
	III.2.1 Quemaduras	8
	III.2.2 Definición	8
	III.2.3 Etiología	8
	III.2.4 Pronóstico	8
	III.2.5 Extensión	8
	III.2.6 Cálculo de la Extensión	8
	III.2.7 Profundidad	9
	III.3.1 Secuelas o Proceso de Cicatrización Patológico	10
	III.4.1 Fibrosis	10
	III.5.1 Cicatrices hipertróficas y queloides	10
	III.6.1 Definición de la cicatriz hipertrófica	11
	III.7.1 Tratamientos para la Cicatriz Hipertrófica	12
	III.8.1 Colágenas	12
	III.8.2 Biosíntesis de la colágena	16
	III.8.3. Regulación génica de la colágena tipo I	16
	III.8.4. Control transcripcional del gen de la colágena COL1A1	16
	III.8.5. Control transcripcional del gen de la pro-colágena $\alpha 1$ (I)	17
	III.8.6. Control postranscripcional del gen de la pro-colágena $\alpha 1$ (I)	18
	III.8.7. Modulación de la expresión del gen de la colágena tipo I	19
	III.9.1. Citocinas pro-inflamatorias	21
	III.10.1. Interleucina 1β (IL- 1β)	21
	III.10.2. Desarrollo histórico	21
	III.10.3 Estructura de IL- 1β	22
	III.10.4 Determinación génica de IL- 1β	22
	III.10.5. Regulación de la expresión del gen	23
	III.10.6 Inducción de la síntesis de IL-1 por diferentes factores	24
	III.10.7 Mecanismo de Acción de IL1. Receptores de IL-1	24
	III.10.8 Señalización Canónica de IL- 1β	25

III.11.1. Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)	27
III.11.2 Desarrollo histórico	27
III. 11.3. Estructura del TNF- α	28
III.11.4. Determinación génica del TNF- α	29
III.11.5. Regulación de la expresión del gen	30
III.11.6. Inducción de la síntesis de TNF- α por diferentes factores	31
III.11.7. Mecanismo de Acción del TNF- α . Receptores de TNF- α	32
III.11.8. Señalización Canónica del TNF- α	34
III.11.9. Complejo de Señalización TNF Receptor 2	35
III.12. Complejo de Señalización TNF Receptor 1	35
IV. ANTECEDENTES. Papel de IL-1 β y TNF- α en cicatriz hipertrófica	36
V. Planteamiento del problema	42
VI. Justificación	42
VII. Hipótesis	43
VIII. Objetivo	43
IX. Metodología	44
IX.1. Obtención del material biológico	44
IX.2. Hibridación <i>In situ</i> para detectar a los ARN mensajeros	45
IX.3. Laminillas	47
IX.4. Análisis de datos	47
X. Resultados	48
X.1 . Pacientes	48
X.2. Análisis Histopatológico	50
X.3. Hibridación <i>in situ</i> para detectar a los ARN m de IL-1 β y de TNF- α	54
XI. Discusión	60
XII. Conclusiones	65
XIII. Perspectivas	66
XIV. Literatura Citada	67
XV. Apéndice	75

I. RESUMEN

Las quemaduras, hoy en día constituyen uno de los accidentes más frecuentes y graves en nuestro país; los pacientes requieren de atención especializada, rehabilitación y en algunos casos de reconstrucción tisular. Sus secuelas, como es el caso de la cicatriz hipertrófica posquemadura pueden causar graves deformidades y limitaciones funcionales. "La cicatriz hipertrófica", es una patología que se caracteriza por presentar un daño en la dermis profunda, combinado con una alteración en la expresión de los factores que conllevan a la cicatrización debida a la presencia del proceso inflamatorio crónico y a la existencia de una síntesis desproporcionalmente incrementada de colágena, además de presentar un aumento en la contracción o en la retracción cicatrizal. Dado lo anterior, gran parte de la investigación en salud se ha enfocado en el mejoramiento de los procesos de reparación, así como en evitar la formación de secuelas fibrosas y en favorecer la resolución de patologías fibrosantes dérmicas como la cicatriz hipertrófica. Está bien documentado que algunas citocinas llamadas profibróticas y/ ó proinflamatorias como la Interleucina 1 beta (IL-1 β), el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF) y el Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β) pueden estimular ó disminuir la producción de tejido conjuntivo dependiendo de la concentración y el tipo celular, así como de sus interacciones tisulares. Estos mediadores solubles inciden directamente sobre el fibroblasto promoviendo su proliferación. Estas citocinas son producidas en la piel, principalmente por macrófagos activados, pero también por otros tipos celulares como linfocitos activados, células endoteliales, queratinocitos, células del Langerhans y los mismos fibroblastos, que en conjunto inducen el recambio de la matriz extracelular (MEC). De particular interés resulta la IL-1 β , debido a su acción biológica sinérgica con TNF- α , a pesar de presentar diferencias estructurales. Dentro de estos efectos se encuentran la síntesis de prostaglandinas (PGE2), la expresión de moléculas de adhesión, la secreción de Interleucina 6 e Interleucina 8, y del Inhibidor del Activador del Plasminógeno-2 (PAI2). También regulan la síntesis de la enzima manganeso superoxidodismutasa (MnSOD), e inducen citotoxicidad y la disminución de la colágena a nivel transcripcional y traduccional.

En este trabajo se evaluó la expresión de los genes de IL-1 β y TNF- α , y su posible relación con la cicatriz hipertrófica posquemadura, mediante hibridación *in situ*, encontrando que la cicatriz hipertrófica posquemadura presenta un aumento en ambos genes, siendo solo significativo este aumento en el caso de IL-1 β cuando se compara con la piel normal.

En conclusión, nuestros resultados sugieren cual puede ser la causa de la formación de fibrosis en las secuelas posquemaduras. El exceso de síntesis de colágena podría deberse al aumento en la expresión en dichos genes, para los cuáles esta bien demostrado su sinérgismo y por tanto su contribución conjunta para degradar MEC, a pesar de que cada citocina por separado tiene un efecto contrario, o su efecto es dosis dependiente.

Estos datos indican una relación entre la alta expresión de los genes de IL-1 β y TNF- α y la presencia de fibrosis en los pacientes con la cicatriz hipertrófica posquemadura. Estos hallazgos nos abren un gran campo de posibilidades para el uso de estas citocinas como blanco terapéutico o bien el uso de medicamentos mediadores de ellas durante el proceso de cicatrización.

II. Abstract

Introduction: Post-burn hypertrophic scar tissue (HSc) is characterized by increased collagen synthesis, cellular growth and cell turnover. Its clinical characteristics exhibit aspects of chronic local inflammation, but the mechanism of its etiopathogenesis has not been clearly elucidated. In chronic skin inflammation, proinflammatory and profibrogenic cytokines play an important role in producing skin dysfunction. In this study, we examined changes in tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β mRNA expression and its presence in post-burn hypertrophic scars. Results obtained in normotrophic scar tissue (NSc) were compared to results obtained in normal skin (Ns).

Materials and Methods: Skin biopsies were obtained from 15 patients with (HSc) who presented burns on over 10% of their skin surface, more than a year post-injury. NSc were obtained from 17 patients who experienced scarring in optimal conditions. Ns were obtained from 11 patients who underwent cosmetic or reconstructive surgery. We performed histopathologic analysis with routine processing. TNF- α and IL-1 β mRNA expression levels on all three types of biopsy were obtained by *in situ* hybridization.

Results: TNF- α and IL-1 β mRNA expression was highly coordinated and was very similar in all the tissues processed and our histopathologic analysis yielded relatively low inflammatory infiltrate cell. But according to a semiquantitative analysis, TNF- α and IL-1 β mRNA expression was significantly increased in NSc and HSc when they were compared to normal skin.

Conclusions: These results suggest that there is a differential expression TNF- α and IL-1 β mRNA in post-burn HSc. Interestingly, the keratinocytes showed more expression of both cytokines compared to other cell types, which suggests that they may play an important role in post-burn skin repair processes.

III. INTRODUCCIÓN

III.1.1 Proceso de Cicatrización Normal

La cicatrización es un proceso de reparación de un tejido u órgano lesionado, dando como resultado final la formación de un aumento de colágena a lo que se le denomina cicatriz. En la piel la reparación cutánea se puede categorizar en tres formas: primaria, cierre primario; secundaria, por segunda intención; y terciaria, cierre primario tardío. Las heridas requieren de un incremento en energía y síntesis proteica por las necesidades locales del daño *per sé*, produciéndose un estado de hipermetabolismo sistémico y catabolismo. La cicatrización, se ha clasificado en fases, y cada una requiere de la anterior (Fig. 1).

III.1.2 Fase Temprana

Hemostasia: En una herida o lesión con salida de sangre de los vasos sanguíneos es esencial la formación de un coágulo que taponar los vasos lesionados. Los coágulos están formados principalmente de una malla de fibrina aunque también está la trombina, proteína responsable de catalizar la conversión del fibrinógeno en fibrina y plaquetas y glóbulos rojos. La formación de la fibrina constituye una matriz provisional que junto con la fibronectina (derivada de fibroblastos y células epiteliales) y la vitronectina (derivada del suero y las plaquetas) facilitan la unión de las células en migración. La trombina también estimula el aumento de la permeabilidad vascular, con lo que facilita la migración extravascular de células inflamatorias. Las plaquetas se agregan cuando se exponen a colágena, proceso facilitado también por la trombina. La adhesión plaquetaria entre sí, y la adhesión con colágena-fibrina incluye receptores de integrina en la superficie de las plaquetas, proceso que es mediado por cuatro glucoproteínas adhesivas: fibrinógeno, fibronectina, trombospondina y factor de von Willebrand. La agregación plaquetaria también induce la liberación de citocinas de los gránulos alfa colocalizados en el citoplasma de las plaquetas. Estas citocinas incluyen el Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas (PDGF), el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β), el Factor de Crecimiento Transformante α , (TGF- α), el Factor de

Crecimiento Fibroblástico (FGF), el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y el Factor de Crecimiento de Tejido Conjuntivo (CGF).

Inflamación: Inmediatamente posterior al daño, hay una intensa vasoconstricción que contribuye a la hemostasia. Esta es mediada por catecolaminas circulantes, el sistema nervioso simpático y por prostaglandinas liberadas de células lesionadas. Luego de 10-15 minutos es seguida por una vasodilatación, lo cuál resulta en eritema y calor. Aunado a lo anterior las prostaglandinas y la histamina inducen un aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos lo que produce edema. Junto con esto hay un aumento en la llegada de leucocitos al sitio de la lesión. Los principales leucocitos son los neutrófilos y los monocitos.

La vasodilatación, además de ser regulada por histamina y prostaglandina también lo es por leucotrienos y productos de células endoteliales. La histamina proviene de las células cebadas y directamente aumenta la permeabilidad vascular e indirectamente causa vasodilatación por estimular la síntesis de prostaglandinas. Las células cebadas también secretan leucotrienos, heparina, enzimas, metabolitos de prostaglandinas y factor de necrosis tumoral (TNF). Las prostaglandinas que inducen vasodilatación, son la PGE₁ y PGE₂, las cuales activan a la adenilato ciclasa con la subsecuente producción de adenosin monofosfato cíclico (AMPc). La actividad de la fosfolipasa induce la síntesis de las prostaglandinas. Los neutrófilos, que son las primeras células en llegar, limpian de cuerpos extraños y degradan mediante la acción de enzimas hidrolíticas y radicales de oxígeno. Luego de esta fagocitosis los neutrófilos son a su vez fagocitados por macrófagos. Los neutrófilos producen citocinas pro-inflamatorias, que estimulan a fibroblastos locales y queratinocitos. Los neutrófilos se multiplican en número entre las 24 y 48 horas luego del daño. Una vez que los monocitos migran al espacio extravascular son transformados en macrófagos por factores séricos y fibronectina. Los factores específicos que median la migración de los macrófagos son fragmentos de colágena, fibronectina y elastina (derivados de la matriz lesionada), elementos del complemento, trombina enzimáticamente activa y TGF- β .

Una vez en la matriz provisional, los macrófagos son activados por interleucina 2 (IL-2), interferón (INF, secretado de linfocitos T) y PDGF. Los macrófagos son muy importantes en el proceso normal de cicatrización, ya que fagocitan bacterias y tejido muerto, además producen elastasas y colagenasas que rompen la matriz extracelular dañada. Cuando los macrófagos son estimulados por endotoxinas bacterianas, promueven el reclutamiento de otras células que participan en la inflamación. Los macrófagos son una importante fuente de citocinas para estimular la proliferación de fibroblastos, síntesis de colágena y otros procesos de cicatrización. Entre las citocinas se encuentran el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), PDGF, TGF- β , TGF- α , interleucina 1 (IL-1), Factor de Crecimiento Insulinoide (IGF) y FGF. La última célula en el proceso de inflamación en aparecer es el linfocito, el cual produce factores esenciales para la cicatrización normal. Luego de 5 a 7 días, de la lesión, sólo algunas células que indujeron la inflamación están presentes en heridas con cicatrización normal y los fibroblastos llegan a ser la célula predominante.

III.1.3 Fase Intermedia

Los procesos involucrados aquí incluyen la angiogénesis, la epitelización y proliferación de fibroblastos. Procesos comprendidos entre los 2 a 4 días. Estos tres procesos precisan de un aumento de energía y de síntesis proteica.

Angiogénesis: Los bordes de las heridas, son isquémicos y sin la restauración de los vasos no hay O₂ y nutrientes suficientes. Esta fase se inicia en los primeros días y es inducido por el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), el cuál es angiogénico y liberado por los macrófagos. La angiogénesis se inicia con la formación de cúmulos de células endoteliales que forman yemas que paulatinamente coalescen y se unen a células mesoteliales para formar nuevos capilares. Este proceso se altera si hay exceso de inflamación, muerte tisular, exudado, mala perfusión o la presencia de corticoides.

Epitelización: Con la pérdida de la epidermis, las células basales empiezan su diferenciación y migración formando, inicialmente una sola capa. Los factores de crecimiento, tal como el EGF liberado por los macrófagos y plaquetas inician éste proceso, pero dicho proceso es limitado en extensión y la muerte tisular lo retarda. La máxima distancia que viajan los queratinocitos desde el borde de la lesión es de tres centímetros (cm) y es un proceso que puede demorar desde 3 a 5 días hasta meses o años. Una vez que se forma una sola capa el resto de los estratos se producen por mitosis. Esta sola capa se debe proteger de desecación ó destrucción por liberación de las proteasas de los neutrófilos en infección local u otro proceso inflamatorio.

Proliferación de fibroblastos: Dos días después de producida la herida los primeros fibroblastos provienen de tejidos adyacentes, posteriormente, los fibroblastos migran a través de filamentos de fibrina y de colágena recién formada. El proceso de proliferación de fibroblastos depende de un buen aporte de oxígeno y se ve afectado por una mala perfusión, pocos nutrientes, disminución en la actividad anabólica y los corticoides.

III.1.4 Fase Tardía

Síntesis de colágena y Matriz Extracelular: Esta fase se caracteriza por síntesis proteica con formación de colágena y matriz. Los fibroblastos son activados para producir factores de crecimiento y proteínas de matriz extracelular. El principal activador es el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), aunque se necesitan otras moléculas como la vitamina A que mantiene y restaura el estímulo inflamatorio para generar factores de cicatrización. La tasa de producción de colágena es máxima a las primeras dos semanas y el pico de su depósito es de 3 a 4 semanas.

La matriz intersticial es producida por los fibroblastos y otras células. Los proteoglicanos, compuestos de glucosaminoglucanos y proteínas. Esto genera una matriz más rígida en los estadios iniciales de la cicatriz, con la maduración de la misma disminuye su concentración con la consiguiente pérdida de rigidez. La disminución en la irrigación y malnutrición alteran este proceso.

Contracción: Es el proceso de cierre por movimiento de los bordes de la herida (no solamente epitelio) hacia el centro, esto encoge la herida. El mecanismo se lleva a cabo por generación de fuerzas por parte de elementos contráctiles de los fibroblastos (miofibroblastos) hacia el centro. Con esta contracción de fibroblastos, es liberada colágena y proteoglucanos, asegurando un nuevo tejido en el lugar afectado.

III.1.5 Fase Final.

Remodelación: Empieza a las tres semanas y puede durar hasta meses o años y es el resultado de:

- aumento de uniones en las colágenas: da fuerza tensil.
- acción de colagenasa: rompe exceso de colágena, creando un equilibrio.
- regresión de red exuberante de capilares en la lesión.
- disminución de proteoglucanos y por consiguiente disminuye la concentración de agua.
- La disminución del flujo sanguíneo o la infección aumentan la pérdida de colágena, con la consiguiente debilidad de la cicatriz. El incremento en la fuerza tensil de la cicatriz, continua aumentando por un año, sin embargo la piel nunca recupera la totalidad de la fuerza tensil ⁽¹⁾.

Chiappe A., 2004).

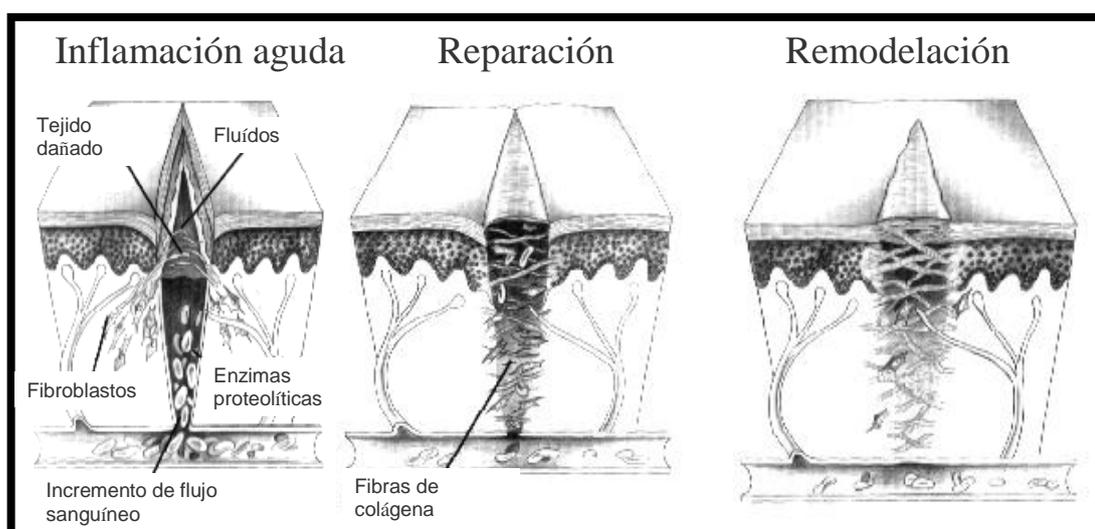


Fig. 1. Fisiología de la cicatrización. El esquema muestra las tres fases principales en las que se ha dividido el proceso cicatrizante normal.

III.2.1 Quemaduras

Las lesiones por quemadura son un problema de salud en nuestro país, y tienen múltiples facetas que se deben analizar a fin de darlas a conocer al público en general y a las autoridades del Sector Salud, para que al tener un diagnóstico preciso, se plantee una solución ^{(2, Pimentel., 2000).}

III.2.2 Definición: Las quemaduras son las lesiones de los tejidos orgánicos causadas por cualquier agente que origine una variación térmica local, bien sea física, química o biológica. Su gravedad variará de acuerdo a su extensión, profundidad y localización.

III.2.3 Etiología: Existen diferentes tipos de agentes productores de quemaduras, los cuales podemos dividir en:

- Físicos: Pueden ser térmicos (fuego directo, gases, sólidos y líquidos), eléctricos o radiantes (sol, rayos X, energía atómica).

-Quirúrgicos: Cáusticos como los álcalis o los ácidos.

-Biológicos: Tales como insectos, peces eléctricos o bacterias.

III.2.4 Pronóstico: Existen factores de orden general que inciden en el pronóstico de la quemadura como son, la extensión, el agente causal, la edad, la existencia de enfermedades preexistentes y de otras lesiones relacionadas con el accidente. La localización de quemaduras profundas en áreas como la cara, manos, pies, genitales y pliegues de flexión, deben ser tratadas con especial interés dadas las secuelas que pueden sobrevenir, así sean de poca extensión ^{(3, Hoyos-Franco et al., 2006).}

III.2.5 Extensión: Es de suma importancia determinar con la mayor exactitud posible la extensión de la superficie corporal que compromete la quemadura. De la extensión, como de la profundidad y edad del paciente, dependerá el pronóstico vital del accidente, y proporciona un estimado de la cantidad de líquido que debe administrarse al paciente en su tratamiento.

III.2.6 Cálculo de la extensión: En la práctica, el método más comúnmente utilizado es la llamada "Regla de los Nueve", que divide la superficie corporal en nueve o múltiplos de nueve, que varían según el desarrollo del individuo, desde la infancia hasta la edad adulta.

III.2.7 Profundidad: Las quemaduras son clasificadas según su profundidad, para lo cual se han creado métodos muy precisos, pero complicados en la práctica ^(4, Beato et al., 2001). Una clasificación aceptada es la siguiente: ^(5, Ferrada, 2000).

Tabla 1. Clasificación de quemaduras.

LESIÓN	SECUELAS	PROFUNDIDA HISTOLÓGICA
Primer grado Tipo A Superficiales	LEVE: No deja secuelas o secuelas estéticas MODERADA: hipo o hiperpigmentación	Epidermis
Segundo grado Tipo A-B Intermedia	MODERADA: Secuelas estéticas mínimas GRAVES: Secuelas importantes estéticas y funcionales	Dermis
Tercer grado Tipo B Profundas	GRAVES: Secuelas importantes estéticas y funcionales CRÍTICAS: Mutilación de órganos y estructuras profundas	Subcutáneo

III.3.1 Secuelas o Proceso de Cicatrización Patológico

Las quemaduras pueden originar secuelas cuya gravedad funcional o estética llegan a superar la propia quemadura. Se evitan con un tratamiento adecuado en la fase aguda, además se pueden usar injertos precoces y/o férulas funcionales en áreas especiales.

