



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la expresión de TGF-B después de la
administración de pirfenidona, en lesiones de quemaduras
de segundo grado.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

GARCÍA REYES MICAL KARINA



DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. MIGUEL ÁNGEL HERRERA ENRÍQUEZ

CDMX, 2016



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.

1. Datos del alumno

García

Reyes

Mical Karina

56 97 85 41

Universidad Nacional Autónoma de

México

Facultad de Ciencias

Biología

307187464

2. Datos del tutor

M. en C.

Miguel Ángel

Herrera

Enríquez

3. Datos sinodal 1

Dr.

Andrés Eliú

Castell

Rodríguez

4. Datos sinodal 2

Dr.

Fernando Edgar

Kröttsch

Gómez

5. Datos sinodal 3

Dra.

Nadia Judith

Jacobo

Herrera

6. Datos sinodal 4

Dr.

Genaro

Vázquez

Victorio

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación de la expresión de TGF-B
después de administración de
pirfenidona, en lesiones de quemaduras
de segundo grado.

77 p.

2016

La presente tesis se realizó bajo la dirección del M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez en el laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México. La autora agradece profundamente los apoyos recibidos para la realización de la misma, dichos sean la beca de titulación 2014 recibida de la Secretaría de Educación Pública (SEP) y el apoyo PAPIIT IT201313.

“La ciencia es un método para comprobar afirmaciones sobre el mundo natural,
no un compendio inmutable de verdades absolutas”.

-Stephen Jay Gould

“La ciencia no solo es compatible con la espiritualidad;
es una profunda fuente de espiritualidad”

- Carl Sagan

“Porque ahora, el viento de la memoria colorea el cielo nocturno,
un nuevo tiempo ha comenzado a brillar”

-LUNA SEA

Agradecimientos

Agradezco profundamente a Miguel Herrera por el apoyo que me brindó durante la realización de esta tesis; sus consejos y enseñanzas me seguirán siempre, guiándome a través de las adversidades.

Al doctor Castell, quien siempre ha escuchado pacientemente todas mis inquietudes, preocupaciones, comentarios, ideas y demás, siempre respondidos con comentarios llenos de afecto y sabiduría. Sin saberlo, ha contribuido a fortalecer mi confianza en mí misma, por lo que estoy profundamente agradecida.

A Bety, Gaby y Katya, quienes siempre tuvieron para mí las palabras de aliento, motivación y apoyo necesarias en los momentos de dudas y desconfianza. Dispuestas a ayudarme en cualquier cosa, todo el tiempo me hicieron sentir como en casa. Por ello, sólo puedo expresarles mi más grato afecto y profundo agradecimiento. Muchas gracias.

A Bety Sánchez, cuyos consejos me guiaron en la recta final, además de que se ha convertido en una amistad irremplazable desde el momento que la conocí. Muchas gracias por todo.

A la doctora Nadia Jacobo, por su paciencia, calidez y comprensión, muchas gracias.

Al doctor Edgar Krötszch, quien, en muy poco tiempo, me dio varias de las lecciones más importantes de mi vida.

A todos mis amigos del laboratorio, que hicieron mi estancia enteramente placentera y divertida, además de muy enriquecedora. Muchas gracias también por todo el apoyo y afecto que me brindaron, atesoraré siempre todas sus muestras de cariño.

A mis amigas Andrea, Mariana, Magali y Monse, con quienes empecé este viaje, en que todas nos apoyamos mutuamente para permanecer en el camino. Su afecto, apoyo, consejos y hasta sus tonterías han quedado grabadas en mi corazón y ahora me guían hacia nuevas direcciones. Por ello, muchas gracias.

A Corina, quien me ha apoyado incondicionalmente por más de 10 años, brindándome siempre la confianza y el ánimo necesarios para continuar. Muchas gracias.

Y muchísimas gracias a toda mi familia SLAVE, todos mis queridos amigos que me han enviado mucha fuerza y ánimos para continuar adelante, a pesar de provenir en su mayoría de distintos rincones del planeta. Gracias por todo.

Dedicatoria

La presente tesis está dedicada a mi excepcional familia, que representa lo que más amo en esta vida.

A mi madre, en quien siempre me he apoyado para sentirme un poco más fuerte, un poco más valiente y más segura. Por ser la persona en la que más confío, la persona que más me ha ayudado en los momentos que sentí miedo, frustración o debilidad y porque esta tesis se concluyó gracias, principalmente, a su constancia y determinación.

A mi padre, quien siempre ha creído en mí, me ha motivado y se ha esforzado por brindarme todas las herramientas necesarias para que yo pueda crecer personal y académicamente. Porque sus brillantes enseñanzas me han guiado hasta aquí y porque parte del crédito de la realización de esta tesis también le pertenece.

A mi hermana, ese valiente espíritu travieso que me ha enseñado tantas cosas, tantas que a veces me pregunto quién es realmente la hermana mayor y quién la menor. Su amor, compañía, consejo y hasta chistes me han ayudado enormemente, así que le dedico este trabajo, con todo mi amor.