III.4.1 Fibrosis

La fibrosis es un proceso reparativo normal que ocurre tras el daño tisular. En una reparación normal la fibrosis se inicia cuando los fibroblastos infiltran el área dañada, proliferan y sintetizan matriz extracelular. Esta reestructuración del tejido da lugar a la cicatrización y a una terminación ordenada de la respuesta fibrótica. Sin embargo, en enfermedades fibróticas cutáneas, como la formación de la cicatriz hipertrófica o de la cicatriz queloide, no termina de manera ordenada y resulta en el desplazamiento del tejido funcional normal por una cantidad excesiva de matriz extracelular.

III.5.1. Cicatrices hipertróficas y queloides

La diferencia entre la cicatriz hipertrófica y la cicatriz queloide radica en el carácter invasivo que tiene esta última, sin embargo en la práctica clínica se habla de cicatrices queloides en general, pues la gran mayoría de las veces es difícil establecer la diferencia entre ellas. Por otro lado, es de importancia fundamental realizar un buen diagnóstico ya que el tratamiento a seguir es totalmente diferente. En la tabla 2 se enlistan las diferencias que existen entre ambos tipos de cicatrices ^{(6, Andrades et al., 2006).}

Tabla 2. Diferencias entre las cicatrices patológicas.

	Cicatriz Queloide	Cicatriz Hipertrófica
Genética	Predilección familiar	Menor asociación familiar
Raza	Negros y Orientales	Menor asociación con raza
Sexo	Mujeres más que hombres	Igual en mujeres y hombres
Edad	Entre 10 y 30 años	A cualquier edad
Bordes	Sobrepasa los bordes originales de la lesión	Se mantiene dentro de los límites de la lesión
Inicio	Tardía post-cirugía	Temprano post-cirugía
Curación Espontánea	No se resuelve con el tiempo	Puede resolverse espontáneamente en períodos menores a un año
Localización	Cara, orejas, tórax	Sin predilección
Etiología	Causa de un proceso inflamatorio crónico con trasfondo genético	Causa de un proceso inflamatorio crónico
Cirugía	Empeora	Mejora

III.6.1 Definición de Cicatriz Hipertrófica

A la **cicatriz hipertrófica (HSc, hypertrophic scars)**, se le ha definido como una patología de origen post-traumático, que se caracteriza por presentar un daño en la dermis profunda combinado con una alteración en los factores que conllevan a la cicatrización debido a la presencia del proceso inflamatorio crónico. Se sintetizan un exceso de componentes de matriz extracelular (MEC) predominantemente colágena, además de presentar un incremento en la contractilidad, participando diferentes tipos celulares, factores de crecimiento, quimiocinas y proteasas.

III.7.1 Tratamientos para la Cicatriz Hipertrófica

En nuestro país en las instituciones de salud, las cicatrices hipertróficas son tratadas con dos métodos que han demostrado su eficiencia clínica exhaustivamente: los corticosteroides y la presión continua (presoterapia). Ellos deben ser usados, preferiblemente, de forma simultánea. La inyección de corticosteroides (triamcinolona-betametasona), debe realizarse, en lesiones pequeñas, procurando practicarla dentro de la lesión (intralesional), hasta que ella tome una coloración blanquecina. Si se hace en el tejido subcutáneo, puede provocar una atrofia de éste. Se recomienda administrar 0.2 ml por cm² de cicatriz. No se debe exceder de un mililitro por vez. Especial cuidado se debe tener con pacientes con infecciones fungosas, glaucoma o trastornos menstruales. La frecuencia debe ser de una o dos veces al mes, según la evolución y gravedad de la lesión y hasta que la cicatriz clínicamente desaparezca. La presión continua (Presoterapia) sobre la cicatriz se puede lograr bien con el uso permanente y continuo de adhesivos antialérgicos de papel en pequeñas cicatrices, o bien mediante la confección de prendas de lycra ajustadas a la zona a tratar (caretas, guantes, mentoneras, shorts, chalecos, etc.) los cuales son elaborados en talleres que se dedican a esta finalidad. Ellas pueden ser usadas solas o complementadas con almohadillas de silicón o gama espuma, elaboradas de acuerdo al caso y para lograr una presión más eficiente. Su uso también se extenderá según la evolución de la cicatriz. También se usa la extirpación quirúrgica combinada con la radioterapia pre, peri y post operatoria, aunque este tratamiento es riesgoso y puede provocar una cicatriz mayor ^{(7, Salem et al., 2002).}

Nuestro grupo de trabajo ha probado el uso de colágena-polivinilpirrolidona como tratamiento para la cicatriz hipertrófica, sugiriendo que este medicamento puede modular el intercambio de la matriz extracelular, predominantemente colágena y bloquear la progresión de esta patología ^{(8, Krötzsch, et al., 1998).}

III.8.1 Colágenas

Forman una familia de proteínas que se localizan todos los organismos pluricelulares, siendo las proteínas más abundantes en el caso de los vertebrados, en donde representan aproximadamente el

30% de las proteínas totales. Los miembros de esta familia se encuentran ampliamente distribuidas en el organismo, ya que constituyen el principal elemento de la matriz extracelular de la piel, los huesos, los tendones, el cartílago, los vasos sanguíneos, los dientes, la cornea y el cristalino del ojo ⁽⁹⁾,

Edward y Steffen, 1982).

De manera general, las moléculas adoptan una conformación triple helicoidal que resulta de la asociación de tres cadenas polipeptídicas, lo que determinará la distribución, función y estructura del tipo de colágena resultante. A la fecha se conocen 30 tipos de colágenas que se clasifican de acuerdo a sus características estructurales en cuatro grandes grupos ^(10, Burgerson y Olsen, 1990).

- **Grupo 1:** 3 dominios helicoidales interrumpidos con el triplete Gly-X-Y
- X y Y son prolina e hidroxiprolina frecuentemente
- Sintetizadas como precursores solubles pro-colágenas
- Procesamiento proteolítico
- I, II, III, V, XI
- **Grupo 2:** 3 dominios helicoidales con extendidos con el triplete Gly-X-Y
- Variaciones en la secuencia Gly-X-Y, forma globular
- Sintetizadas como precursores solubles pro-colágenas
- Procesamiento proteolítico
- IV y VII
- **Grupo 3:** 3 dominios helicoidales cortos y continuos, con el triplete Gly-X-Y
- Sintetizadas como precursores solubles pro-colágenas
- Procesamiento proteolítico
- VI, VIII, X
- **Grupo 4:** 3 dominios helicoidales con el triplete Gly-X-Y; interrumpidas, asociadas a fibrillas
- No sintetizadas como precursores solubles, maduras
- IX, XII, XIV

Existe otra clasificación de acuerdo a su distribución y forma de fibrilla, (¹¹, Alberts B, et al., 2002; Tabla 3)

Tabla 3. Clasificación de los diferentes tipos de colágena.

	Tipo	Forma Molecular	Forma polimerizada	Distribución Tisular
FORMA FIBRILAR	I	$[\alpha 1 (I)]_2$, $[\alpha 2 (I)]$	fibrilla	Hueso, Piel tendones, ligamentos, cornea, órganos internos (90% de la colágena de todo el cuerpo)
	II	$[\alpha 1 (II)]_3$	fibrilla	Cartílago, disco intervertebral, notocorda, humor vítreo del ojo,
	III	$[\alpha 1 (III)]_3$	fibrilla	Piel, vasos sanguíneos, órganos internos con la tipo I.
	V	$[\alpha 1 (V)]_2$, $[\alpha 2 (V)]$	Fibrilla con la tipo I	Con la tipo I
	XI	$[\alpha 1 (XI)]$, $[\alpha 2 (XI)]$, $[\alpha 13 (XI)]$	Fibrilla con la tipo II	Con la tipo II
ASOCIADA A FIBRILLAS	IX	$[\alpha 1 (IX)]$, $[\alpha 2 (IX)]$, $[\alpha 3 (IX)]$, con fibrillas tipo II.	Asociación lateral	Cartílago
	XII	$[\alpha 1 (XII)]_3$, con fibrillas tipo I.	Asociación lateral	Tendones, ligamentos, algunos otros tejidos

FORMANDO REDES	IV	$[\alpha 1 (IV)]_2, \alpha 2$ IV	Redes	Lámina basal
	VII	$[\alpha 1 (VII)]_3$	Anclando fibrillas	Debajo del epitelio escamoso estratificado

III.8.2. Biosíntesis de la colágena

La primera colágena caracterizada fue la tipo I, y es la más abundante en el organismo. A nivel estructural forma fibrillas de 300 nm de largo y de 1.5 nm de diámetro, es un heterotrímero con 2 cadenas α_1 y una cadena α_2 . Cada cadena α tiene 1050 residuos de aminoácidos. En términos generales en la figura 2 se resume todo el procesamiento por el cuál pasa la colágena tipo I para depositarse en la matriz extracelular en forma de fibra. En un inicio se secreta en forma de pro-cadenas, y necesita de los procesos post-traduccionales como la hidroxilación y glucosilación para formar las triples hélices de la pro-colágena y ser secretadas al citosol. Una vez en citosol ahí sufre un procesamiento proteolítico para liberarse de los telopéptidos y formar las fibrillas, las cuáles se ensamblarán y formarán las fibras colagénicas.

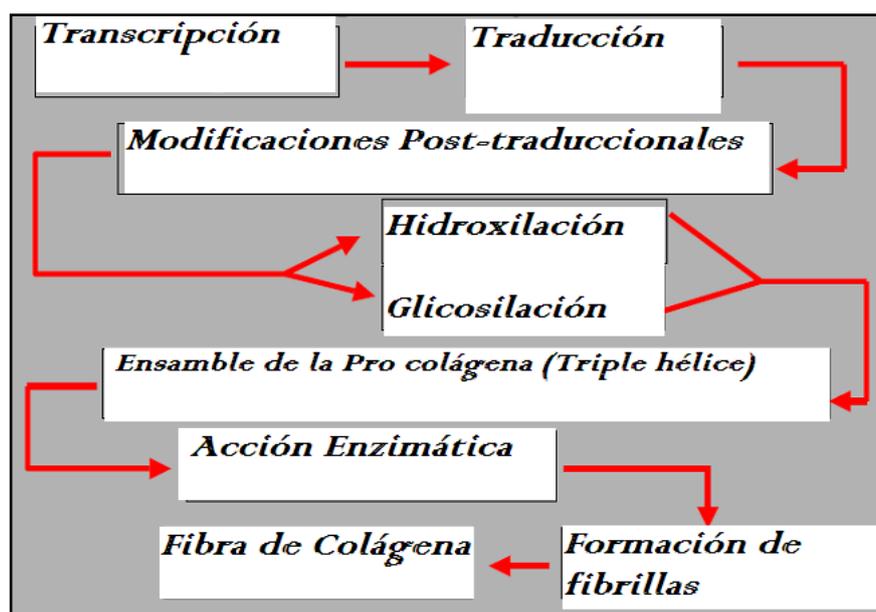


Fig. 2. Biosíntesis de la colágena tipo I. Se muestra la formación de fibras de colágena.

III.8.3. Regulación génica de la colágena tipo I

La codificación génica de la colágena tipo I se lleva a cabo por los genes COL1A1 y COL1A2, los cuáles son regulados de forma coordinada debido a que sus productos deben ser sintetizados en una relación 2 a 1, para posteriormente formar el heterotrímero $[\alpha_1(I)]_2, [\alpha_2(I)]$.

El gen COL1A1 tiene un tamaño de 18 Kb, se localiza en el cromosoma 17 en el locus q 21.3 al q 22 y se encuentra organizado en 51 exones distribuidos de la siguiente manera, los primeros 6 codifican para el propéptido amino terminal, los exones del 7 al 47 para el dominio central que conforma la triple hélice y los exones del 48 al 51 codifican para el dominio propéptido carboxilo terminal (Fig. 3).

El gen COL1A2 se localiza en el cromosoma 7, locus q22.1 y también consta de 51 exones distribuidos de la misma forma (Fig. 3).

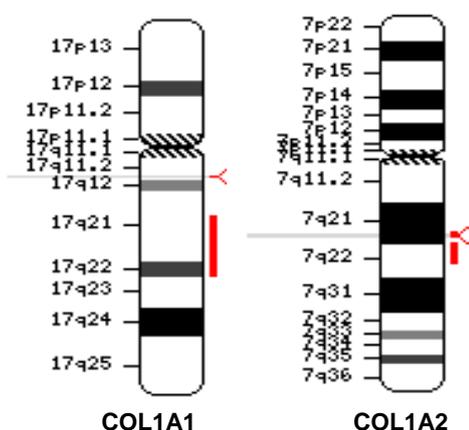


Fig. 3. Distribución cromosómica de los genes que codifican para la colágena tipo I.

III.8.4 Control transcripcional del gen de la colágena COL1A1

Entre los elementos reguladores en **cis** (secuencias promotoras) y elementos reguladores en **trans** (factores de transcripción) que regulan a los genes de la colágena tipo I, se encuentran: en cis, la región promotora del extremo 5', en el primer exón y en el primer y quinto intrón; mientras que entre los principales factores transcripcionales que **incrementan** la expresión del gen COL1A1; se encuentra el factor de unión a la secuencia CCAAT (**CBF**) que se une a la región -174 a -50 del

promotor, y la proteína de especificidad 1 (**SP1**, Saiita et al, 2000) así como el factor nuclear 1 (**NF-1**, Vuorio et al, 1990) que se une a la región -138 a -77 del promotor COL1A1. En contraste dentro de los factores que regulan *negativamente* la expresión del gen, se encuentran las subunidades **p50**, **p65** y **c-Rel** del factor de transcripción nuclear κ B (**NF- κ B**) y el Factor de Necrosis Tumoral α (**TNF- α**) que se unen al promotor de COL1A1 ^{(12, Hernández-Nazara et al, 2005).}

III.8.5. Control transcripcional del gen de la pro-colágena α 1 (I)

Dentro del control transcripcional del gen de la pro-colágena α 1 (I) destaca la secuencia completa del promotor de rata descrito por ⁽¹³⁾ Lichter *et al* en 1989. Este promotor tiene una secuencia aproximada de 3.6 kb. Existe un alto grado de homología entre las secuencias humanas y murina ^{(14, Harbers et al, 1984; 15, Chu et al, 1985).} La secuencia de bases de este promotor también guarda cierta semejanza con los promotores de otros tipos de colágena ^(16, Liau et al. 1985). El promotor de la procolágena α 1 (I) presenta una secuencia **TATA** localizada de 20 a 30 pb por encima del origen de transcripción. Entre -130 y -80 se localizan dos motivos **CCAAT** ^(17, Rossow et al. 1987; 18, Karsenty y De Crombrugge. 1991). Dentro de las 300 pb del promotor cercanas al origen de transcripción también existen varias secuencias ricas en **GC** (existe una también dentro del primer exón del gen) ^(17, Rossow et al, 1987; 18, Karsenty y De Crombrugge, 1991).

Hace más de una década se descubrieron numerosos factores de transcripción que modulan la síntesis del ARN (ácido ribonucleico) mensajero de la pro-colágena α 1 (I). Entre estos descubrimientos destacan los de ⁽¹⁸⁾ Karsenty y de Crombrugge (1991), quienes utilizaron una región corta del promotor de la colágena α 1 (I) murino (-222 a -80) y describieron otros sitios de unión a factores de transcripción.

El factor **CBF** se une a los motivos CCAAT. Un segundo factor, **IF-1**, se une a dos secuencias ricas en GC situadas entre -190 y -170 y entre -160 a -130. El tercer factor, **IF-2** reconoce una región de 12 pb formadas fundamentalmente por pares GC y localizadas entre los dos motivos CCAAT. La unión de IF-2 está inhibida por CBF, y tanto IF-1 como IF-2 son inhibidores transcripcionales, mientras que CBF actúa activando el promotor de la colágena α 1(I).

En extractos nucleares de fibroblastos NIH 3T3 se ha identificado un nuevo factor que se une a la secuencia localizada entre -339 y -361 del promotor de la colágena $\alpha 1$ (I) de ratón. Cuando se introduce una mutación en tres pares de bases de este elemento promotor, la actividad de la transcripción se incrementa hasta cuatro veces, lo cual indica que se trata de un elemento regulador negativo. Además, este factor nuclear sólo está presente en líneas celulares productoras de colágena tipo 1, por lo que es posible que esté implicado en la regulación del gen $\alpha 1$ (I) específica de algunos tejidos ^{(19, Ravazzolo et al. 1991).}

En el promotor de la colágena $\alpha 1$ (I) existe un sitio AP-1 que se une el complejo fos-jun. Este sitio AP-1 es contiguo, pero no se solapa, con el elemento de respuesta a vitamina D (VDRE). Ambos elementos reguladores se encuentran aproximadamente a -2900 pb del origen de la transcripción ^{(20, Owen et al, 1990).}

Recientemente se está investigando la posibilidad de otras regiones reguladoras importantes muy alejadas del inicio de la transcripción. ⁽²¹⁾ Ritzenthaler *et al* (1991) han descrito elementos activados por el TGF- β en distintas posiciones del promotor de la procolágena $\alpha 1$ (I) de rata (-1600, -2300, -290). Estas secuencias se asemejan a las reconocidas por el factor NF-1.

La región central del primer intrón presenta gran capacidad moduladora de la transcripción. En ella aparecen cuatro sitios consenso de 10 nucleótidos capaces de unir el factor de transcripción SP1 de la ARN polimerasa II, varias secuencias ricas en GC (que también podrían unir SP1) y una secuencia intensificadora del núcleo (core), común a muchos elementos virales y celulares, cuya función es desconocida ^{(17, Rossow et al, 1987; 22, Bornstein et al, 1987).}

III.8.6. Control postranscripcional del gen de la pro-colágena $\alpha 1$ (I)

Además del control transcripcional, existe la posibilidad de que participen mecanismos postranscripcionales en la biosíntesis de la colágena. Esto explicaría que a veces la cantidad de colágena tipo 1 sea mucho menor que la que correspondería en función de los niveles de su ARN mensajero. Además, fragmentos de la región amino terminal (sin triple hélice) de la cadena de pro-

colágena $\alpha 1$ (I) inhiben selectivamente la traducción del ARN mensajero de colágena en fibroblastos *in vitro* (23, Paglia *et al*, 1979).

También se ha especulado con la posibilidad de una regulación de la síntesis de la colágena mediante la alteración de la estabilidad del ARN mensajero de la pro-colágena $\alpha 1$ (I), dependiendo de la proporción entre sus dos formas distintas de poliadenilación o mediante variaciones en el procesamiento del ARN mensajero (24, Bornstein y Sage, 1989).

III.8.7. Modulación de la expresión del gen de la colágena tipo I por distintos factores

Los cambios en la síntesis de la colágena tipo I ocurren en el periodo de desarrollo embrionario, durante la regeneración de heridas y en procesos fibróticos de distintos tejidos.

Experimentalmente, la síntesis de colágena tipo I puede alterarse por numerosos factores, como citocinas, factores de crecimiento, proteínas codificadas por oncogenes, por segundos mensajeros intracelulares, etc., (Fig. 4). Sin embargo, los mecanismos concretos de acción por los cuáles estos agentes modulan la producción de colágena son en la mayoría desconocidos.

Entre las citocinas y factores de crecimiento que tienen un papel importante en la modulación de la síntesis de colágena tipo I durante la fibrogénesis se encuentran el TGF- β , la IL-1, el IFN- γ y el TNF- α .

El TGF- β es un factor de crecimiento sintetizado por linfocitos y plaquetas activadas, células de Küpffer, fibroblastos dérmicos, miofibroblastos y por otros tipos celulares (25, Meyer *et al*, 1990). Se ha

descrito la producción de TGF- α y de TGF- β por miofibroblastos derivados de lipocitos en cultivo (26, Bachem *et al*, 1992).

El efecto del TGF- β sobre la colágena tipo I se produce mediante el aumento de la transcripción de sus genes (27, Kahari *et al*, 1990; 21, Ritzenthaler *et al*, 1991; 28, Armendariz-Borunda *et al*, 1992).

Este efecto estimulante del TGF- β desaparece con TNF- α , IFN- γ y con IL-1 (29 Daireaux *et al*, 1990; 27 Kahari *et al*, 1990).

La IL-1 es una citocina con efectos proliferativos capaz de disminuir la producción de colágena. Esta proteína disminuye los niveles de ARN mensajero de la pro-colágena $\alpha 1$ (I) en fibroblastos humanos (30, Solís-Herruzo *et al*, 1988), es posible que esta citocina también ejerza una regulación postranscripcional (31,

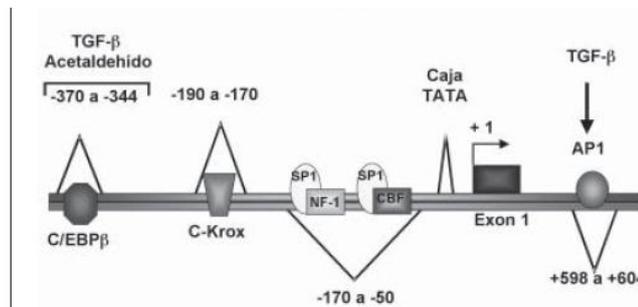
Mauviel *et al*, 1991; 28, Armendáriz-Borunda *et al*, 1992). Al igual que la IL-1, el IFN- γ (citocina producida por linfocitos

activados) inhibe la síntesis de colágena en numerosos tipos celulares ^{(32, Smith *et al*, 1987; 33, Nanes *et al*, 1989).}

Probablemente la inhibición del IFN- γ tenga lugar a nivel postranscripcional por desestabilización del ARN mensajero. El TNF- α , citocina producida principalmente por monocitos-macrófagos disminuye la transcripción génica de la colágena $\alpha 1$ (I), los niveles de su ARN mensajero y la producción de colágena en fibroblastos humanos, en lipocitos y en otras líneas celulares. También se ha descrito una disminución de la actividad del promotor del gen de la pro-colágena $\alpha 1$ (I) en fibroblastos tratados con TNF- α .

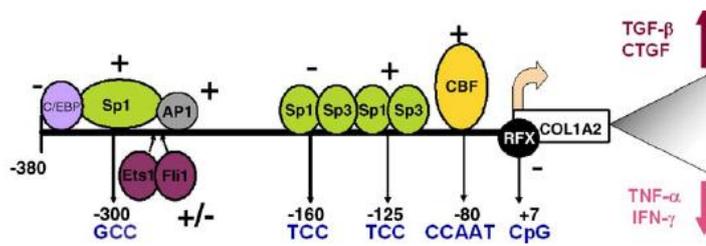
Los efectos inhibidores de la transcripción que poseen el TNF- α , la IL-1 y el IFN- γ , están probablemente mediados por segundos mensajeros como el AMP cíclico, el calcio intracelular y por proteínas reguladoras de la transcripción. En concreto, la movilización del Ca^{2+} intracelular con un ionóforo (A23187) en fibroblastos humanos disminuye la producción de colágena, posiblemente mediante la inhibición de su síntesis ^{(34, Flaherty y Chojkier, 1986).} El AMP cíclico también reduce la producción de la colágena ^{(35, Perr *et al*, 1988).} Sin embargo, el papel que estos, y otros muchos mediadores (Hormona paratiroidea ó PTH, vitamina D, esteroides anti-inflamatorios, prostaglandinas, EGF, PDGF, etc.) desempeñan en la síntesis de la colágena está aun por dilucidar.

COL1 A1
Cromosoma 17
51 exones



Relación 2:1

COL1 A2
Cromosoma 7
51 exones



II.9.1. Citocinas pro-inflamatorias: Las citocinas son mediadores peptídicos intercelulares que regulan la homeostasis y las reacciones de defensa del hospedador. Se producen por muchos tipos celulares y tienen un amplio espectro de efectos en procesos inflamatorios y reparadores. Esta pleiotropía se debe al hecho de que una citocina dada puede tener múltiples efectos en el crecimiento y diferenciación de muchos tipos celulares. Por ellos, las citocinas pueden presentar efectos biológicos que se solapan, o efectos biológicos muy similares mediante la producción de otra u otras citocinas que disparen la misma cascada. Los beneficios de esta redundancia y las actividades interdependientes no están todavía claras.

III.10.1. Interleucina 1 β (IL-1 β)

III.10.2. Desarrollo histórico: Interleucina 1 (IL-1) fue una de las primeras citocinas descritas, como inductor de fiebre, inductor de la proliferación de linfocitos y de células de médula osea y causante de la degeneración de las articulaciones. Al mismo tiempo se le conoció bajo otros nombres como pirogéno endógeno, factor activador de linfocitos, hematopoyetina-1, factor de células mononucleares, entre otros nombres. En 1984, se confirmó que la interleucina 1, eran dos diferentes proteínas llamadas ahora Interleucina 1 α (IL-1 α) e Interleucina 1 β (IL-1 β). IL-1 es una citocina muy relacionada a el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), sin embargo su estructura y receptores son claramente diferentes. IL-1 es biológicamente activa en cantidades que van de picomolares a femtomolares, y participa en homeostasis, regulación hormonal, metabolismo, regulación de la temperatura y presión sanguínea.

Actualmente la triada de IL-1, incluye a IL-1 α , IL-1 β e IL-1a (antagonista); son polipeptidos de 17 a 20 Kda que tienen un amplio rango de actividades biológicas, sintetizados como precursores de 30 Kda, pierden la secuencia líder hidrofóbica y son liberadas de las células por un mecanismo aun no completamente entendido, pero el cuál posiblemente involucra apoptosis ^(36, Nicola, 1997). Cada uno de los integrantes de esta triada son codificados por genes diferentes pero localizados en el mismo cromosoma, el 2.

III.10.3 Estructura de IL-1 β : IL-1 β es sintetizada primeramente como una preproteína de 30 Kda, perdiendo a su secuencia líder por la proteasa ICE, por sus siglas en inglés (IL-1 β converting enzyme), su forma madura es de 17Kda. Es secretada por células mononucleares, en los humanos es secretada hacia la circulación, con varios mecanismos de transporte descritos, vía exocitosis. Un simple cambio en la IL-1 β humana en la arginina 127 por glicina resulta en la pérdida de 100 veces la pérdida de su actividad biológica en las células T sin disminuir su unión ligando-receptor ^(37, Gehrke *et al*, 1990). La estructura tridimensional de IL-1 β consiste en una estructura tetrahédrica, compuesta de un núcleo compacto y de cadenas β plegadas, mejor conocida como estructura β -trefoil (Fig.5).

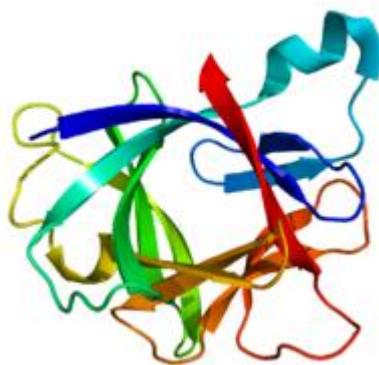


Fig. 5. Estructura tridimensional de Interleucina 1 β .

III.10.4 Determinación génica de IL-1 β

El gen de IL-1 β humano se localiza en el cromosoma 2, con aproximadamente 7.5 kb en la región 2q13-2q21, conformado por 7 exones y su ARN mensajero consiste en 1.6 kb. Los genes de IL-1 α y de IL-1 β parecen estar relacionados por duplicación. El gen del antagonista IL-1ra se encuentra en el mismo cromosoma en la misma región 2q14-21 con aproximadamente 15 kb. En general el brazo largo del cromosoma 2 contiene no solo los genes de esta triada, si no también de los receptores tipo I y II de IL-1 (Fig.6).

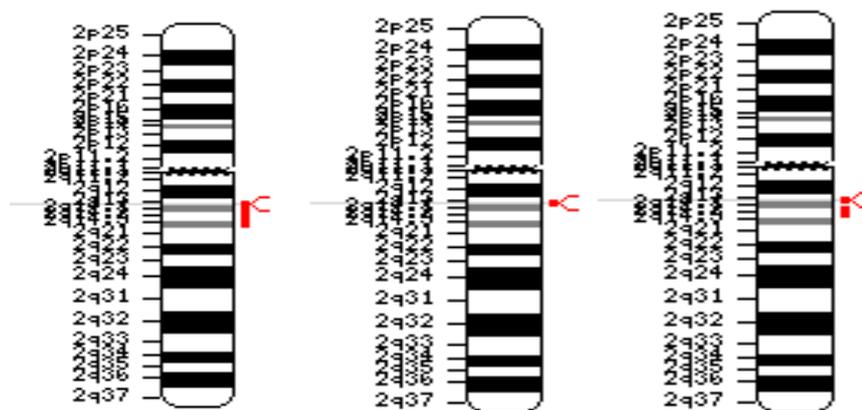


Figura 6. Genes de la triada IL-1: IL-1 β , IL-1 α y IL-1ra

III.10.5. Regulación de la expresión del gen

a) Control transcripcional de IL-1

Las dos formas de IL-1 parecen tener un control transcripcional separado, pero ha sido crítico entender como sucede la expresión del gen de IL-1 debido a que es altamente sensitivo a lipopolisacaridos. En condiciones normales en adultos sanos no debería existir la expresión del gen, sin embargo *in vitro* el contacto con el poliestireno o el vidrio activa la expresión del gen de IL-1 β . La transcripción del mensajero de IL-1 β es rápida en macrófagos, células endoteliales, células de músculo liso, y monocitos. Si se estimula a estos tipos de células con LPS (lipopolisacaridos) se observa el ARN mensajero de IL-1 β a los 15 minutos, un pico de acumulación se observa a las 3-4 horas, sostenido por 6 u 8 horas y después disminuye rápidamente. Se observa por lo tanto la síntesis de un represor transcripcional, así como un incremento en la vida media del ARN mensajero. Contrariamente, si se usa a IL-1 como un estímulo sobre la expresión de su propio gen, los niveles del ARN mensajero se encuentran en su estado basal o una expresión muy lenta y sostenidos por 30 horas.

La transcripción y traducción de IL-1 son procesos diferentes y disociados, se puede observar transcripción sin traducción de la proteína ^{(38, Yamamoto *et al*, 1989).} Los corticosteroides suprimen la transcripción de IL-1 y síntesis cuando se administran antes del inicio de la transcripción y son menos efectivos cuando se administran después de la transcripción.

b) Control traduccional

Lipopolisacáridos, prostaglandinas y prostaciclina no tienen efecto en la transcripción de IL-1 pero reducen la traducción de IL-1 ^(39, Knudsen, 1986). Si se bloquea la ciclooxigenasa se incrementa la producción de IL-1. Las prostaglandinas inducen la supresión de la traducción de IL-1, este suceso parece ser vía inducción de AMP cíclico.

Aún no es bien claro como IL-1 se transporta del citosol al compartimiento extracelular, pero existe evidencia de que una glicoproteína resistente a multidrogas puede estar involucrada en este evento. Algunos estudios sugieren que la pro-IL-1 β puede secretarse intacta y después ser procesada por proteasas de tipo serina presentes en el tejido inflamado.

III.10.6 Inducción de la síntesis de IL-1 por diferentes factores

La síntesis de IL-1 β puede ser inducida por una gran cantidad de estímulos, incluyendo la adhesión a las superficies, LPS, *Staphylococcus aureus*, interleucina 1, leucotrienos, ésteres de forbol, zymosan, TNF- α , INF- γ , ionoforos de calcio, componentes del complemento (C5a), indometacina, factor de crecimiento estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ó GM-CSF.

III.10.7 Mecanismo de Acción de IL1. Receptores de IL-1: Hoy día se conocen dos receptores para la tríada IL-1, son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. El receptor tipo I (IL-1RI) es una glucoproteína de 80kDa preferentemente encontrada en células endoteliales, hepatocitos, fibroblastos, queratinocitos y linfocitos T, mientras que el receptor tipo II (IL-1RII) es una glucoproteína de 68kDa preferentemente encontrada en linfocitos B, monocitos-macrófagos y neutrófilos. Cada miembro de esta tríada IL-1 puede unirse a los receptores tipo I y tipo II. La región extracelular de IL-1RI y de IL-1RII muestran el 28% de homología, tienen un simple segmento transmembranal pero IL-1RII tiene un segmento citosólico muy corto. La porción citosólica del IL-1RI no tiene actividad intrínseca de tirosina cinasa, pero es el primero en la vía de transducción de la señal. Al parecer el IL-1RII no es capaz de formar un complejo con el IL-1RI y no está involucrado en

transducir la señal. La glucosilación del IL-1RI parece ser importante para la afinidad por el ligando ^(40, Dinarello, 1994). La expresión del gen de IL-1RI es altamente regulado por corticosteroides, factor de crecimiento epidérmico, interleucina 4 e Interleucina 2.

III.10.8 Señalización Canónica de IL-1 β

Una de las más importantes características de la transducción de la señal de IL-1, es que se necesitan sólo el 2% de los receptores, para que una respuesta biológica pueda darse. El IL-1RI está acoplado a proteínas G, activación de AMP cíclico, hidrólisis de fosfolípidos, y activación de esfingomielasa.

IL-1 β ejerce sus efectos biológicos a través de una interacción inicial con el IL-1RI, y su asociación con el receptor lleva al reclutamiento de dos cinasas asociadas al IL-1RI, IRAK1 e IRAK2 y la subsecuente activación de la cinasa inductora de NF- κ B, NIK y de la cinasa I κ B. La cinasa activada I κ B actúa y fosforila a la proteína inhibitoria I κ B α en la serina 32 y en la serina 36, para llevarla a la ruta de ubiquitinización y degradación a través de la ruta del proteosoma dependiente de ubiquitina. La degradación de I κ B lleva a NF- κ B a translocarse al núcleo y mediar la más eficiente transcripción de genes que contienen el sitio de unión a NF- κ B ^(41, Xuening Shen, et al, 2000; Fig.7). Además, IL-1 β también puede activar otras vías de transducción de señales; a las cinasas MAPKs p42 y p44, p38, y el amino terminal de la cinasa c-Jun- (JNK) y la cinasa fosfoinositol 3 (PI3K).

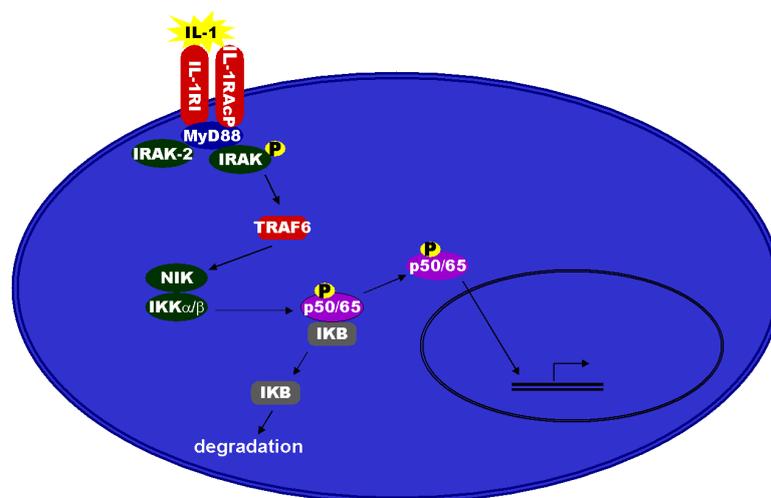


Figura 7. Ruta de señalización de IL-1 β

El receptor tipo 1 de IL-1 β presenta secuencias similares con la porción citoplasmática de las proteínas TOLL , lo que ha sido motivo de un punto central de investigación para el estudio de la inmunología innata.

Un homólogo de la proteína TOLL (*Drosophila*) en el humano es el llamado TOLL like Receptor (TLR), proteína que se identificó en 1997, subsecuentemente otros TLRs (1-6) se han identificado y clonado (Fig. 8).

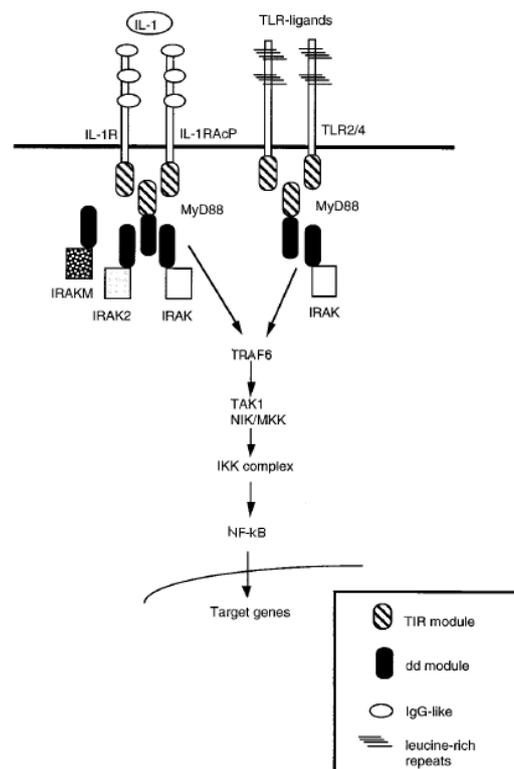


Figura 8. Semejanza entre los receptores TOLL y el receptor de IL-1. La figura muestra la vía de señalización compartida entre los receptores tipo TOLL y el receptor tipo I de IL-1 β , activando incluso los mismos genes blanco.

III.11.1. Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)

III.11.2 Desarrollo histórico: El Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α), es una proteína principalmente producida por macrófagos activados; su primera fase de estudio se inició en 1940, cuando fue detectada en el suero de ratones tratados con endotoxina de *Bacillus Calmett-Guerin* (BCG). Se le dió a conocer como una proteína productora de necrosis hemorrágica en tumores *in vivo*, y citotóxica para células tumorales *in vitro*, pero no para células normales. También fue descubierta como mediador de la caquexia en animales con infecciones parasitarias, y por ello se le denominó caquetina.

En 1985, diferentes grupos clonaron el gen que codifica para la proteína, se estableció una estrecha relación con el gen de la Linfotoxina o Factor de Necrosis Tumoral β , lo que contribuyó a descubrir su localización cromosómica y la localización, así como caracterización de sus receptores.

La atención del papel de TNF- α se ha centrado en el sistema inmune y en las reacciones inflamatorias, descubriéndose numerosas interacciones entre esta citocina y otros factores, como interferones, interleucinas, prostaglandinas; tanto *in vitro* como *in vivo*.

También se han descrito respuestas en células del sistema inmune, macrófagos principalmente, seguidos de polimorfonucleares, células T y B, y en otras muchas líneas celulares, también se han estudiado los efectos del TNF- α exógeno. En la actualidad se conocen los efectos fisiológicos de la proteína de TNF- α y se han esclarecido sus funciones en varias patologías mediante la utilización de modelos animales (como ratones atímicos y ratones transgénicos).

III. 11.3. Estructura del TNF- α : Es una proteína de 157 aminoácidos (17Kda). La forma activa de esta citocina es un trímero compacto formado por tres subunidades idénticas de 157 aa. Todas las secuencias de TNF- α contienen dos residuos de triptófano conservados entre especies. El cambio de estos residuos por fenilalanina da lugar a una reducción en la actividad. El TNF- α humano contiene tres residuos de histidina en posición 15, 73 y 78; los residuos en 15 y en 78 están conservados, no sólo entre distintas secuencias del TNF- α , si no también en el TNF- β . La modificación del residuo 15

da lugar a la disminución incluso a la pérdida de la acividad ^(38, Yamamoto *et al.*, 1989). Esto indicaría que este aminoácido se encuentra en el sitio de unión a receptor del TNF- α , o en una posición muy cercana a este sitio ^(42, Fiers, 1991).

Para TNF- α se ha descrito una forma membranal de 26 Kda, la cuál corresponde al producto no procesado de la traducción del ARN mensajero ^(43, Kriegler *et al.*, 1988). Además la parte correspondiente al TNF- α maduro es la que se encuentra por fuera de la célula. Se piensa que esta forma unida a membrana es activa y responsable de la citotoxicidad celular mediada por monocitos ^(44, Philip y Epstein, 1986). Este precursor transmembranal sufre la acción de una proteasa tipo serina ^(45, Scuderi, 1989). También se ha decripto otra forma de 18.5 Kda inactiva, que presenta 10 aminoácidos más en el extremo amino terminal que la forma de 17Kda. Todavía no esta claro si esta forma es intermediaria en el procesamiento, o si es un producto final ^(42, Fiers, 1991).

Existe una homología clara entre la estructura primaria del TNF- α y la del TNF- β (son idénticas en un 31% y homologas en un 51%). Una diferencia es la presencia de catorce aminoácidos en la región amino terminal del TNF- β (no presente en el TNF- α). También existen diferencias respecto a la presencia de distintos amonoácidos: por ejemplo, el TNF- α tiene dos cisteínas (el humano, el conejo, el murino) mientras que el TNF- β carece de ella y en su lugar aparece tirosina, además el TNF- β presenta tres residuos de metionina que no tiene el TNF- α .

TNF- β presenta glucosilaciones a diferencia del TNF- α (aunque el murino, si presenta) ^(46, Green *et al.*, 1976).

A nivel estructural TNF- α esta constituida por láminas β plegadas antiparalelas. Existe un puente disulfuro sencillo entre los aminoácidos en posición 69 y 110 quedando de esta forma unidas 2 laminas beta y formándose un bucle; también se le conoce como “ β -jellyroll” (Fig. 9; ^{47, Jones *et al.*, 1990)}.

Este puente está altamente conservado entre las familias de la misma molécula y, aunque favorece su estabilización no es esencial para la actividad del TNF- α ^(48, Mark *et al.*, 1987).

Tres subunidades de 157 aminoácidos se asocian fuertemente para formar un trímero con forma de cono. La interacción se realiza mediante un empaquetamiento en la que una región con conformación de lámina β situada en un borde del monómero plegado se dispone cerca de otra

región en lámina β de la subunidad adyacente. Las regiones de la hoja β no implicadas en la formación del trímero tienen predominantemente residuos apolares, mientras que las que lo están son mayoritariamente polares.

Respecto a la región de la molécula de TNF- α que es reconocida por el receptor de membrana de la célula diana, se han descrito varios puntos esenciales. Por ejemplo, el cambio de la serina en la posición 86 por la fenilalanina da lugar a una disminución de 10,000 veces en la actividad biológica, sin que cambien las necesidades fisicoquímicas de la proteína.