Tabla de contenido

Lista de figuras.....	10
Tabla de abreviaturas.....	11
Resumen.....	13
Introducción.....	14
<i>Quemaduras. Epidemiología de quemaduras en México.....</i>	<i>14</i>
<i>Definición de quemadura.....</i>	<i>14</i>
<i>Clasificación de quemadura.....</i>	<i>15</i>
<i>Descripción del daño por una quemadura nivel celular y tisular.....</i>	<i>17</i>
<i>Reparación de la herida.....</i>	<i>19</i>
<i>Fase de homeostasis.....</i>	<i>19</i>
<i>Fase inflamatoria.....</i>	<i>20</i>
<i>Citocinas proinflamatorias involucradas.....</i>	<i>23</i>
- <i>Interleucina 1 β</i>	<i>22</i>
- <i>Factor de necrosis tumoral α</i>	<i>24</i>
- <i>Interleucina 6</i>	<i>25</i>
- <i>Factor de Crecimiento Transformante Beta</i>	<i>26</i>
<i>Resolución de la inflamación.....</i>	<i>27</i>
- <i>Interleucina 10</i>	<i>28</i>
<i>Fase proliferativa.....</i>	<i>29</i>
<i>El rol de TGF-β en la reparación del tejido.....</i>	<i>30</i>
<i>Relación entre la fase inflamatoria y la fase proliferativa.....</i>	<i>31</i>
<i>Reparación aberrante: Cicatrices hipertróficas y queloides.....</i>	<i>32</i>
<i>Pirfenidona.....</i>	<i>35</i>
Antecedentes.....	39
Justificación.....	42
Hipótesis.....	43

Objetivos.....	44
Material y método.....	45
Resultados.....	49
Discusión.....	62
Conclusiones.....	67
Apéndice: Criterios de Selección (Pacientes con PFD y con control).....	68
Referencias.....	70

Lista de figuras

- Figura 1. Representación de la estimación de la superficie corporal dañada
- Figura 2. Zonas de la quemadura descritas por Jackson.
- Figura 3. Número relativo de células en las fases del proceso de reparación.
- Figura 4. Modelo general de la reparación vs fibrosis crónica.
- Figura 5. Comparación histológica entre piel normal, cicatriz hipertrófica y queloide.
- Figura 6. Estructura de Pirfenidona.
- Figura 7. Potencial antifibrótico y antiinflamatorio de Pirfenidona.
- Figura 8. Fotomicrografías de cortes histológicos procesados por inmunohistoquímica contra las distintas citocinas.
- Figura 9. Programación ejecutada para realizar el análisis morfométrico en Image Pro Plus 7.0.
- Figura 10. Programación ejecutada para realizar el análisis morfométrico en Image Pro Plus 7.0. Conteo de ÁREA y DOI y eliminación de fondo y depósito inespecífico de cromógeno.
- Figura 11. Curva patrón de evaluación subjetiva.
- Figura 12. Comparación de los patrones de tinción.
- Figura 13. Gráficas comparativas entre los tratamientos A (pirfenidona) y B (vehículo) de cada citocina.
- Figura 14. . Gráficas comparativas de DOI de cada citocina, separada en grupos de acuerdo al tiempo de realización de las biopsias después de la aplicación del tratamiento.
- Figura 15. Comparación de la DOI en unidades de densidad óptica (UDO) de TGF- β , en cada paciente por grupo TA (pirfenidona) o TB (vehículo)
- Figura 16. Comparación de la DOI en unidades de densidad óptica (UDO) de IL-10, en cada paciente por grupo TA (pirfenidona) o TB (vehículo)

Tabla de abreviaturas

COX	Ciclooxigenasas
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
EGF	Factor de crecimiento epidermal
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
IFN-γ	Interferón γ
IGF- 1	Factor de crecimiento tipo insulina- 1
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-1α	Interleucina 1 α
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-9	Interleucina 9
Interleucina 1- β	Interleucina 1- β
KC	Quimiocina derivada de queratinocitos
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos
MIP-1α	Proteína inflamatoria de macrófagos
MMP	Metaloproteasa de matriz
NK	Células asesinas naturales
NOS	Óxido nítrico sintetasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PF4	Factor de plaquetas 4
PFD	Pirfenidona
PGE₂	Prostaglandinas E ₂

SAPK	Proteína cinasa activada por estrés
TGF-β	Factor de crecimiento transformante- β
Th17	Linfocitos ayudadores 17
TIMP	Inhibidor de metaloproteasas de tejido
TNF-α	Factor de necrosis tumoral - α
Treg	Linfocitos T reguladores
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
αSMA	Fibras α actina de músculo liso