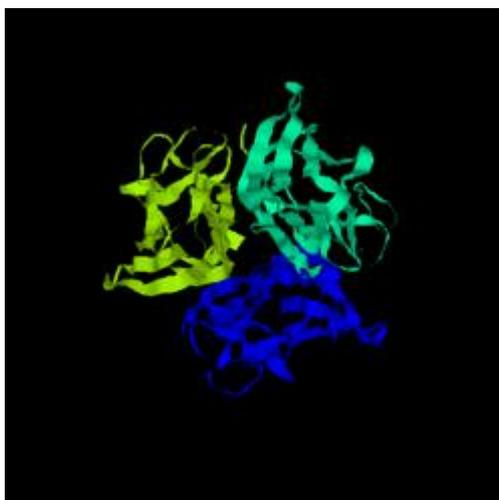


Fig. 9. Estructura tridimensional del trímero Factor de Necrosis Tumoral- α

III.11.4. Determinación génica del TNF- α

El gen del TNF- α (y también el del TNF- β) se localiza en el humano en el cromosoma 6, cercano al centrómero. En esta misma región está el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), en el extremo proximal del brazo corto ^(49, Nedwin *et al.*, 1985; 50, Strominger, 1986; Fig. 10). Las regiones codificantes constan de 4 exones de aproximadamente 8 Kb. Mas del 80% de la secuencia que codifica para TNF- α maduro esta en el cuarto exón, mientras que los exones I y II contienen casi completamente secuencias peptídicas anteriores. Al igual que existe homología respecto a la secuencia de aminoácidos, existen secuencias de nucleótidos altamente conservadas en los extremos 5' y 3', que posiblemente están asociadas con la regulación de la expresión de este gen ^(51, Spriggs *et al.*, 1992).

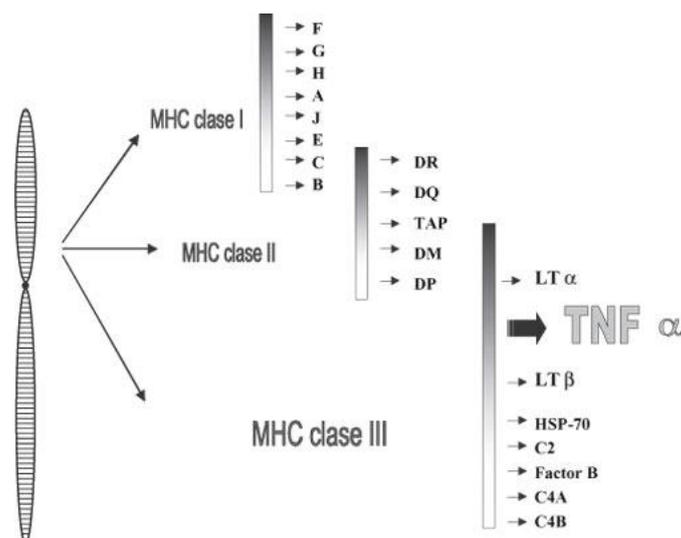


Fig. 10. Localización del gen de TNF- α

III. 11. 5. Regulación de la expresión del gen:

a) Control transcripcional

La región de 1000 pb del extremo 5' del gen contiene elementos regulatorios importantes que afectan a la transcripción del TNF- α en respuesta a varios estímulos. Aproximadamente 20 pb por encima del inicio de la transcripción se encuentra la secuencia TATA, 20 pb por encima de ésta aparece una secuencia GC (en orientación invertida), a la que se une el factor SP-1.

Adyacente a la región TATA, a 80 pb de ésta, existe una secuencia palindrómica de 8 nucleótidos casi idéntica al elemento sensible a AMP cíclico (CRE) encontrado en el promotor del gen de la somatostatina. Difiere de ésta en que el dinucleótido central está invertido (CG en lugar de GC). Esta secuencia normalmente está asociada con genes inducibles por AMP; sin embargo la transcripción del TNF- α está inhibida por agentes que aumenten estos niveles.

Entre la región TATA y el inicio de la transcripción existe una secuencia muy parecida a la secuencia consenso de unión de c-jun/AP-1, un motivo de 7 nucleótidos asociado con los promotores de genes inducibles por ésteres de forbol. A 40 pb por encima de la región TATA existe una secuencia con algo menos de homología aunque también posiblemente funcional respecto a la unión con AP-1. Otro elemento de posible respuesta a ésteres de forbol se encuentra en la región de 90 a 165 pb por

encima de la secuencia TATA. Esta secuencia podría ser la que ⁽⁵²⁾ Economou y colaboradores (1989) identificaron como sitio de unión del factor de transcripción AP-2.

Estas secuencias, localizadas a 200 pb por encima del inicio de la transcripción, están altamente conservadas en ratón, conejo y en el humano; lo cuál indica que estos elementos regulatorios son importantes. Además de estas secuencias, existen otras, cuyo papel todavía se desconoce: en la región entre 230 pb y 650 pb por encima de la secuencia TATA existen dos motivos (también conservados en las tres especies) que recuerdan el motivo citocina-1 presente en los promotores de IL-2, IL3, G-CSF y GM-CSF, y que parece ser una variante del intensificador κ B: a 24 pb de la secuencia TATA aparece un decanucleótido con cierta homología respecto a la secuencia Υ de los promotores de MHC II, y entre 480 y 820 pb por encima de la misma secuencia TATA hay motivos semejantes a los intensificadores κ B de los genes de las inmunoglobulinas ^{(51, Spriggs *et al.*, 1992).}

b) Control traduccional

A nivel traduccional también existe regulación: en la región 3' no traducida identificaron en los genes de TNF- α humano y murino un octanucleótido (TTATTTAT) presente en los genes de otras citocinas. La presencia de esta secuencia está asociada con la degradación acelerada de ARN mensajero y con la interferencia en la traducción .

III.11.6. Inducción de la síntesis de TNF- α por diferentes factores

El control de la producción de TNF- α se lleva a cabo de forma específica en cada tejido. Además, existe una gran variedad de estímulos que inducen la síntesis de TNF- α . Esta producción se ha estudiado fundamentalmente en la línea monocito/macrófago, pero la expresión del TNF- α por parte de células no hematopoyéticas también es importante, en algunas patologías.

En linfocitos, el inductor de la síntesis de TNF- α más estudiado es el lipopolisacárido (LPS). En estas células, la regulación de la transcripción de TNF- α parece ser un mecanismo de control importante

para la expresión de TNF- α . Generalmente existe una transcripción basal de esta citocina, aunque se incrementa mucho cuando el monocito se activa con LPS.

En la activación de los monocitos por LPS están implicadas varias vías de transducción de señal: fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa A2 (PLA2), proteincinasa (PKC), flujos de Ca²⁺, y nucleótidos cíclicos. Entre éstas, parece que la síntesis de TNF- α precisa de la vía de la PKC al menos, y depende del calcio almacenado en la célula ^(53, Drysdale et al., 1983). En células como HL-60, la inducción de transcritos de TNF- α por LPS está asociada con actividad PLA2, sin que intervenga la vía de la PKC.

Otro grupo de inductores de TNF- α son los ésteres de forbol. Parece que la PLA2 tiene un papel clave en su efecto, y en algunos casos, este efecto puede ser mediado por PKC (activando NF- κ B, que regula la transcripción de TNF- α).

Entre otros inductores descritos, el mismo TNF- α es capaz de desencadenar su propia expresión, tanto a nivel de ARN como de proteínas. Este efecto parece ser mediado por PLA2 y por la actividad 5-lipoxigenasa.

Respecto a la producción de TNF- α por células no mieloides, actualmente se sabe que muchos tejidos son capaces de expresar TNF- α constitutivamente o en respuesta a estímulos. La expresión de TNF- α suele correlacionarse en estos tejidos con niveles celulares de ARN mensajeros de IL-1 α , IL-1 β e IL-16. Esto indicaría que el TNF- α actúa conjuntamente con otras citocinas para controlar el crecimiento y la funcionalidad de las células en estos tejidos.

III.11.7. Mecanismo de Acción del TNF- α . Receptores de TNF- α . El primer paso en la respuesta de una célula es la interacción del ligando con los receptores específicos de membrana. Los receptores del TNF- α están presentes en casi todos los tipos celulares con algunas excepciones, como los eritrocitos y los linfocitos T no estimulados. El número de receptores oscila entre 200 y 10,000 por célula. El receptor es lábil metabólicamente, y tiene una vida media de 30 minutos a 2 horas ^(54, Baglioni et al., 1987; 55, Scheurich et al., 1986). Aunque la presencia del receptor es imprescindible para el efecto biológico,

no existe correlación clara entre el número de receptores y el tipo de respuesta, ni con la magnitud de ésta ^(56, Holtman y Wallach, 1987; 57, Tsujimoto et al., 1986)

Existen al menos dos receptores diferentes de TNF- α descritos en muchas líneas celulares: uno de ellos de 55 Kda (TNFR55 o R1) y otro de 75Kda (TNFR75 o R2). Ambos están N-glicosilados, pero sólo el último también está O-glicosilado. La constante de unión el R1 es de 0.5nM y de R2 es de 0.1nM.

El TNFR1 parece ser una proteína de 455 aminoácidos con una estructura típica común entre otros receptores: presenta una secuencia hidrofóbica de 220 aa. Una región transmembranal sencilla que separa los dominios intra y extracelulares y una región extracelular de 182 aa. El TNFR2 tiene 174 aa en la región intracelular y 235 aa. en la extracelular.

Las secuencias extracelulares de ambos receptores están relacionadas: cada una contiene cuatro motivos de aproximadamente 40 residuos y cada uno de ellos presenta 6 residuos de cisteína (algunos 4). Respecto a los dominios intracelulares, aparentemente no existen homologías claras entre ambos receptores, ni tampoco respecto a otros receptores. Sin embargo en ambos existe un alto contenido en prolina y serinas en la región citoplasmática.

El TNFR1 está ampliamente distribuido y aparece en células epiteliales y fibroblastos, entre otras células. El TNFR2 tiene una localización más restringida a las células de origen hematopoyético.

El TNF- α y el TNF- β se unen a ambos tipos de receptores, pero este último lo hace con menor afinidad ^(58, Locksley et al., 1987). Además, la unión del TNF- α a sus receptores no es específica de especies, aunque existe cierta preferencia por su especie celular homóloga ^(59, Smith et al., 1986). Aunque el TNF- α y el TNF- β se unan a los mismos receptores la respuesta no es idéntica, ni cualitativa ni cuantitativamente en la mayoría de los casos. Por ello ⁽⁴²⁾ Fiers (1991) indica que es posible que las moléculas de los receptores estén asociadas a proteínas accesorias y que la interacción con el TNF- α genere muchas señales, algunas no ejercidas por el TNF- β . Alternativamente existe la posibilidad de un tercer tipo de receptor.

La unión del TNF a los receptores puede ser inhibida por activadores de la PKC, quizá debido a la fosforilación de estos o una disminución en el número de receptores. Por el contrario el AMP cíclico incrementa la cantidad de R2, al menos en algunas líneas celulares .

III.11.8. Señalización Canónica del TNF- α

Las actividades de TNF- α se llevan a cabo cuando esta proteína induce la trimerización de su receptor (ya sea tipo I o tipo II) momento en el que se inicia la transducción de la señal. Actualmente se dice que los receptores se agrupan dentro de una superfamilia que es definida por su arquitectura rica en cisteína en la región de unión del ligando. El receptor tipo I es el dominante en la señalización, puede activar apoptosis y al factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B). El tipo II puede ejercer actividades en los linfocitos como la activación de NF- κ B, o bien participar como un receptor auxiliar en la señalización TNF-receptor tipo I.

La identificación de algunas proteínas asociadas a los dominios intracitoplasmáticos del receptor han empezado a descubrirse y se ha avanzado en el área de la señalización, poniendo énfasis en dos diferentes complejos de proteínas asociadas a los receptores de TNF, (Fig. 11).

III.11.9. Complejo de Señalización TNF Receptor 2

Las proteínas que forman parte del complejo de señalización 2 son TRAF1 y TRAF2 con 45 y 56 kd respectivamente. Ambas tienen un carboxilo terminal conservado de 230 aminoácidos. El dominio TRAF puede ser subdividido en dos subdominios TRAF-N y TRAF-C, con una homología del 33% y una identidad de secuencia del 63%. TRAF1 y TRAF2 pueden formar homodímeros y heterodímeros, pero sólo TRAF2 interactúa con el receptor tipo II. La expresión de TRAF2 es ubicua mientras que la de TRAF1 es tejido específica.

Otras proteínas de 68 y 66 kd fueron purificadas y se les llamó proteínas inhibidoras de apoptosis c-IAP1 y c-IAP2, respectivamente. Estas proteínas protegen contra la muerte celular a las células, el ARN mensajero de c-IAP1 es expresado en todos los tejidos mientras que c-IAP2 se expresa

preferencialmente en células del sistema inmune. TRAF2 puede activar la señalización del amino terminal de la cinasa Jun (JNK).

El receptor tipo II de TNF, TRAF1, TRAF2, y las c-IAPs forman el complejo de TNF Receptor 2 cuando se sobreexpresan en un complejo independiente del ligando ^(60 Jupp et al., 2001).

III.12. Complejo de Señalización TNF Receptor 1

El receptor tipo I contiene un dominio de muerte de aproximadamente 80 aminoácidos en el dominio intracitoplasmático que señala para apoptosis y activación de NF- κ B. Las proteínas que se purificaron son TRADD por sus siglas en inglés (TNF receptor-associated death domain), de tamaño molecular de 34-kd.

Otras proteínas son: TRAF2, FADD (Fas-associated death domain) y (receptor interacting protein) RIP.

La proteína FADD recluta a la caspasa 8 al complejo de señalización de Fas; así la caspasa 8 inicia la muerte celular programada vía Fas. SODD, (silencer of death domains), proteína de 60-kd puede asociarse al dominio de muerte del receptor tipo I de TNF y este mecanismo previene la agregación y la señalización del receptor. SODD interactúa con el receptor tipo I en condiciones fisiológicas normales ^(61, Goeddel, 1999).

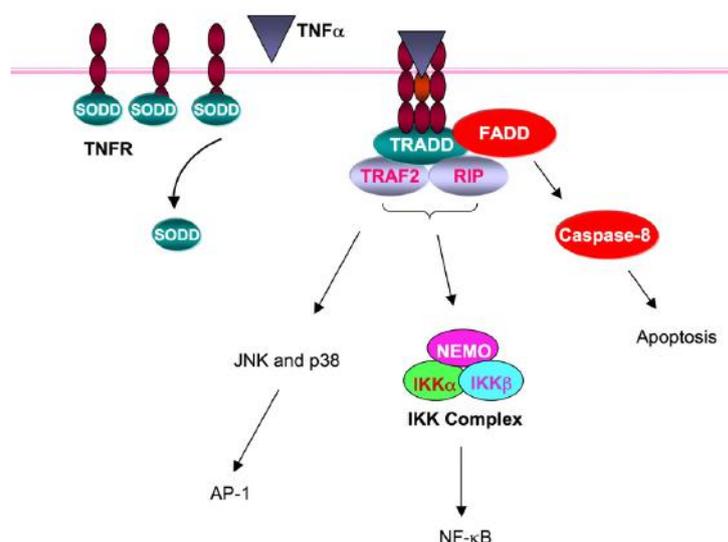


Fig. 11. Ruta de señalización de TNF- α .

IV. ANTECEDENTES

Papel de IL-1 β y TNF- α en cicatriz hipertrófica

Desde que ⁽⁶²⁾ Mancini y Quaife en 1962 y ⁽⁶³⁾ Peacock et al., en 1970, definieron a la cicatriz hipertrófica, como una cicatriz excesiva que sobresale encima del nivel cutáneo y cuyos límites se mantienen confinados dentro de la lesión original; se ha pretendido estudiar la fisiopatología de estos desordenes fibroproliferativos.

Actualmente existe una gran cantidad de información en la literatura, que relaciona la formación de cicatrices hipertróficas con una **prolongada y/o exagerada fase inflamatoria**, es bien conocido entonces que estas cicatrices hipertróficas presentan un infiltrado inflamatorio abundante, una sobreexpresión de moléculas de adhesión celular, diapedesis de más células inflamatorias y por lo tanto un incremento en la síntesis de citocinas profibrogénicas, lo que a su vez se traduce en un aumento en la presencia de matriz extracelular.

Este aumento en la matriz extracelular puede deberse a un incremento en la síntesis de colágena, fibronectina y otros proteoglicanos, o bien se cree puede deberse a una disminución en la degradación de estas proteínas de matriz con una alteración en la remodelación de las mismas ^(7, Salem et al., 2002).

En los años noventas ⁽⁶⁴⁾ Castagnoli y colaboradores (1993) decidieron analizar algunas citocinas que ya se conocía podían participar en enfermedades dermatológicas, así como investigar, que células eran las encargadas de producir citocinas que pudieran tener acciones autócrinas o parácrinas en las cicatrices normales e hipertróficas. De esta forma encontraron que los factores de necrosis tumoral α y β (TNF- α y TNF- β) son producidos por células del infiltrado inflamatorio en pacientes que habían sufrido daño tisular por quemadura y que presentaban secuelas hipertróficas. Sorprendentemente las células del infiltrado inflamatorio (macrófagos y linfocitos T activados, principalmente) expresaron poca cantidad de la proteína del factor de necrosis tumoral α en las cicatrices hipertróficas al hacer una comparación con las cicatrices normales. Estos datos fueron confirmados por el mismo grupo de investigación y para los mismos pacientes mediante la técnica de

PCR reversa, demostrando que efectivamente existía una disminución no sólo en la proteína si no también en los niveles del ARN mensajero de TNF- α , lo cuál propusieron se debía a una biosíntesis alterada ó a una disminución en el nivel de transcripción basal del mensajero ^(65, Peruccio et al., 1994).

Siguiendo con sus investigaciones ⁽⁶⁶⁾ Castagnoli y colaboradores en 2002, propusieron que los procesos inmunológicos tales como infiltración de linfocitos T activados y la producción alterada de citocinas eran causa importante en la formación de cicatrices hipertróficas. En 1998 ⁽⁶⁷⁾ Stella et al., demostraron que existía una interacción entre las células residentes de la piel y las células del sistema inmune cutáneo, dándole mayor importancia al sistema inmune cutáneo como el factor encargado de la génesis de las cicatrices hipertróficas.

Este grupo de investigación se basó en estudios anteriores del doctor ⁽⁶⁸⁾ Jan de Bos (1997), quién había propuesto junto con su equipo de investigación, el término "sistema inmune de la piel" ó SIS por sus siglas en ingles "skin immune system" para describir la compleja red de interacciones de las células de respuesta inmune y de los factores humorales que existen en la piel normal. Ellos también habían identificado y propuesto el término de queratinocitos activados, ya que las definieron como células que expresan moléculas de adhesión, receptores y capaces de presentar antígenos. También describieron la **unidad perivascular dérmica** conformada por fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, y dendrocitos como un importante sitio de reactividad inflamatoria e inmunológica. Propusieron que las células de Langerhans y los linfocitos T son básicos en la inmunidad de la piel y que las células derivadas de la piel no hematopoyéticas pueden producir bajo estimulación un gran panel de citocinas. Por lo anterior ⁽⁶⁷⁾ Stella y colaboradores (1998) dieron a conocer que efectivamente el sistema inmune cutáneo estaba participando en la formación de las cicatrices hipertróficas, encontrando un mayor componente de linfocitos T activados con moléculas de expresión CD3, CD4 y CD8 positivas y propusieron que los linfocitos CD4+ son células encargadas de expresar citocinas localmente y de forma transitoria, estas citocinas podrían entonces interactuar con sus receptores específicos en diferentes células. En esta misma cita comprueban que existe una

disminución significativa en la síntesis de la proteína de TNF- α en las cicatrices hipertróficas (activas y en remisión) al compararlas con cicatrices normotróficas.

Unos años más tarde ⁽⁶⁹⁾ Zhang et al en el 2004, investigaron el papel del mensajero de TNF- α en la cicatriz hipertrófica utilizando la metodología de RT-PCR semicuantitativo midiendo la expresión del mensajero en diferentes tiempos de evolución en la cicatriz hipertrófica. Ellos encontraron un incremento significativo ($P < 0.01$) del ARN mensajero conforme la cicatriz hipertrófica consiguió madurar, o evolucionar. Sin embargo, el cociente del mensajero de TNF- α / mensajero β -actina fue inferior en la cicatriz hipertrófica que en la cicatriz normal. Estos resultados sugirieron que TNF- α podía tener un importante papel en la regulación de la cicatrización normal, y que la cicatriz hipertrófica puede resultar de una carencia de este factor.

Al mismo tiempo que se investigaba el papel de las citocinas *in situ*, también se investigaba el papel de los efectos biológicos del Factor de Necrosis Tumoral α y de Interleucina 1β , al ser agregados a cultivos celulares primarios de fibroblastos provenientes de cicatrices hipertróficas. ⁽⁷⁰⁾ Kitzis y colaboradores (1999) encontraron que al agregar TNF- α exógeno de forma continua (durante 72 h) y de forma transitoria (durante cada hora) observaban una inhibición en la acumulación de la colágena secretada, las dosis del factor probadas fueron de 0, 1 y 2 ng/ml durante 0, 1, 4, y 72 horas. La disminución en la acumulación de colágena observada fue dosis dependiente. Proponiendo que una de las funciones biológicas de TNF- α , es desactivar la señal de cicatrización, partiendo del supuesto que el tiempo de exposición al TNF- α y el tiempo después del daño tisular no es crítico para observar el efecto de inhibición de la síntesis de colágena causado por TNF- α .

⁽⁷¹⁾ Feng et al, un año más tarde (2000), confirmaron que los fibroblastos derivados de cicatriz hipertrófica, al entrar en contacto con una alta concentración de TNF- α 1,000 U/ml, disminuyen su actividad celular; en esta investigación se compararon los fibroblastos derivados de piel normal versus los fibroblastos derivados de cicatrices hipertróficas, observando que su actividad celular se incrementa en la piel normal al ser expuestos a TNF- α exógeno.

⁽⁷²⁾ Yang D, et al (1999) midieron los efectos de IL-1 β exógeno en la síntesis de colágena y en la síntesis de ácidos nucleicos en fibroblastos derivados de cicatriz. Encontrando que IL-1 puede disminuir la síntesis de colágena y la cantidad de ácidos nucleicos en los fibroblastos. Confirmando que IL-1 β es una citocina con un efecto down regulatorio (a la baja) en la formación de la cicatriz y que podría tener un papel importante en su prevención. ⁽⁷³⁾ Guan B et al., 2001 también estudiaron el papel de la actividad biológica de IL-1 β en fibroblastos cultivados de cicatriz hipertrófica y de piel normal, en presencia exógena de la citocina, encontrando que los dos tipos de fibroblastos presentan características diferentes; esto debido a la diferencia en la expresión de las proteínas Bax y Bcl-2. La apoptosis ocurría en los dos tipos de fibroblastos al estar en presencia con IL-1 β , sólo que en el caso de las cicatrices hipertróficas era más evidente y severa la muerte celular, aunque no había cambios en el cociente Bax/Bcl-2 en las cicatrices hipertróficas, en cambio en piel normal el cociente es menor.

Por otro lado, se sabe que las cicatrices hipertróficas presentan una proliferación y diferenciación anormal de los queratinocitos y frecuentemente se observa un incremento en la acantosis (engrosamiento de la capa córnea), además una producción alterada en los factores de crecimiento secretados por los queratinocitos, se había pensado podía ser el origen de la cicatriz hipertrófica. Se había planteado la posibilidad de que un aumento en la secreción de IL-1 α podría disminuir el catabolismo (transformación de moléculas orgánicas complejas en moléculas sencillas) en la matriz dérmica, o bien que una disminución en la secreción del factor de crecimiento derivado de plaquetas podría también conducir a una incrementada formación de matriz dérmica. Así, en 2001 ⁽⁷⁴⁾ Niessen y colaboradores cuantificaron interleucina 1 α y 1 β , el factor de necrosis tumoral α , entre otras citocinas por medio de inmunohistoquímica. Sus biopsias fueron clasificadas como cicatrices (HH) hipertróficas, cicatrices normales (HN) y cicatrices que se mantuvieron normales hasta los doce meses después de la toma de la biopsia (NN). El tiempo de evolución de las cicatrices analizadas fue variable entre 3 y 12 meses, encontrando que la expresión epidérmica de IL-1 α fue significativamente incrementada en las cicatrices (NN) que se comportaron normales hasta los 12 meses, comparadas

con las que comenzaban a ser normales (HN) y las hipertróficas (HH) a los 3 y 12 meses después de la toma de biopsia. En la dermis no hubo diferencias. IL-1 β , TNF- α , no mostraron diferencias significativas, por lo que no pudieron concluir nada contundente. Asimismo ⁽⁷⁵⁾ Bellemare y colaboradores (2005) cuatro años más tarde propusieron un modelo de ingeniería tisular para poder observar si la epidermis podía ser quien promovía la fibrosis dérmica. Estos equivalentes de piel se construyeron usando tres diferentes tipos de fibroblastos dérmicos (Wmyo) de cicatriz normal, (Hmyo) de cicatriz hipertrófica y (Fb) de piel normal. Y dos tipos de queratinocitos, de piel normal (NK) o de queratinocitos hipertróficos (HK). Se observó que en ausencia de queratinocitos, los fibroblastos de cicatriz hipertrófica formaron una dermis gruesa, y cuando se cocultivaron con queratinocitos de piel normal el grosor fue menor. Sin embargo cuando se cocultivaron con queratinocitos hipertróficos hubo un aumento significativo en el grosor de la dermis en conjunto con fibroblastos normales, fibroblastos de cicatriz normal y fibroblastos de cicatriz hipertrófica. Estos resultados se correlacionaron con la secreción de colágena, MMP-1 y proliferación celular. Por lo que es concluyente que los queratinocitos participan en el desarrollo de las fibrosis patológicas por influencia de las células dérmicas.

Las cicatrices hipertróficas usualmente son tratadas por compresión elástica, resolviendo la cicatriz en un 60–85%, pero su mecanismo de acción es pobremente entendido; se cree que la compresión produce apoptosis y liberación de citocinas. Por lo que el grupo de ⁽⁷⁶⁾ Reno et al, (2005) midieron apoptosis y secreción de citocinas liberadas al medio en cultivos *in vitro* de biopsias de pacientes sometidos a compresión. En ausencia de compresión las células apoptóticas estuvieron presentes en la dermis de cicatriz normal y de cicatriz hipertrófica, aunque menor en número en estas últimas. Después de la compresión mecánica (presión constante de 35 mmHg por 24 horas, se incrementó el número de células apoptóticas en ambos tipos de cicatrices. Por lo que respecta a las citocinas, la secreción de IL-1 β no fue detectada en cicatrices normales por la técnica de Elisa en condiciones basales, pero sí en cicatrices hipertróficas. Después de la compresión la secreción de IL-1 β

(7.72 ± 0.2 ng/g) aumentó al doble en ambos tipos de cicatrices. Se midió la concentración basal de TNF- α en cicatrices normales (8.52 ± 4.01 ng/g) por ELISA y después de la compresión no se modificó su liberación (12.86 ± 7.84 ng/g). La concentración basal de TNF- α medida por ELISA en cicatrices hipertróficas fue significativamente más alta al compararse con las muestras de cicatrices normales (14.74 ± 1.42 ng/g) y la secreción de TNF- α disminuyó después de la compresión (3.52 ± 0.97 ng/g). Estos autores piensan que durante la regresión del tejido de granulación en el proceso de cicatrización de una piel normal existe apoptosis y que la elastocompresión en los pacientes con cicatriz hipertrófica provocaría un efecto similar, y que al inducir apoptosis de los fibroblastos en las secuelas., estas pueden resolverse. Por otra parte, se observó una modulación de la liberación de IL-1 β y de TNF- α debido a la compresión mecánica por lo que es probable que estas citocinas puedan inducir regresión de la hipertrofia.

Recientemente se publicó en el *J Invest Dermatol*, 2007 ^(77, Goldberg et al, 2007) que la cicatrización anormal abarca un amplio espectro de heridas, desde las crónicas hasta las cicatrices hipertróficas, donde se ha asociado a estas condiciones un perfil anormal de secreción de citocinas en el lecho de la herida. Se cultivaron fibroblastos bajo estimulación de TGF- β y TNF- α , encontrando que TGF- β incrementa la expresión de la proteína α -actina de músculo liso y TNF- α disminuye la expresión basal de α -SMA. Cuando a los cultivos se les adicionó ambos factores la expresión de α -SMA fue suprimida por debajo de la línea basal. El PCR tiempo real mostró que TNF- α disminuyó el ARN mensajero de α -SMA, colágena tipo 1, y fibronectina (genes característicos del fenotipo miofibroblastoide) de los fibroblastos inducidos a diferenciación a miofibroblastos mediante la estimulación de TGF- β 1. TNF- α también inhibió la fosforilación de Smad 3 vía la señalización del amino terminal de la cinasa Jun. Además, disminuyó la rigidez y contracción de los geles de colágena en los cuáles estaban sembrados después de 5 días de cultivo. Los cambios en la expresión de α -SMA, colágena, y fibronectina dan como resultado una disminución en la rigidez y contracción de las matrices de colágena. Por lo tanto, el balance de las citocinas en las heridas define las propiedades mecánicas de la matriz extracelular para una óptima cicatrización.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La fibrosis cutánea es un proceso reparativo normal que ocurre tras daño tisular, si no termina de forma ordenada resulta en el desplazamiento del tejido funcional normal por una cantidad excesiva de matriz extracelular produciendo la disfunción del tejido y órgano.

Se han cuantificado la expresión de varias citocinas en los procesos reparativos de la piel, donde el balance de las citocinas en general para todo tipo de heridas se ha considerado un factor clave para una óptima cicatrización. Por lo que es posible considerar que los mensajeros de IL-1 β y TNF- α podrían estar expresados de forma tal que favorezcan la biogénesis de la cicatriz hipertrófica.

VI. JUSTIFICACIÓN.

La cicatriz hipertrófica es una secuela que involucra inflamación crónica como consecuencia de un cierre tardío que conlleva al depósito excesivo de componentes de matriz extracelular por células tales como fibroblastos y miofibroblastos. A la fecha se han realizado gran cantidad de trabajos de investigación al respecto, con la finalidad de conocer el punto del desequilibrio y la posible terapéutica. Por lo anterior, se propuso evaluar la participación de los ARN mensajeros de IL-1 β y TNF- α , tanto en epidermis como en dermis, ya que ambos mensajeros parecen tener un papel crucial en la inflamación aguda y crónica, así como en el recambio de la matriz extracelular.

VII. HIPÓTESIS.

En las muestras de piel de pacientes con cicatriz hipertrófica estará incrementada la expresión de los mensajeros de IL-1 β y TNF- α en comparación con las muestras de piel de pacientes con cicatriz normotróficas o con piel normal.

VIII. OBJETIVO.

Evaluar la expresión de los ARN mensajeros para IL-1 β , TNF- α en biopsias de piel normal, cicatriz normotrófica y cicatriz hipertrófica posquemadura mediante hibridación *in situ*.

IX. METODOLOGÍA

El protocolo fue aprobado por la "Comisión de Investigación y Ética" del CMN "20 de Noviembre" del ISSSTE; con el número de registro: IB/4-02. El tipo de investigación que se realizó fue Experimental, Transversal, Prospectiva, Comparativa, Abierta.

IX.1. Obtención del material biológico

Las muestras biológicas se obtuvieron de dos campañas de cirugía extramuros, coordinadas por el Doctor Marco Antonio Marín (Asociación Mexicana de Quemaduras AC) una se llevó a cabo en Morelia Michoacán y otra en Tamaulipas. Los pacientes firmaron el consentimiento informado (Apéndice) y se tomó una historia clínica diseñada especialmente para este protocolo de cicatrices patológicas (Apéndice). Las biopsias de los pacientes se clasificaron en tres grupos principales:

- a) Grupo experimental, el cuál consistió en la toma de biopsias de 15 pacientes, indistintos del sexo, con cicatriz hipertrófica posquemadura de más de un año de evolución, que acudieron al servicio de cirugía plástica para la resección de la cicatriz.
- b) Grupo testigo número 1., el cuál consistió en la toma de biopsia de 17 pacientes, indistintos del sexo, con cicatriz normotrófica de más de un año de evolución, que acudieron al servicio de cirugía plástica para la resección de la cicatriz o bien aceptaron donar una biopsia de 6mm² de diámetro para su estudio.
- c) Grupo testigo número 2., el cuál consistió en la toma de biopsia de 11 pacientes, que algunas veces coincidió con la biopsia de los mismos donadores de cicatriz, relacionados por edad, sexo y topografía; o bien pacientes que accedieron a donar una biopsia de piel normal de 6mm² de diámetro, que nos permitieron tener una referencia de las características de normalidad.

Las biopsias se colocaron en tubos Falcon de 15 ml con aproximadamente un volumen de 2:1 de ARN later (Ambion, 7024), medio que nos permitió la transportación de las biopsias al laboratorio de Tejido Conjuntivo en el Distrito Federal. Una vez en el laboratorio la biopsia se fragmentó en tres

partes iguales, un fragmento de 2 mm² se procesó para técnica histológica de rutina y un posterior análisis dermatopatológico. Este análisis se realizó en el servicio de Dermatopatología en el Hospital General de México, con la ayuda de la Dra. Patricia Mercadillo y el Dr. Luis Miguel Moreno. Los otros dos fragmentos de 2 mm² se procesaron para hibridación *in situ*.

IX.2. Hibridación *In situ* para detectar a los ARN mensajeros de IL-1 β y de TNF- α

Fundamento: La hibridación *in situ* es una poderosa herramienta para estudiar la localización anatómica de ARN mensajeros y la expresión de uno o varios genes. Sondas de tipo complementario a ARN (cRNA) y a ADN (cDNA) son usadas para la detección de transcritos en núcleos pequeños e incluso en cultivos celulares. Para detectar la expresión de un transcrito, la sonda es marcada con diferentes reporteros (DIG, S³⁵, Biotina, etc.) y puede o no combinarse con otras sondas para dobles hibridaciones *in situ*.

Para medir la expresión de los genes de IL-1 β y de TNF- α *in situ*, así como localizar los tipos celulares encargados de la síntesis de ARN mensajero para dichos genes. Se utilizaron sondas sintetizadas químicamente (oligonucleótidos), los cuáles se diseñaron para alinear con las secuencias complementarias a los genes de interés. Las sondas se compraron a la compañía GeneDetect®; GD1104-OP IL-1 β humano, GD1177-OP TNF- α humano y GD5000-OP β -actina humano como control positivo. También se usaron sondas oligo dT, como control positivo (GD5000-OP).

Debido a la necesidad de encontrar un tejido control positivo, se obtuvieron dos muestras de pacientes de la clínica de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la UNAM, con diagnóstico de gingivitis, proporcionados por la Dra. Irlanda Barrón.

La técnica de hibridación *in situ* se estandarizó y se realizó en el laboratorio del Dr. Marco Cerbón con asesoría de la Dra. Adriana Mendoza (Facultad de Química, UNAM). El protocolo fue el siguiente: se realizaron cortes histológicos de 5 μ m en condiciones libres de dnasa y rnasa (Fluka 83930), las laminillas se desparafinaron durante 10 minutos a 60 °C, se colocaron en xileno y alcoholes graduales

(100, 95 y 50%) para rehidratar el tejido por 5 minutos. Posteriormente se sumergieron las laminillas en agua libre de dnasas y rnasas (Gibco, 10977) por 5 minutos más y al termino de este se colocaron en HCl 0.2N (Merck 10114) a temperatura ambiente para remover proteínas; una vez más se colocaron en agua destilada libre de dnasas y rnasas durante 5 minutos.

Las laminillas se colocaron en una digestión enzimática con proteínasa K (1µg/ml, Sigma 2308) en 0.05M Tris-HCl (Sigma, T1535) pH 7.4 por 5 minutos a temperatura ambiente y se lavaron en agua destilada suplementada con DEPC (Fluka, 32490) por 5 minutos. Posteriormente se transfirieron las laminillas a una agitación constante en 0.1M de TEA (Sigma T1377) y se le adiciono ácido acético anhídrido (Sigma, A6404) por 5 minutos.

La solución de equilibrio consistió en formamida 100% (Promega H5052), 2M Na Cl, 1M Tris-HCl, pH 7.4, 0.5M EDTA, 1.59 M DTT (Sigma, D8906), 52 µg/ µl heparina (Biochemika, 51550) en agua DEPC (Invitrogen 750023). Después se pre-hibrido durante una hora, y se hibrido durante toda la noche con sondas ajustadas a 10 ng/ml en una solución que consiste en 50% formamida, 5x solución denhardt's (Sigma D2532), ARN transferencia (Sigma, R5636), 10% dextran sulfato (Sigma, D8906) and 500 µg/ml ADN de esperma de salmón desnaturalizado (Sigma, 15632-011). Finalmente, se le agrego el DTT a la solución de prehibridación a una concentración de 10 mM. La temperatura de hibridación para todos los casos fue de 35°C.

Al siguiente día las laminillas se lavaron en condiciones astringentes para reducir la señal no específica o el background, se lavó secuencialmente en 2x buffer de citratos salino (SSC) a temperatura ambiente por una hora, 1x SCC a temperatura ambiente por una hora, a 37°C en SSC 0.05 X durante 30 minutos y a 0.05 X a temperatura ambiente otros 30 minutos. Para la detección inmunológica se lavaron las laminillas en 100mM Tris-HCl, 150mM NaCl pH 7.5 durante un minuto a temperatura ambiente y después se colocaron en solución de bloqueo durante 30 minutos, la cuál consistía en 100 µl suero normal de cabra (Sigma, G9023), 1.5 µl Tritón x-100 (Fluka, 93446), 100mM Tris-HCl y 150mM NaCl pH 7.5. La detección final se hizo colocando una gota de anticuerpo conjugado-HRP durante 4 °C toda la noche (Cat. no. HKD47 Rembrandt).

Al tercer día se lavaron las laminillas en 100mM Tris-HCl y 150mM NaCl pH 7.5 durante un minuto y se le agrego al tejido 100 µl de solución de AEC (aminoetilcarbazol, Sigma A6926) y se incubaron durante 10 minutos en oscuridad. Se lavaron en agua destilada y se les aplico de 2 a 3 gotas de hematoxilina (Sigma, MHS32) durante 10 minutos. Se montaron con Crystal mount (Biomedica M02) y Clarion (Biomedica, M05).

IX.3. Laminillas.

Se tomaron microfotografías con el microscopio Leica, y cámara Nikon a diferentes aumentos (X20 y X40), y con el Microscopio Zeiss Axio Imager Z.1 (X20, X40 y X100), el programa Axio Vision v. 4. 8. 1.

Se realizó el conteo de la marca positiva de la hibridación *in situ* en el programa de análisis de imágenes Image Pro Plus v. 5. 1. Media Cybernetics.

Brevemente se realizó una segmentación digital separando la epidermis de la dermis, se contaron núcleos en morado (hematoxilina) y la marca roja de la sonda hibridada. Se saco el porcentaje en núcleos, porcentaje total del tejido y el porcentaje de la marca.

IX.4. Análisis de datos.

El análisis de datos se realizó con el programa Prism 5 Statistics, para comparar los datos entre los tres grupos de pacientes. Se realizaron pruebas paramétricas (ANOVA) y no paramétricas (Kruskal Wallis).

X. RESULTADOS

X.1 Pacientes

De los 43 pacientes incluidos en esta investigación de tipo experimental, transversal, prospectiva, comparativa y abierta, 2 pacientes donaron fragmentos de piel normal al ser sometidos a una abdominoplastia y 9 donaron un fragmento de piel normal al ser intervenidos quirúrgicamente para el tratamiento de sus cicatrices. Quince (15) muestras fueron de pacientes con presencia de cicatrices hipertróficas, las cuales se definieron como lesiones eritematosas, con presencia de prurito, con o sin dolor, elevadas por la producción de matrices extracelulares y confinadas al sitio de la lesión. Sin embargo algunos pacientes no presentaron cambios de coloración evidente, y/ó presencia de prurito. Las cicatrices normales se definieron como lesiones planas y suaves, obteniéndose 17 muestras de este tipo.

Tabla 4. Características clínicas de los pacientes

Paciente	Edad (años)	Sexo	Tipo de Biopsia	Sitio de lesión
1	16	F	PN	Cara
2	17	M	PN	SD
3	37	F	PN	Cara
4	50	M	PN	Abdomen
5	27	F	PN	Cara
6	15	F	PN	abdomen
7	4	F	PN	Ingle
8	11	M	PN	pierna izquierda
9	26	F	PN	Cara
10	54	M	PN	espalda
11	49	F	PN	párpado
Total 11			PN	
1	27	F	NSc	cara, nevo
2	26	F	NSc	región maxilar

3	28	F	NSc	SD
4	35	F	NSc	SD
5	37	F	NSc	SD
6	3	F	NSc	SD
7	15	F	NSc	mejilla izquierda
8	16	M	NSc	axila derecha
9	4	M	NSc	mano
10	18	F	NSc	hombro izquierdo
11	9	M	NSc	antebrazo izquierdo
12	13	F	NSc	mano
13	4	F	NSc	mano
14	12	F	NSc	pierna
15	8	F	NSc	SD
16	3	F	NSc	SD
17	12	F	NSc	mano
Total 17			NSc	
1	15	F	HSc	SD
2	16	F	HSc	SD
3	19	F	HSc	brazo
4	22	M	HSc	pierna izquierda
5	16	F	HSc	SD
6	14	M	HSc	oreja izquierda
7	14	M	HSc	mejilla derecha
8	8	F	HSc	glúteos
9	12	M	HSc	popiteo
10	13	M	HSc	SD
11	22	F	HSc	espalda
12	22	M	HSc	pierna izquierda

13	10	F	HSc	Pierna izquierda
14	4	M	HSc	brazo derecho
15	SD	M	HSc	SD
Total 15			HSc	

PN, piel normal; HSc, cicatriz hipertrófica; NSc, cicatriz normotrófica; SD, sin determinar.

X.2. Análisis histopatológico

Histológicamente se analizó el infiltrado inflamatorio observándose poca variación en las biopsias de piel. En la piel normal (Fig. 12A) se observó un escaso número de linfocitos alrededor de los vasos sanguíneos dérmicos ^(83, Kanitakis et al., 2005). En las cicatrices normotróficas (Fig. 12B, Tabla 5) y en las cicatrices hipertróficas (Fig. 13A, B, C; Tabla 6) se observó un leve infiltrado inflamatorio dérmico, formando grupos de células perivasculares en la dermis superior y ocasionalmente en la dermis profunda, así como células dispersas entre las fibras de colágena.

El infiltrado inflamatorio predominante fue linfocitario con ocasionales células histiocíticas (macrófagos) o tipo epiteloides entre las fibras de colágena (Fig. 12B). La epidermis en general no se vio afectada, sólo en algunos casos las pápilas dérmicas estuvieron más profundas en las cicatrices hipertróficas (Fig. 13C) y con signos de espongirosis en cicatriz normotrófica (Fig. 12B) e hipertrófica (13C). Así mismo en la cicatriz hipertrófica de dos pacientes se observó una diferente localización del infiltrado inflamatorio con reminiscencias de anexos cutáneos y con una moderada acantosis en la epidermis.

Tabla 5. Análisis histopatológico del infiltrado inflamatorio en cicatriz normotrófica

	No. Pacientes	%
Leve	11	100
Perivascular	5	45.45
Intersticial	5	45.45

No valorable	1	9.10
--------------	---	------

Sólo una biopsia de cicatriz hipertrófica (Tabla 6) se caracterizó por un infiltrado inflamatorio moderado, presentando linfocitos alrededor de los vasos sanguíneos y células histiocíticas (macrófagos) entre las fibras de colágena. La epidermis generalmente no se vio afectada aunque a veces se observó un grado medio de exocitosis y/ó espongirosis pero no contenían queratinocitos necróticos.

Tabla 6. Análisis histopatológico del infiltrado inflamatorio en cicatriz hipertrófica

	<i>No.</i> <i>Pacientes</i>	<i>%</i>		<i>No.</i> <i>Pacientes</i>	<i>%</i>
Leve	8	88.8	Moderado	1	11.1
Perivascular	4	44.4	Perivascular	0	0
Perivascular, periadnexial	2	22.2	Perivascular, periadnexial	0	0
Perivascular, intersticial	1	11.1	Perivascular, intersticial	1	11.1
Intersticial	1	11.1	Intersticial	0	0

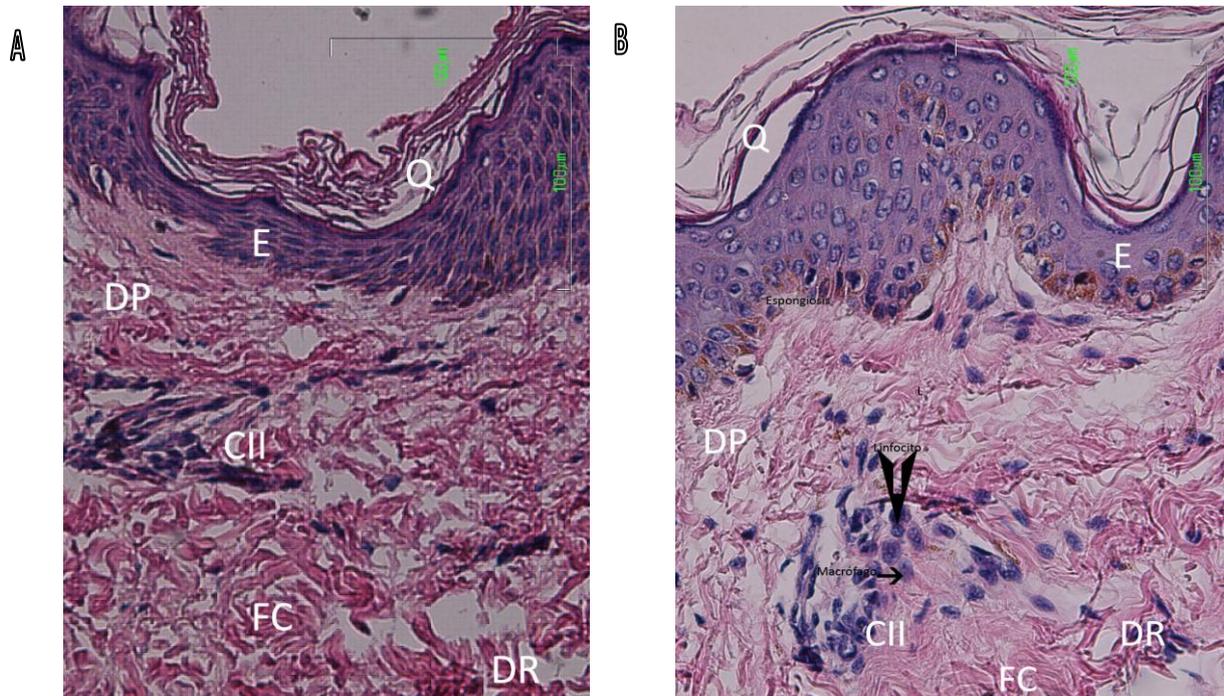


Fig. 12. En A se observa una fotomicrografía de una piel normal donde la epidermis (E) no presenta cambios histológicos, en la capa más superficial de esta se encuentra la queratina (Q). Por debajo de la Epidermis (E) también puede observarse la dermis papilar (DP) y la reticular (DR) en donde las fibras de colágena (FC) están bien organizadas. Las células del infiltrado inflamatorio (CII) también presentes en una piel normal se caracteriza por escasos linfocitos. En B biopsia de cicatriz normotrófica, en la epidermis (E) se observa una leve espongiosis y en la dermis un leve infiltrado inflamatorio (CII), donde predominan linfocitos y con ocasionales macrófagos en la unidad perivascular dérmica. Las fibras colágenicas (FC) en general bien orientadas. La barra representa 100µm, (40 X).

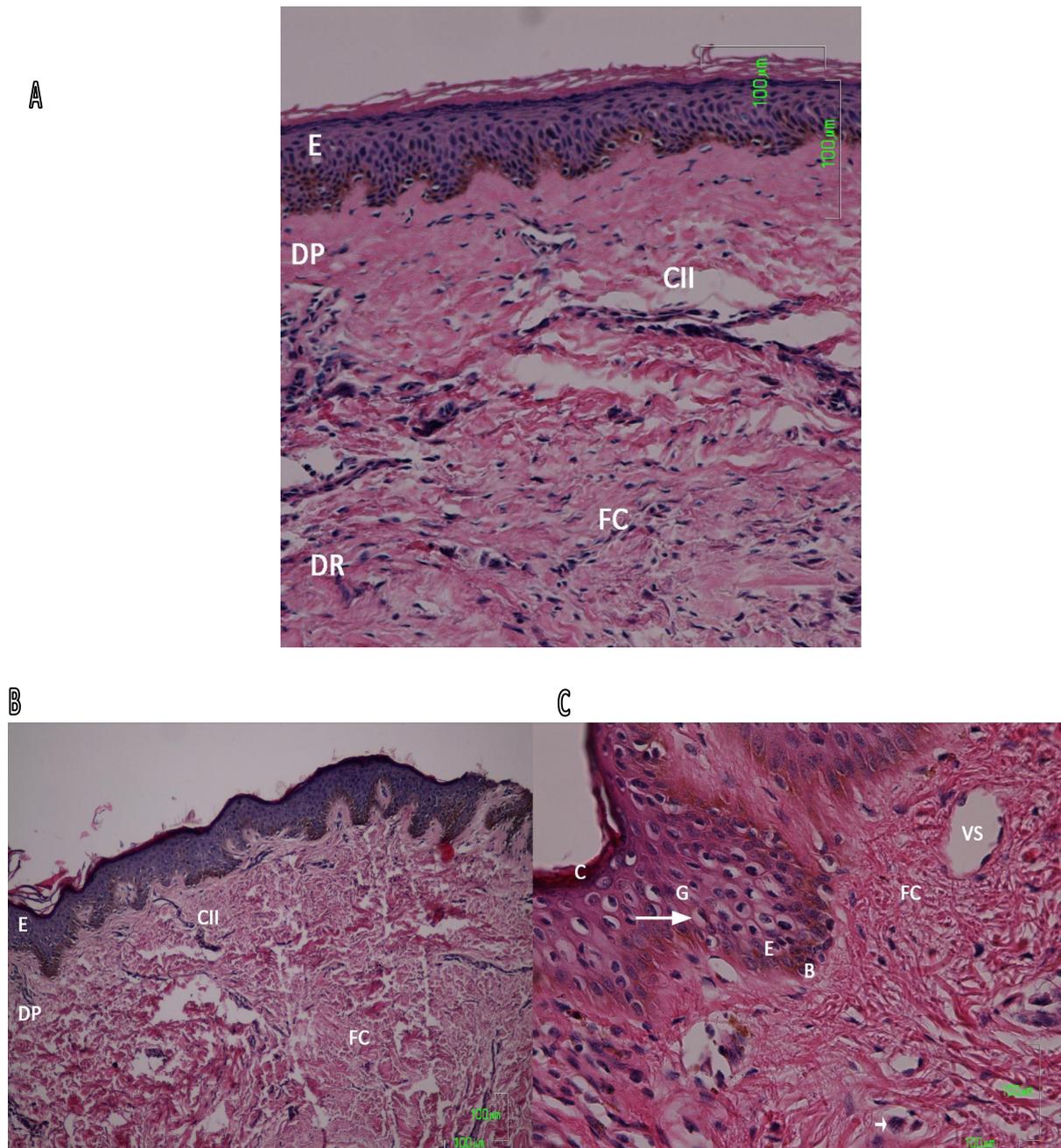


Figura 13. En **A** predominan las células del infiltrado inflamatorio (CII) y la arquitectura tisular se pierde por las fibras de colágena (FC) localizadas en espiral en la dermis reticular (DR). En **B** la cicatriz hipertrófica de otro paciente presentó un leve infiltrado inflamatorio y la epidermis no mostró cambios contundentes. Sin embargo en **C** en la epidermis de otro paciente con cicatriz hipertrófica se observan las capas normales de una epidermis (C) capa córnea, (G) capa granulosa, capa espinosa (E) y la capa basal (B), en la capa espinosa existen signos de vacuolización en los queratinocitos. En la dermis papilar se observan vasos sanguíneos (VS) y CII dentro de estos. La barra representa 100µm.

X.3. Hibridación *in situ* para detectar a los ARN mensajeros de IL-1 β y de TNF- α

Se realizaron las hibridaciones *in situ* para los diferentes pacientes, como se explica en la parte de metodología. Cinco (5) muestras de piel normal (PN), once (11) muestras de cicatriz normotrófica (NSc) y once (11) muestras de cicatrices hipertróficas (HSc) se clasificaron por sexo y edad, correlacionando con la región corporal de donde se tomó la muestra para observar si existiese una relación con la expresión de los mensajeros de IL-1 β y TNF- α . No se encontró ninguna correlación al aplicar el estadístico PRISM 5 Statics.

Posteriormente se realizó una cuantificación de la expresión del ARN para epidermis y otra para dermis con el programa IMAGE PRO PLUS, se contaron los núcleos, el área del tejido positiva a la marca y los núcleos positivos, se obtuvo un porcentaje y finalmente una relación ARN/N, donde N es el número de núcleos. Y se realizó el análisis estadístico utilizando con PRISM 5 Statics, a través de estadística de comparación, para 3 o más grupos (Kruskal-Wallis), se utilizaron intervalos de confianza del 95% y un nivel de significancia de 0.05. También se realizó la prueba de Dunnett's para identificar la significancia entre los grupos. Los datos obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 7. Cuantificación del ARN mensajero de IL-1 β expresado en las biopsias de piel normal (PN), cicatriz normotrófica (NSc) y cicatriz hipertrófica (HSc).

	Muestra	DERMIS IL-1 β						EPIDERMIS IL-1 β							
		Núcleos	Tejido	RNA	Tejido	RNA / N	Σ / #	Núcleos	Tejido	RNA	Tejido	RNA / N	Σ / #		
HSc	FKF 10 HSc	1.5	98.5	1.03	98.96	0.687	1.0896		16.01	83.99	22.29	77.71	1.392	1.64304	
	LALF 8 HSc	2.01	97.99	3.08	96.92	1.532	0.2925	SD	31.74	68.26	64.23	35.77	2.024	0.52059	SD
	MADF 15 HSc	1.1	98.9	0.9	99.1	0.818	1.5323	MAX	31.98	68.02	36.78	63.22	1.150	2.6004	MAX
	MSF 16 HSc	2.47	97.52	1.85	98.15	0.749	0.6867	MIN	10.12	89.88	11.13	88.87	1.100	1.0998	MIN
	RCAM 9 HSc	1.02	98.98	1.19	98.81	1.167			15.14	84.86	39.37	60.63	2.600		
	RCJM 14 HSc	1.65	98.35	1.91	98.08	1.158			28.49	71.51	55.86	44.14	1.961		
	RROM 4 HSc	1.62	98.38	2.24	97.76	1.383									
	SGGF 22 HSc	1.78	98.21	2.28	97.72	1.281			10.59	89.41	17.37	82.63	1.640		
	STLAM 12 HSc	4.05	95.95	4.18	95.82	1.032			62	38	79.19	20.81	1.277		
	VEM 13 HSc														
NSc	BGF 3 NSc	3.43	96.57	4.3	95.7	1.254	1.2751		12.9	87.1	12.4	87.6	0.961	1.05784	
	CNOAF 18 NSc	5.95	94.05	9	91	1.513	0.2325	SD	53.94	46.06	54.07	45.93	1.002	0.35724	SD
	GMF 35 NSc	1.92	98.08	2.25	97.75	1.172	1.6232	MAX	22.53	77.47	40.48	59.52	1.797	1.79672	MAX

	MVBSF 15 NSc	0.88	99.12	1.28	98.71	1.455	0.8698	MIN						0.64896	MIN
	PLBF 8 NSc	3.63	96.37	4.68	95.32	1.289			22.73	77.27	16.6	83.4	0.730		
	SMAM 16 NSc	2.76	97.24	4.48	95.52	1.623			49.55	50.45	45.69	54.31	0.922		
	TAF 37 NSc	2.66	97.34	3.3	96.7	1.241			27.25	72.75	33.44	66.56	1.227		
	VMLF 26 NSc	6.95	93.05	7.37	92.63	1.060			26.46	73.54	31.06	68.94	1.174		
	VYF 12 NSc	1.69	98.31	1.47	98.53	0.870			22.59	77.41	14.66	85.34	0.649		
	NM 17 NSc														
	RCAM 9 NSc														
PN	CNRM 50 PN	0.35	99.65	0.27	99.73	0.771	0.7765		21.53	78.47	7	93	0.325	0.81124	
	MVBSF 15 PN	1.46	98.54	1.12	98.88	0.767	0.0127	SD	34.41	65.59	38.51	61.49	1.119	0.34124	SD
	TAF 37 PN	1.77	98.23	1.4	98.6	0.791	0.791	MAX	17.27	82.73	16.14	83.86	0.935	1.11915	MAX
	MSF 16 PN						0.7671	MIN						0.32513	MIN
	REF 27 PN								4.78	95.22	4.14	95.86	0.866		

SD, desviación estándar; MAX, número máximo; MIN, número mínimo. Se encontró diferencias de $\leq .005$ entre los seis grupos utilizando Kruskal-Wallis y utilizando Dunnet's se encontró diferencias $\leq .05$ entre la epidermis de la cicatriz hipertrófica y la dermis de la piel normal.

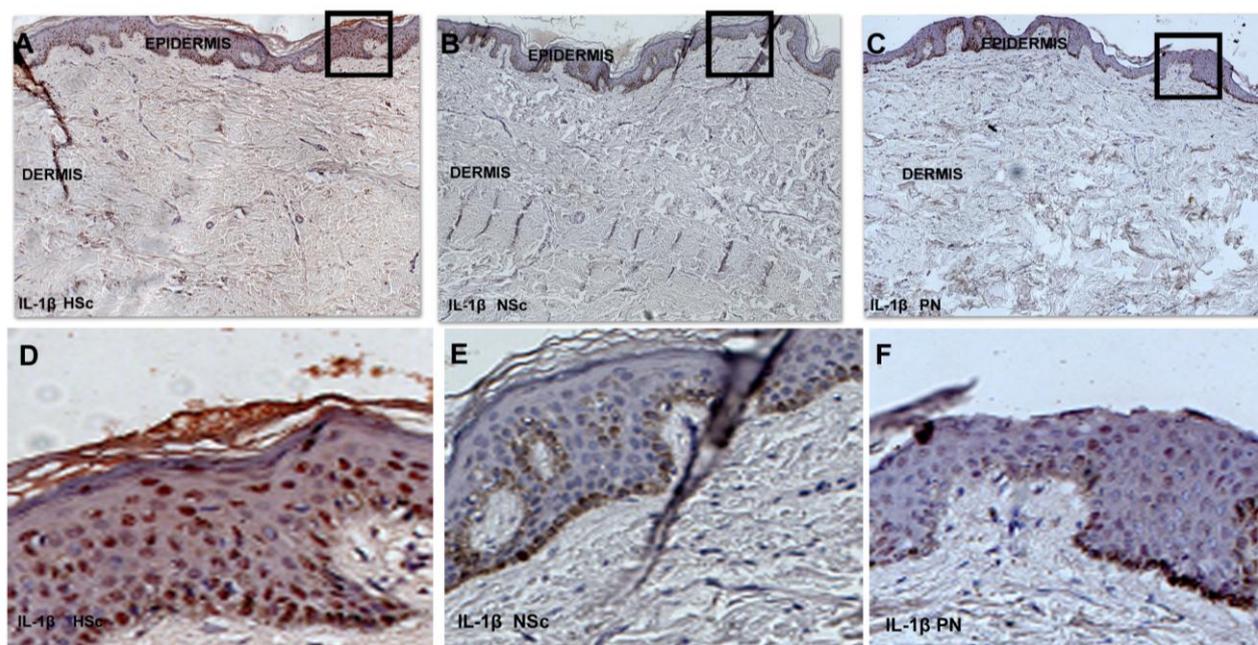


Fig. 16. Microfotografías de la hibridación *in situ* para IL-1 β en biopsias de HSc, NSc y PN. A, B y C son fotografías tomadas a 100X, D, E y F son aumentos de los recuadros señalados respectivamente para enfatizar la expresión del mensajero de IL-1 β en los queratinocitos en las biopsias tomadas de pacientes con cicatriz hipertrófica posquemadura.

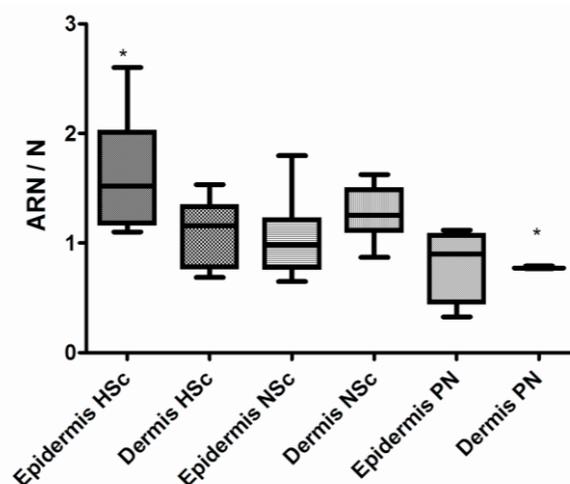


Fig. 17. Cuantificación de las secciones de piel procesadas por ISH con sondas para IL-1 β marcadas bioquímicamente con AEC. Muestran el cociente de la cantidad de ARN / N, donde N son los Núcleos. Las barras indican desviación estándar. * $P \leq 0.05$ Epidermis HSc vs Dermis PN.

Se encontró que la expresión del ARN mensajero de IL-1 β es mayor en la cicatriz hipertrófica en comparación con la piel normal y la cicatriz normotrófica, sin embargo al segmentar la piel, sólo se encontraron diferencias significativas al comparar la dermis de la piel normal vs la epidermis de la cicatriz hipertrófica. La expresión del ARN mensajero de IL-1 β no permanece en un nivel constante, existe un incremento de la expresión del mensajero en el caso de la hipertrofia cutánea posquemadura.

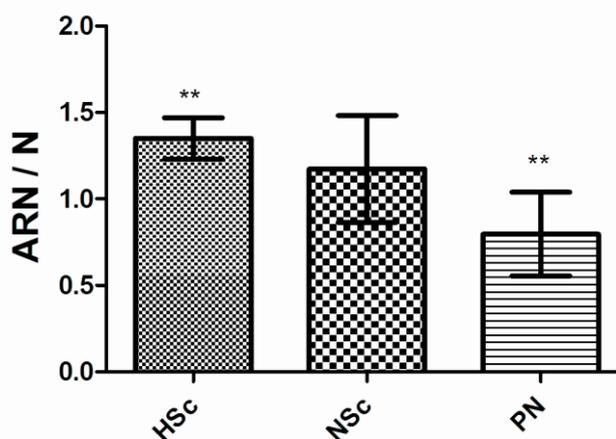


Fig. 18 Cuantificación del ARN mensajero de IL-1 β en las secciones de piel completas. Muestran el cociente de la cantidad de ARN / N, donde N son los Núcleos. Las barras indican desviación estándar. * $P \leq 0.05$ HSc vs PN.

Para TNF- α , se realizó la misma cuantificación de la expresión del ARN para epidermis y para dermis con el programa IMAGE PRO PLUS, se contaron de igual forma los núcleos positivos, el área del tejido positiva a la marca, y se obtuvo un porcentaje. Se obtuvo una relación ARN/N, donde N es el número de núcleos. Y se realizó el análisis estadístico utilizando con PRISM 5 Statics, a través de estadística de comparación, para 3 o más grupos (Kruskal-Wallis), se utilizaron intervalos de confianza del 95% y un nivel de significancia de 0.05. También se realizó la prueba de Dunnet's para identificar la significancia entre los grupos. Los datos obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 8. Cuantificación del ARN mensajero de TNF- α expresado en las biopsias de piel normal (PN), cicatriz normotrófica (NSc) y cicatriz hipertrófica (HSc).

	Muestra	DERMIS TNF- α						EPIDERMIS TNF- α					
		Núcleos	Tejido	RNA	Tejido	RNA/Núcleos		Núcleos	Tejido	RNA	Tejido	RNA/Núcleos	
HSc	FKF 10 HSc	3.49	96.51	6.39	93.61	1.830945559	1.260872	30.28	69.72	70.27	29.73	2.320673712	1.506645
	LALF 8 HSc	3.04	96.96	3.75	96.25	1.233552632	0.346545 SD	45.92	54.08	65.73	34.27	1.431402439	0.525277 SD
	MADF 15 HSc	3.46	96.54	3.3	96.7	0.953757225	1.830946 MAX						2.320674 MAX
	MSF 16 HSc	8.48	91.52	8.85	91.15	1.043632075	0.810289 MIN	44.12	55.88	51.64	48.36	1.170444243	0.74593 MIN
	RCAM 9 HSc												
	RCJM 14 HSc	5.93	94.07	6.83	93.17	1.151770658		49.2	50.8	58.2	41.8	1.182926829	
	RROM 4 HSc	3.13	96.86	4.51	95.49	1.440894569		44.84	55.16	66.86	33.14	1.491079393	
	SGGF 22 HSc	1.48	98.52	2.58	97.42	1.743243243		17.53	82.47	38.38	61.62	2.189389618	
	STLAM 12 HSc	8.64	91.36	8.2	91.8	0.949074074		26.41	73.59	19.7	80.3	0.745929572	
	VEM 13 HSc	3.11	96.89	2.52	97.48	0.810289389		13.37	86.63	20.34	79.66	1.52131638	
VEM 13' HSc	6.4	93.6	9.29	90.71	1.4515625								
NSc	BGF 3 NSc						1.197987						1.193228
	CNOAF 18 NSc	2.09	97.91	2.81	97.19	1.344497608	0.35058 SD	18.92	81.08	32.98	67.02	1.743128964	0.932508 SD
	GMF 35 NSc	5.52	94.48	4.88	95.12	0.884057971	1.691358 MAX	18	82	10.38	89.62	0.576666667	2.929724 MAX
	MVBSF 15 NSc	2.52	97.48	3.02	96.98	1.198412698	0.617117 MIN	51.63	48.37	34.53	65.47	0.668797211	0.077922 MIN
	PLBF 8 NSc	4.44	95.56	2.74	97.26	0.617117117		11.55	88.45	0.9	99.1	0.077922078	
	SMAM 16 NSc	1.62	98.38	2.74	97.26	1.691358025		13.65	86.35	16.17	83.83	1.184615385	
	TAF 37 NSc												
	VMLF 26 NSc												
	VYF 12 NSc												
	NM 17 NSc	3.58	96.42	4.58	95.42	1.279329609		17.36	82.64	50.86	49.14	2.929723502	
RCAM 9 NSc	0.97	99.03	1.33	98.67	1.371134021		13.8	86.2	16.17	83.83	1.17173913		
PN	CNRM 50 PN	0.8	99.2	0.75	99.25	0.9375	1.145221	20.06	79.94	17.66	82.34	0.880358923	0.582157
	MVBSF 15 PN	0.17	99.83	0.23	99.77	1.352941176	0.293761 SD	28.42	71.58	8.07	91.93	0.283954961	0.421721 SD

TAF 37 PN						1.352941	MAX						0.880359	MAX
MSF 16 PN						0.9375	MIN						0.283955	MIN
REF 27 PN														

SD, desviación estándar; MAX, número máximo; MIN, número mínimo. No se encontró diferencias entre los seis grupos utilizando Kruskal-Wallis ni con la prueba estadística de Dunnet's.

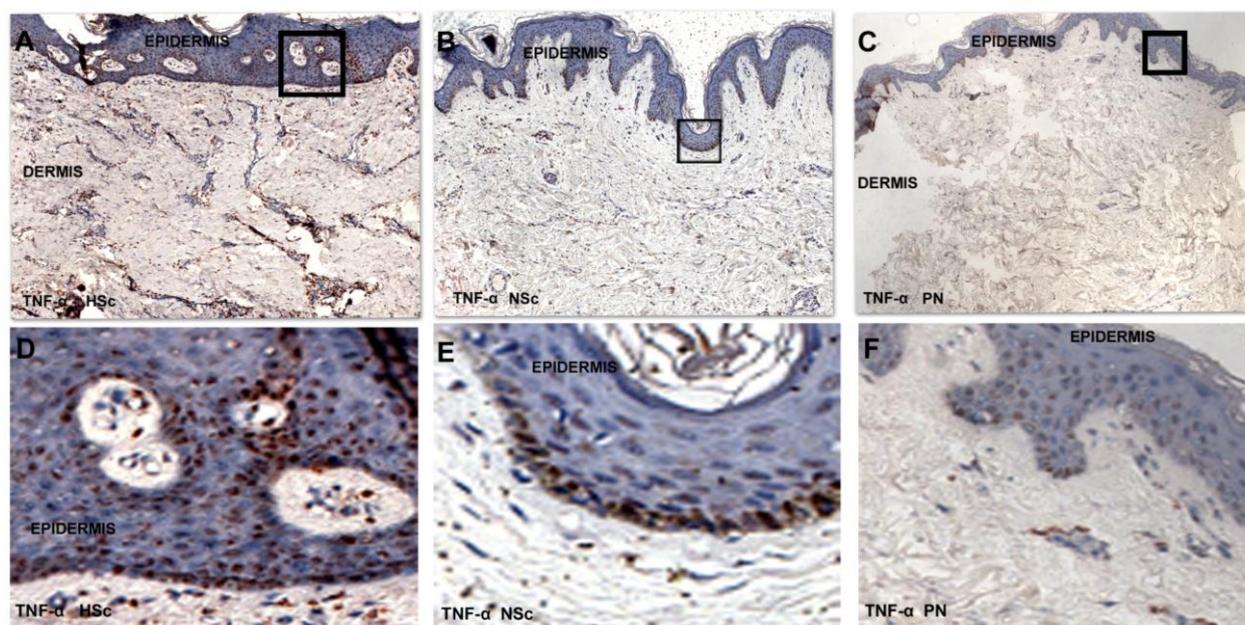


Fig. 19. Microfotografías de la hibridación *in situ* para TNF- α en biopsias de HSc, NSc y PN. A, B y C son fotografías tomadas a 100X, D, E y F son aumentos de los recuadros señalados respectivamente para enfatizar la expresión del mensajero en los queratinocitos de las biopsias tomadas de pacientes con cicatriz hipertrófica.

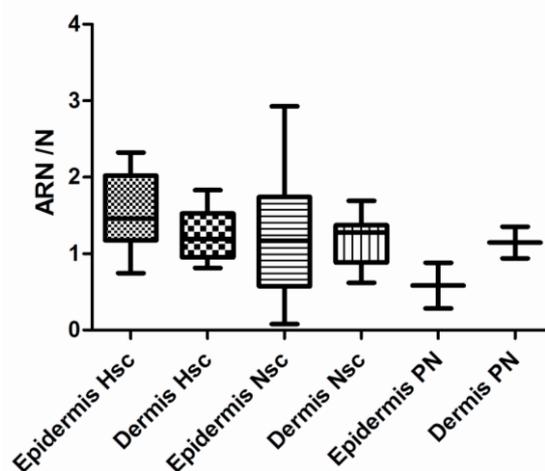


Fig. 20. Cuantificación de las secciones de piel procesadas por ISH con sondas para TNF- α marcadas bioquímicamente con AEC. Muestran el cociente de la cantidad de ARN / N, donde N son los Núcleos. Las barras indican desviación estándar. No hubo diferencias significativas.

Se encontró que la expresión del ARN mensajero de TNF- α no tuvo diferencias significativas entre los tres tipos de biopsias. La expresión del mensajero al parecer se mantiene en un nivel constante. Cuando se grafican los datos en conjunto se puede observar que efectivamente no existen diferencias significativas para TNF- α .

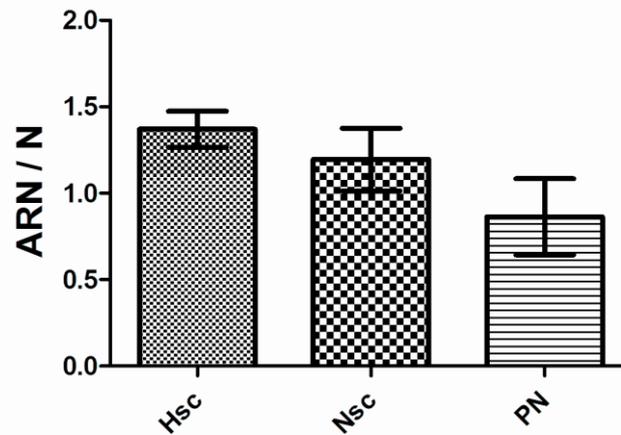


Fig. 21. Cuantificación del ARN mensajero de TNF- α en las secciones de piel completas. Muestran el cociente de la cantidad de ARN / N, donde N son los Núcleos.

XI. DISCUSIÓN.

La quemadura corporal es una violenta agresión que modifica todos los mecanismos de la homeostasis orgánica y por su connotación clínica y social es un problema que enfrentan los servicios médicos en la sociedad contemporánea.

En pacientes quemados con más del 20 % de superficie corporal comprometida, desde el punto de vista fisiopatológico se desarrolla un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), así también se puede desarrollar una “sepsis”, independientemente de la etiología de la quemadura, evolución inicial, manejo terapéutico y respuesta individual, la sepsis generalmente complica la evolución del gran quemado. La desregulación de estos mecanismos conduce al daño de los tejidos propios cuyas consecuencias se expresan en alteraciones morfofuncionales de todos los sistemas, en particular es el sistema cutáneo quien nos interesa evaluar después de un daño posquemadura.

Una **cicatriz hipertrófica** es una patología de origen post-traumático, que se caracteriza por presentar un daño en la dermis profunda combinado con una alteración en los factores que conllevan a la cicatrización debido a la presencia del proceso inflamatorio crónico. Se sintetizan un exceso de componentes de matriz extracelular (MEC) predominantemente colágena, además de presentar un incremento en la contractilidad, participando diferentes tipos celulares, factores de crecimiento, quimiocinas y proteasas. Durante este trabajo experimental se analizó el papel de los ARN mensajeros de IL-1 β y de TNF- α en la cicatriz hipertrófica posquemadura, por considerarse citocinas profibrogénicas ^{(84 Kovacs y Di Pietro, 1994).}

Lo primero que encontramos al analizar histopatológicamente las biopsias de piel normal, cicatriz normotrófica y cicatriz hipertrófica, es que las muestras no presentaban un infiltrado inflamatorio abundante, es decir la cantidad de células del infiltrado inflamatorio presentes en las cicatrices hipertróficas era leve muy similar a las muestras de cicatriz normal e inclusive piel normal (diferentes perfiles de cicatrices hipertróficas). Lo que difiere del grupo de Castagnoli que mencionan que las cicatrices hipertróficas son causa de un proceso inflamatorio crónico donde las células del sistema

inmune presentes abundantemente serían las encargadas de secretar citocinas proinflamatorias y profibrogénicas que perpetuarían el proceso volviéndolo crónico. A pesar de que nuestro primer hallazgo es morfológico, pocas células inflamatorias (linfocitos en su mayoría y algunos macrófagos en zonas perivasculares), nosotros no podemos afirmar nada acerca del grado de activación de estas células ya que no las marcamos con moléculas membranales como MHCII o bien moléculas accesorias CD3, CD4 o CD8 positivas.

Por otro lado encontramos, un incremento en la expresión *in situ* de IL-1 β en el caso de la cicatriz hipertrófica al compararla con la piel normal, sin embargo a la fecha no existen datos de la expresión génica de IL-1 β en cicatriz hipertrófica posquemadura, a pesar de conocerse que tiene la capacidad de degradar matriz extracelular en procesos fibróticos ^{(28, Arméndariz Borunda et al., 1992; 30, Soliz Herruzo, 1988).}

En el caso de la expresión *in situ* de TNF- α no encontramos diferencias significativas entre los grupos estudiados, sin embargo consideramos que existe una tendencia hacia el incremento de expresión en el caso de las muestras con cicatriz hipertrófica. Estos datos no coinciden con los reportes de ⁽⁶⁵⁾ Peruccio (1994) y de ⁽⁶⁹⁾ Zhang (2004) para TNF- α , donde reportan una disminución en la expresión de TNF- α , aunque sus hallazgos son con una metodología diferente (RT-PCR) a la que se utilizó en este trabajo.

A pesar de que la secuela posquemadura se había considerado un problema local del sistema inmune cutáneo, recientemente en el 2006 el grupo del Dr Tredget ⁽⁸⁵⁾ basado en evidencias en animales y en humanos propuso que los pacientes con secuelas posquemaduras podrían tener niveles incrementados en la síntesis de citocinas con patrón de respuesta inmunológica Th2 (IL4, IL5, IL-10 e IL-13); y que esta respuesta inmunológica hacia citocinas Th2 era de tipo sistémica, sin embargo el monitoreo a sus pacientes durante un año después del daño tisular, y nuestras biopsias son de pacientes con más de un año de evolución. Nosotros creemos que es necesario evaluar a nivel sistémico la producción de estas citocinas ya sea en suero o en células de sangre periférica como lo hace este grupo en Canadá, y monitorear en nuestros pacientes conforme la cicatriz va madurando.

⁽⁸⁶⁾ Gretten et al., 2007 propone que cuando existe un incremento en la secreción de la proteína de IL-1 β no siempre está asociado con el incremento en la producción del mRNA de la pro-IL1 β , si no es más bien el resultado en el incremento de la apoptosis y activación de la Caspasa 1 (ICE). Ellos correlacionaron directamente la producción de la proteína con la del mensajero. Nosotros, de manera notable encontramos que morfológicamente, las secuelas hipertróficas pueden deber su formación a un mayor número de queratinocitos, y proponemos que probablemente expresan mayor cantidad del ARN mensajero de IL-1 β al compararse con una piel normal, lo que concuerda con ⁽⁷⁴⁾ Niessen (2001) en darle un papel predominante a la epidermis en cuanto a la fisiopatogenia de la hipertrofia cutánea se refiere.

Hoy en día está bien demostrado que para algunas citocinas, como IL-1 β y TNF- α existe una regulación transcripcional y traduccional regulada de manera excluyente; así que nuestros datos muestran que *in situ* hay una transcripción de novo (activa) en las cicatrices hipertróficas para ambos tipos de citocinas, y sería interesante explorar para los mismos pacientes la expresión de la proteína, si los datos encontrados difirieran del mensajero entonces podríamos afirmar una regulación transcripcional y traduccional de manera excluyente ^(87, Hernández Rodríguez et al, 2004).

Se ha propuesto que TNF- α regula la cicatrización de los pacientes llevando a una degradación y remodelación adecuada de las fibras de colágena, sin embargo nosotros no encontramos diferencias significativas a nivel del mensajero entre los grupos, pero consideramos que es posible que exista un mecanismo postranscripcional ^(88, Schindker et al., 1990) no bien regulado que modifique el balance entre síntesis y degradación de las fibras de colágena, conforme va madurando la cicatriz.

El análisis de la expresión *in situ* de las citocinas mostró variaciones intra-sujetos, consideramos que esto puede deberse a diferencias en la respuesta inmune de los sujetos (debido a variaciones de una

parte de la lesión a otra), es decir nosotros observamos poca cantidad de células inmunes pero no sabemos que pasaba con su actividad y se ha reportado que IL1- β , es una citocina con mayor importancia en la primeras fases de la cicatrización (formación de granulomas) mientras que TNF- α puede participar en la última parte de las funciones efectoras de los granulomas ^(89, Phillips et al., 2006). Lo que nos lleva a pensar que la liberación de citocinas, en las primeras fases de cicatrización no sólo amplifica la reacción inflamatoria si no que media la pleiotropía del tejido dañado activando también la inmunidad humoral ^(90, Sun et al., 2000). En este punto nosotros enfatizamos que nuestras muestras pueden encontrarse en la fase tardía y/ó final de la cicatrización, que nos llevarían a localizar una expresión de los mensajeros de IL1- β y de TNF- α a veces menor y otras veces mayor dependiendo del paciente; es decir la diferencia en la respuesta inflamatoria sistémica puede ser determinante para aumentar o disminuir la expresión de las mismas citocinas *in situ*, mediante efectos autócrinos, parácrinos ó endocrinos. Dicho efecto esta bien estudiado en enfermedades como la vasculitis granulomatosa de grandes vasos ^(91, Weyand et al., 1997) en donde se ha reportado que en general los pacientes con niveles mas altos de ARN mensajero *in situ* para IL-1 β tienen una respuesta inflamatoria sistémica más prolongada.

En general existe una variabilidad de los pacientes para producir citocinas debido a que intervienen procesos no sólo de transcripción de la citocina, si no también la regulación post-transcripcional, intercambio del proteasoma mediado por citocinas, el procesamiento de las citocinas por sus enzimas convertidoras, la regulación del receptor de citocinas, receptores solubles de citocinas, receptores accesorios, antagonistas naturales de las citocinas, todos estos procesos participan en concierto para determinar la disponibilidad funcional de una citocina cualquiera.

Sin embargo, es bien conocido que IL-1 β y TNF- α tienen efectos inhibitorios sobre el gen de la colágena I, aunque no se conocen exactamente los mecanismos de estos efectos, pero probablemente se encuentren mediados por segundos mensajeros como el AMP cíclico, el calcio intracelular y por proteínas reguladoras de la transcripción. O bien también se ha propuesto un

lenguaje cruzado (cross-talk) entre IL-1 β y TGF- β ^(92, Lu et al., 2007) y entre TNF- α y TGF- β ^(77, Goldberg et al., 2007) por lo que es posible considerar que existe un control cruzado dosis dependiente de la expresión de estos tres genes, los cuáles al parecer tienen importantes efectos en sistemas biológicos.

Por otro lado, todo polimorfismo es un reflejo del genotipo de los individuos (constitución alélica para un locus determinado o para un conjunto de ellos). Surge, por tanto, el concepto de *individualidad genética*, como la presencia en todo individuo de un genoma con una secuencia característica, única para ese individuo. Las variaciones en secuencias promotoras probablemente perturben la expresión del gen. Por tanto, el polimorfismo en regiones génicas no codificantes puede manifestarse o no en un efecto fenotípico. En este contexto, sabemos que los tres genes que codifican para la proteína IL-1, son genes autosómicos dominantes, esto por que cuando aparece un polimorfismo aunque tan sólo sea en uno de los alelos, se aprecian cantidades mayores de proteína de IL-1, la cual está fuertemente asociada a la actividad de algunas enfermedades con inflamación crónica.

Para TNF- α también se han estudiado los polimorfismos, el alelo en la posición -308 (denotado como TNF2) ha sido el más estudiado y está asociado a una alta transcripción del gen de TNF- α . También se sabe que una proteína reguladora de la transcripción, como la tristetrapolina (TTP), puede desencadenar una expresión exagerada de TNF- α con componentes inflamatorios locales y sistémicos, fenómeno aún no comprobado en humanos.

Así, si se encontrarán hallazgos relativos a los polimorfismos de la región promotora de ambos genes de IL-1 y de TNF que incidieran en los niveles de estas citocinas, podrían llevarnos a postular que una regulación postranscripcional podría ser de utilidad terapéutica.

XII. CONCLUSIONES

1. Las secuelas hipertróficas analizadas en este trabajo presentaron un leve infiltrado inflamatorio, lo cuál no corresponde a lo citado donde se menciona que el severo infiltrado inflamatorio es causa de la cicatriz hipertrófica, por lo que aún falta ahondar en este tema.
2. Existe una expresión incrementada del ARN mensajero de IL-1 β para la cicatriz hipertrófica posquemadura, al compararse contra la piel normal.
3. No existen diferencias significativas para la expresión del ARN mensajero de TNF- α en la cicatriz hipertrófica posquemadura al compararse con piel normal y cicatriz normal.
4. Las secuelas hipertróficas podrían deber su formación a un mayor número de queratinocitos que expresan mayor cantidad del ARN mensajero de IL-1 β al comparase con una piel normal.

XIII. PERSPECTIVAS.

La presencia de polimorfismos genéticos en el gen de la IL-1 β y /ó de TNF- α , pueden ser factores de riesgo para padecer cicatrices hipertróficas.

Es importante determinar en que fase de la cicatrización normal se lleva a cabo el desequilibrio de la expresión de los genes de IL1- β y TNF- α , para poder tener una terapéutica mas dirigida.

XIV. LITERATURA CITADA.

1. Chiappe A. 2004. Cicatrización. Sociedad Colombiana de Cirugía Plástica. http://www.susmedicos.com/art_cicatrices_Chiappe.htm.
2. Pimentel Luis Castro. 2000. Quemaduras. Capítulo 94. Pp: 869-884.
3. Hoyos-Franco M. A., Jaramillo-González N. C., Molina-Díaz M. E., Valverde S. y Posso C. 2007. Evaluación de la superficie corporal quemada en pacientes del hospital universitario San Vicente de Paul, Brasil. IATREIA. 20 (1):21-28.
4. Beato Canfux A., Borbón-Mendoza J., González-Plana G. y Mariño F J. 2001. Clasificación del herido por quemaduras en situaciones normales y de contingencia. Revista Cubana de Medicina Militar. 30 (2) 120-124.
5. Ferrada Ricardo. 2000. Quemaduras. Capítulo 20. Pp: 218-235.
6. Andrades P, Susana Benítez, Arturo Prado. 2006. Recomendaciones para el manejo de cicatrices hipertróficas y queloides. Guidelines for the treatment of keloids and hypertrophic scars. Rev. Chilena de Cirugía. 58 (2):78-88.
7. Salem Z, Christian, Vidal V, Alejandra, Mariangel P. 2002. Cicatrices hipertróficas y queloides. *Cuad. cir. (Valdivia)*. Vol. 16, No. 1, pp. 77-86.
8. Krötzch-Gómez F. E., Furuzawa Carballeda J., Reytez-Márquez R., Quróz-Hernández E y Díaz de León L. 1998. Cytokine Expression is Downregulated by Collagen-Polyvinilpyrrolidone in Hypertrophic scars. J. Invest. Dermatology. 141 (5): 828-834.
9. Edward J. y Steffen G. 1982. Collagen: An Overview in Methods in Enzymology. Pp 3-32.
10. Burgerson M y Olsen B, 1990. The contribution of collagens proteins to tissue specific matrix assemblies. Curr. Opinion Cell Biol. 2:830-838.
11. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. Molecular Biology of Cell. 4th Edition. Garland Publisher.
12. Hernández-Nazara Z E., Martínez-López E., Domínguez J. A., 2005. Mecanismos moleculares de la regulación transcripcional de colágena $\alpha 1$ (I) por las células estelares hepáticas. Investigación en Salud. Vol. VII. Universidad de Guadalajara. Pp: 33-39.

13. Lichter A., Stover, M.L., Angilly, J., Kream, B. y Rowe. D.W. 1989. Isolation and characterization of the rat alpha 1(I) collagen promoter. Regulation by 1, 25-dihydroxyvitamin. D. *J. Biol Chem.* 264:3072-3077.
14. Harbers K., Kuehn, M., Delius. H. y Jaenisch. R. 1984. Insertion of retrovirus into the first intron of $\alpha 1$ (I) collagen gene leads to embryonic lethal mutation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 1504-1508.
15. Chu M. L., de Wet. W., Bernard. M. y Ramírez, F. 1985. Fine structural analysis of the human pro- $\alpha 1$ (I) collagen gene promoter structure. Alu 1 repeats and polymorphic transcripts. *J. Biol. Chem.* 260. 2315-2320.
16. Liau G., Mudryj, M. y De Crombrugge, B. 1985. Identification of the promoter and first exon of the mouse $\alpha 1$ (III) collagen gene. *Biol Chem.* 260, 3773-3777.
17. Rossow C. M. S., Vergeer W. P., du Plooy, S.J., Bernard M.P., Ramirez F. y de Wet, J. 1987. DNA sequences in the first intron of the pro- $\alpha 1$ (I) collagen gene enhance transcription. *J. Biol Chem.* 262. 15151-15157.
18. Karsenty O. y De Crombrugge. B. 1991. Conservation of binding sites for regulatory factors in the coordinately expressed $\alpha 1$ (I) and $\alpha 2$ (I) collagen promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177. 538-544.
19. Ravazzolo R., Karsenty. G. y De Crombrugge. B. 1991. A fibroblast-specific factor binds to an upstream negative control element in the promoter of the mouse alpha 1(I) collagen gene. *J. Biol Chem.* 266. 7382-7387.
20. Owen T. A., Bortell, R., Yocum, S. A., Smock. S. L., Zhang, M., Abate, O., Shalhoub, V., Atonin. N., Wright. K. L., Van-Wijnen, A. L. 1990. Coordinate occupancy of AP-1 sites in the vitamin D-responsive and CCAAT box elements by fos-jun in the osteocalcin gene: model for phenotype suppression of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 9990-9994.
21. Ritzenthaler J. D., Goldstein. R. H., Fine, A., Lichtler, A., Rowe, D.W. y Smith, B. D. 1991. Transforming-growth-factor- β activation elements in the distal promoter regions of the rat $\alpha 1$ type 1 collagen gene. *Biochem. J.* 280, 157-162.
22. Bornstein P., McKay. J., Morishima, J. K. Devarayalu S. y Gelinis, R. E. 1987. Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional control of the human $\alpha 1$ (I) collagen gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84. 8869-8873.

23. Paglia L., Wilczek, J. de Leon, L.D., Martin. G. R., Horlein, D y Muller. P. 1979. Inhibition of procollagen cell-free synthesis by aminoterminal extension peptides. *Biochemistry* 18. 5030-5033.
24. Bornstein P. y Sage. H. 1989. Regulation of collagen gene expression. *Prog. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.* 37.67-106.
25. Meyer D. H., Bachem, M. G., y Gressner. A. M. 1990. Modulation of hepatic lipocyte proteoglycan synthesis and proliferation by kupffer cell-derived transforming growth factors type β 1 and type α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171. 1122-1129.
26. Bachem M. G., Meyer. D., Melchior. R., Sell. KM. y Gressner, A. M. 1992. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblast like cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J. Clin. Invest.* 89,19-27.
27. Kahari V. M., Chen. Y. Q., Su. M. W., Ramírez. F. y Uitto, J. 1990. Tumor necrosis factor α and interferon- γ suppress the activation of human type 1 collagen gene expression by transforming growth factor- β 1. *J. Clin. Invest.* 86. 1489-1495.
28. Arméndariz-Borunda J., Katayama y Seyer. D M. 1992. Transcriptional mechanisms of type 1 collagen gene expression are differentially regulated by interleukin-1 β , tumor necrosis factor α . and transforming growth factor β in Ito cells. *J. Biol. Chem.* 267, 14316-14321.
29. Daireaux Redini E., Loyau, G. y Pujol, J. P. 1990. Effects of associated cytokines (IL-1, TNF-alpha, IFN-gamma and TGF-beta) on collagen and glycosaminoglycan production by cultured human synovial cells. *Int. J. Tissue React.* 12. 21-31.
30. Solís-Herruzo J. A. 1988. Bases moleculares de la fibrosis hepática. *Gastroent y Hepatol.* 11, 463-483.
31. Mauviel A., Heino, J., Kahari. V. M., Hartmann. D. J., Loyau, G., Pujol, J. P. y Vuorio, E. 1991. Comparative effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on collagen production and corresponding procollagen mRNA levels in human dermal fibroblasts. *Invest. Dermatol.* 96, 243-249.
32. Smith D. D., Gowen. M. y Mundy. G.R. 1987. Effects of interferon- γ and other cytokine on collagen synthesis in fetal rat bone cultures. *Endocrinology* 120, 2494-2499.
33. Nanes M. S., McKoy, W. M. y Marx, S. J. 1989. Inhibitor effects of tumor necrosis factor α and interferon γ on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis by rat osteosarcoma cells (ROS 17/2.8). *Endocrinology* 124. 339-345.

34. Flaheny M. y Chojkier. M. 1986. Selective inhibition of collagen synthesis by the Ca^{2+} ionophore A23187 in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261. 12060-12065.
35. Perr H. A., Graham M. F., Diegelman R. F. y Downs R. W. 1988. Cyclic nucleotides regulate collagen production by human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology.* 96,152 1-1528.
36. Nicola N A. 1997. Guidebook to cytokines and their receptors. Oxford University Press. Pp 261.
37. Gehrke L., Jobling, S. A., Paik., L.S., McDonald, B., Rosenwasser, L. J. Y Auron, P. E. 1990. *J. Biol. Chem.* 265:5922-5925.
38. Yamato K., El-Hajjaoui. Z., Kuo. J.F. & Koeffler. H.P. 1989. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Signals for its mRNA accumulation. *Blood* 74. 1314-1320.
39. Knudse P. J., Dinarello, C. A., y Strom, T. B. 1986. *J Immunol.* 137:3189-3194.
40. Dinarello A. C., 1994. Interleukin-1. In: Chapter 3, Cytokine Handbook, 2a Ed. Academic Press. 30-55.
41. Shen X., Tlan Z., Holtzman M, y Gao B. 2000. *Cross-talk between interleukin 1b (IL-1b) and IL-6 signalling pathways: IL-1b selectively inhibits IL-6-activated signal transducer and activator of transcription factor 1 (STAT1) by a proteasome-dependent mechanism.* *Biochem. J.* 352, 913-919.
42. Fiers W.1991. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS. Leu.* 285. 199-212.
43. Kriegler N., Perez. G., DeFay, K. Albert, I y Lu, S. D. 1988. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53. 45-53.
44. Philip R. y Epstein. L.B. 1986. Tumour necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself y interferon and interleukin-1. *Nature* 323, 86-89.
45. Scuderi P. 1989. Suppression of human leukocyte tumor necrosis factor secretion by the serine protease inhibitor p-toluene sulfonyl-L-arginine methyl ester (TAME). *Immunol* 143,168-173.
46. Green S., Dobrjansky, A., Carswell, E.A., Kassel. R. L., Oíd, L. J., Fiore, N. y Schwartz. M.K. 1976. Partial purification of a serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 381-385.
47. Jones E. Y. Stuart. D. I. y Walker, N. P. C. 1990. The three-dimensional structure of TNF at 2.9 Å resolution. In: Tumor Necrosis Factor: Structure, Mechanism of Action, Role in Disease and Therapy. Basel, Karger: 31-37.
48. Mark D. F., Wang, A. y Levenson, C. 1987. Site-specific mutagenesis to modify the human tumor necrosis factor gene. *Methods Enzymol.* 154:403.

49. Nedwin G. E., Naylor, S. L., Sakaguchi, A. Y., Smith, D., Jarret, N. J., Pennica, D., Goeddel, D. V. y Gray, P. W. 1985. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucl Acid. Res.* 13, 6361-6373.
50. Strominger J. L. 1986. Human major hystocompatibility complex genes: class 1 antigens and tumor necrosis factor. Cold Spring Harbor Symposium. Quant. Biol. 1, 63.
51. Spriggs D. R., Sherman, M. L., Imamura, K., Mohri, M., Rodriguez, O., Robbins, G. y Kufe. D.W. 1992. Phospholipase A2 activation and autoinduction of tumor necrosis factor gene expression by tumor necrosis factor. *Cancer Res.* 50, 7101-7107.
52. Economou J. S., Rhoades, K., Essner. R., McBride. W. H., Gasson, J. C. y Morton, D. L. 1989. Genetic analysis of the human tumor necrosis factor alpha/cachectin promotor region in a macrophage cell line. *J. Exp. Med.* 170. 321-326.
53. Drysdale E., Zacharchuk, C. M. y Shin. R, S. 1983. Mechanism of macrophage-mediated cytotoxicity: production of a soluble cytotoxic factor. *J. Immunol* 131. 2362-2367.
54. Baglioni C., Ruggiero, V., Latham, K. and Johnson, S. E. 1987. in Tumor Necrosis Factor and Related Cytotoxins (Bock, G. and Marsh. J. eds.) 52-63. John Wiley & Sons. Chichester.
55. Scheurich. P., Kronke. M., Schluter, C. Ucer, U and Pfizenmaier, K. 1986. Noncytotoxic mechanism of action of tumor necrosis factor-alpha on human tumor cells: enhancement of HLA gene expression synergistic with interferon-gamma. *Immunobiol.* 172. 291-300.
56. Holtmann H. and Wallach, D. 1987. Down regulation of the receptors for TNF by IL-1 and 4 β -phorbol-12-myristate-13-acetate. *J. Immunol* 139. 1161-1167.
57. Tsujimoto M., Yip, Y. K. and Vilcek, J. 1986. Interferon- γ enhances expression of cellular receptors for TNF. *J. Immunol.* 136, 2441-2444.
58. Locksley R. M., Heinzel, F. P., Shepard, H. M., Agosti, J. Eessalu, T. E., Aggarwal, B. B. and Harlan, J. M. 1987. Tumor necrosis factors α and β differ in their capacities to generate interleukin 1 release from human endothelial cells. *J Immunol.* 139, 1891-1895.
59. Smith R. A., Kirstein, M., Fiers, W. and Baglioni. C. 1986. Species specificity of human and murine tumor necrosis factor: a comparative study of tumor necrosis factor receptor. *J. Biol. Chem.* 261: 14871-14874.

60. Jupp O., Shona M. McFarlane, Helen M. Anderson, Alison F. Littlejohn, Ahmed A. A. Mohamed, Ruth H. MacKAY, Peter Vandenabeele y David J. Macewan. 2001. *Type II tumour necrosis factor- α receptor (TNFR2) activates c-Jun N-terminal kinase (JNK) but not mitogen-activated protein kinase (MAPK) or p38 MAPK pathways.* Biochem. J. 359, 525-535.
61. Goeddel D. V. 1999. Signal transduction by tumor necrosis factor: the Parker B. Francis Lectureship. *Chest.* 116:69S-73S.
62. Mancini R. E., y Quaife J. W. 1962. Histogenesis of experimental produced keloids. *J Invest. Dermatol.* 38:143-150.
63. Peacock E. E., Maddem J. W., Trier W. C. 1970. Biological basis for the treatment of keloids and hypertrophic scars. *Souh Med J.* 63:755-859.
64. Castagnoli C, Stella M, Berhod C, Magliacani G, Momigliano Richiardi P. 1993. TNF production in hypertrophic scarring. *Cell Immunol* 147:51-54
65. Peruccio D., Castagnoli C., P., M. Stella., S. D'Alfonso., P. Richiardi Momigliano., G. Magliacani y Teich Alasia S. 1994 Burn Altered biosynthesis of tumour necrosis factor (TNF) alpha is involved in postburn hypertrophic scars. *20 (2): 118-121.*
66. Castagnoli C., Stella M., Magliacani G. 2002. Role of T-lymphocytes and cytokines in post-burn Hypertrophic scars. *Wound Repair and Regeneration.* 107-108.
67. Stella M., Castagnoli C., Trombotto C., Calcagni G., Magliacani., Teich Alasia S. 1998. Interrelationship between immunocompetent and structural cells in post-burn scars. *Eur J Acad Surg.* 21:8-13
68. Foster C y Elbe A. 1997. In: *Immune Skin System Cutaneous Immunology and Clinical Immunodermatology.* 2a ed by Jan D Boss. CRC Pres: 85-108.
69. Zhang J., Lin Z., Jiang H., Yuan H., Zhao Y., Wu J., Zhu J., Wu H. 2004. The dynamics expression of TNF-alpha mRNA of Hypertrophic scars and its roles. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi.* 20 (1):57-59
70. Kitzis V., Engrav L., y Quin L S. 1999. Transient Exposure to Tumor Necrosis Factor- α Inhibits Collagen accumulation by cultured hypertrophic scars fibroblasts. *J. Surg. Res.* 87 (1) 134-141.
71. Feng C, Luo L, Luo J. 2000. Experimental study of biologic effects of tumour necrosis factor-alpha on scar-derived fibroblasts. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi.* 16(1):27-9.
72. Yang D., Luo J., y Zhu J. 1999. The effects of IL-1 on synthesis of collagen in scar-derived fibroblasts. *Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi.* 15(6):434-6.

73. Guang B., Xu S., y Bao W. 2001. Study on apoptosis of fibroblasts from abnormal scars in media containing low level of serum and interleukin 1 beta. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi.* 7(5):279-81
74. Niessen B. F., Schalkwijk J., Vos H., y Timens W. 2004. Hypertrophic scars formation is associated with an increased number of epidermal Langerhans cells. *J. Pathol.* 202:121-129.
75. Bellemare J., Roberge C. J., Bergeron D., López-Valle C. A., Roy, M., y Moulin V. 2005. Epidermis promotes dermal fibrosis: role in the pathogenesis of hypertrophic scars. *J. Pathol.* 206:1-8.
76. Reno F, Sabbatini M, Stella M, Magliacani G, Cannas M. 2005. Effect of *in vitro* mechanical compression on Epilysin (matrix metalloproteinase-28) expression in hypertrophic scars. *Wound Repair Regen.* 13(3):255-61.
77. Goldberg M., Han Y., Yan C., Shaw M., y Garner W. L. 2007. TNF- α Suppresses α -Smooth Muscle Actin Expression in Human Dermal Fibroblasts: An Implication for Abnormal Wound Healing. *J Invest Dermatol.* 127 (11):2645–2655.
78. Chomnczynski P. y Sacchi N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 1(2):581-5
79. Farrell J., Yamamoto K, and Lapetina E. 1993. Prenyl group identification of rap2 proteins: a ras superfamily member other than ras that is farnesylated. *Biochem. J.* 289: 349-355
80. Karp G. 2002. *Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments* (3rd Ed.) John Wiley & Sons, Inc., New York. 785 pp.
81. Sambrook J. *et al.* 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (3 volúmenes).
82. Sanger F. 1981. Determination of Nucleotide Sequences in DNA. *Science, New Series,* Vol. 214, No. 4526. Pp. 1205-1210.
83. Kanitakis J., Petruzzo P., Jullien D., Badet L., Dezza M. C., Claudy A., Lanzetta, M., Hakim ., Owen E., y Dubernard J. M. 2005. Pathological score for the evaluation of allograft rejection in human hand (composite tissue) allotransplantation. *Eur J. Dermatol.* 15 (4):235-238.
84. Kovacs E. J., DiPietro, L. A. 1994. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J.* 8: 854-861.

85. Tredget E. E., Yang, L., Delehanty, M., Shankowsky, H. y Scott, P. G. 2006. Polarized Th2 cytokine production in patients with hypertrophic scars following thermal injury. *J. Interferon Cytokine Res.* 26 (3):179-189.
86. Greten F. R. et al. NF- κ B is a negative regulator of IL-1 secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKK. *Cell* 130, 918–931 (2007)
87. Hernández Rodríguez J., Segarra M., Vilardell C., Sánchez M., García Martínez A., Esteban M J., Queralt C., Grau J. M., Urbano-Marqu ez A., Palac n A., Colomer D., y Cid M. C. 2004. Tissue production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α and IL-6) correlates with intensity of the systemic inflammatory response and with corticosteroid requirements in giant-cell arteritis. *Rheumatology.* 43:294-301.
88. Schindler R., Clark B. D. y Dinarello C. A. 1990. *J. Biol. Chem.* 265: 10232-10237.
89. Phillips R., Horsfield C., Mangan J., Laing K., Etuaful S., Awuah P., Nyarko K., Osei-Sarpong F., Butcher P., Lucas S., Wansbrough-Jones M. 2006. Cytokine mRNA Expression in *Mycobacterium ulcerans*-infected human skin and Correlation with local inflammatory response. *Infection and Immunity.* 74 (5):2917-2924.
90. Sun K. H., Yu C. L., Tang S. J., y Sun G. H. 2000. Monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody stimulates the expresi n and release of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α from normal human mononuclear cells involving in the lupus pathogenesis. *Immunology.* 99:352-360.
91. Weyand M. C., Tetzlaff N., Bj rnsson J., Brack A., Younge B., y Goronzy J. J. 1997. Disease patterns and tissue cytokine profiles in giant cell arteritis. *Arthritis and Rheumatism.* 40 (1):19-26.
92. Lu T., Tian L., Han Y., Vogelbaum M. y Stark G. 2007. Dose-depent cross-talk between the transforming growth factor- β and interleukin-1 signaling pathways. *PNAS.* 104 (11):4365-4370.

XV. APENDICE.

XV.1. Consentimiento Informado

Fecha: México D.F., a ____ de _____ del 200__.

Yo _____, paciente de la clínica _____, estoy enterado y firmo consentimiento para que me sea retirado un fragmento de piel con fines de investigación.

Es mi deseo donar el material biológico, absuelvo de toda responsabilidad a la institución que me atiende.

Firma del paciente

Firma de quien obtuvo la biopsia (médico, enfermera o investigador)

Observaciones

XV.2. Cédula de recolección de datos. (Elaborada por el alumno consultando a un asesor)

Protocolo de cicatrices patológicas

No. Historia _____

Edad: _____

Sexo: Fem: ___ Masc: ___

Fecha Lugar nacimiento: _____

Domicilio: _____

Teléfono: _____

Ocupación: _____

ID del protocolo: _____

1. Fecha de llegada a nuestra consulta: _____
2. Fecha de intervención quirúrgica o lesión de cicatriz _____
- 2ª. Técnica de cierre quirúrgico: grapas: seda: sutura intradérmica:
3. Tipo de piel. Blanca Morena Negra
4. Existencia de otras cicatrices: si: No:
5. Cicatrices previas: normales: patológicas:
6. Tipología del paciente: pícnico: atlético: asténico:
7. Causa de la lesión original: cirugía: vacuna: herida incisa: herida contusa: acné: quiste manipulado: otros:
quemadura: %SCQ > 10 > 20 < 50 > 50
- 7ª. Si la causa fue cirugía: infección herida: si no dehiscencia
sutura si: no: No. De días con material de sutura: _____
8. Zona corporal de la lesión: cara: orejas: cuello: cuero cabelludo: tórax anterior: tórax posterior: costados: abdomen: glúteos: genitales: brazos: antebrazos: manos: muslos: piernas: pies:
9. Disposición de la cicatriz: Longitudinal a las Líneas Tensión Mínimas Piel: Transversal a LTMP: En pliegue de flexión: En pliegue de extensión:
En piel tensa: En piel laxa:
10. Número de cicatrices _____
11. Dimensión cicatricial: longitud en cm: _____ anchura en cm: _____ elevación mm: _____
12. Sintomatología: hipertrofia: si no: dureza: + ++ +++
- Prurito: si no: dolor: si no: cambio coloración: eritema hiperchromia:
13. Período entre lesión y comienzo del tratamiento: semanas meses años
14. Tratamientos previos: no sí
Quirúrgicos: Radiaciones: Pomadas:
Infiltraciones corticoides con aguja: con dermojet:
Compresión: Otro: Especifique: _____
15. Anatomía Patológica: Microscopía de luz: H-E Giemsa:
16. Fotos: si no:
17. Biopsia para cutivo: PCR: Inmunohistoquímica: Hibridación *in situ*:
19. En caso de biopsia de cirugía plástica: Tipo de cirugía: _____ Sitio de toma de biopsia: _____
20. Enfermedades vasculares del colágeno son, entre otras: Artritis reumatoidea , Lupus eritematoso sistémico , Esclerodermia , Dermatomiositis .