Resumen

Introducción: Las lesiones por quemaduras representan un gran problema de salud pública ya que presentan de forma característica una exacerbada fase inflamatoria, mediada por las citocinas TGF- β , TNF- α , IL-1 β , IL-6, que es directamente proporcional a la profundidad de la quemadura y al porcentaje de la superficie corporal que ocupa. Dicha fase inflamatoria puede conducir a la pérdida del tejido de la zona de coagulación o a la formación de una cicatriz fibrótica. Debido a que no existen tratamientos que sean totalmente eficientes contra estos padecimientos, se busca prevenir antes de la pérdida del tejido o del desarrollo de una cicatriz aberrante, por lo que el TGF- β se ha convertido en uno de los principales blancos, por sus propiedades proinflamatorias y profibróticas. Recientemente se ha documentado que la molécula pirfenidona es capaz de inhibir la actividad proinflamatoria y profibrótica de TGF- β , por lo que en este trabajo se evaluó la expresión de TGF- β y las citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 en quemaduras de pacientes pediátricos, después de la aplicación tópica de pirfenidona. **Material y método:** De acuerdo al protocolo proporcionado por los hospitales encargados de llevar a cabo el estudio, se escogieron de manera aleatoria y bajo los criterios de inclusión y exclusión, 20 pacientes pediátricos con quemaduras, a los cuales se les realizó una biopsia en el sitio de la quemadura y posteriormente se les aplicó pirfenidona dos veces al día por 48 ó 72 horas. Al finalizar este periodo, se les volvió a tomar una biopsia del área dañada. Todas las biopsias fueron procesadas y teñidas con IHQ para las citocinas a cuantificar. Posteriormente, se tomaron al menos 10 fotografías de cada biopsia, las cuales fueron analizadas con IMAGE PRO PLUS 7.0 para determinar el área de expresión y la densidad óptica integrada de cada citocina en las biopsias. **Resultados:** Realizamos un análisis morfométrico en el que separamos las muestras de acuerdo a los grupos control y experimental, y también de acuerdo al periodo de aplicación de pirfenidona en los pacientes, sin embargo, no encontramos diferencias significativas. Se compararon además las densidades ópticas de todos los pacientes sólo para las citocinas TGF- β e IL-10, mismas que mostraron una disminución en la expresión de la primera luego de la aplicación de pirfenidona en más del 60% de los casos. Por lo cual concluimos que pirfenidona moduló la expresión de TGF- β , no así las demás citocinas incluidas en el estudio.

Introducción

Quemaduras. Epidemiología de quemaduras en México

Las lesiones por quemaduras representan un gran problema de salud pública, ya que se ubican entre las 20 principales causas de morbilidad en México y son el cuarto lugar en causas de muerte accidental que ocurren con mayor frecuencia en el hogar, de acuerdo con el ex secretario de Salud José Ángel Córdova Villalobos (Villalobos, J., 2009). En el año 2008, se registraron alrededor de 117,400 pacientes con quemaduras a nivel nacional, de los cuales cerca del 5% tenían lesiones de gravedad; sin embargo, en el año 2013 la morbilidad por quemaduras se incrementó hasta 127 076 pacientes (Secretaría de Salud, 2014). Se sabe que cerca del 18% de los pacientes hospitalizados con quemaduras no sobrevive, mientras que los pacientes que se salvan llegan a tener serias consecuencias en la salud. Los grupos más vulnerables a las quemaduras son los adultos mayores y los niños y adolescentes menores de 15; estos últimos ocupan el 52% de los casos registrados, también se ha observado que entre los adultos jóvenes las quemaduras son más frecuentes en los hombres que en las mujeres (Orozco, M. *et al* 2012). Las causas de las quemaduras más frecuentes entre grupos poblacionales varían con respecto a la edad, ya que son directamente determinadas por lo último. Se considera que el fuego es el principal causante de las quemaduras en los adultos, debido, en su mayoría, a accidentes de trabajo; mientras que en los niños las escalduras son la principal causa, en los adolescentes es el manejo inadecuado del fuego lo que produce las quemaduras en la mayoría de los casos (Evers, L. *et al* 2010)

Definición de quemadura

Una quemadura consiste en el daño a la piel en cualquiera de sus capas y anexos, que puede ser provocado ya sea por contacto directo con una flama, una superficie o un líquido caliente, o bien una fuente de calor y que por convección, conducción o radiación causa un daño tisular proporcional a la temperatura y tiempo de exposición. Las quemaduras son altamente variables en cuanto a la profundidad de la herida y las complicaciones que traen consigo a la salud del paciente, ya que éste puede sufrir un amplio número de consecuencias secundarias severas, como son shock, infección, desbalance de electrolitos y fallo respiratorio, dependiendo del área afectada y la profundidad de la quemadura. De manera adicional, las quemaduras también pueden causar daños psicológicos y

emocionales (Evers, L. *et al*, 2010). El proceso de quemadura es rápido y puede tomar sólo unos segundos cuando la exposición es a temperaturas mayores a 60°C.

Clasificación de quemadura

La herida por quemadura se puede clasificar e identificar de acuerdo a su profundidad, mecanismo o causa y extensión.

La clasificación por su profundidad está determinada por el espesor de la piel que abarca el daño y se distinguen tres tipos:

- Primer grado: Afecta únicamente la epidermis y tienen una respuesta inflamatoria simple; presentan una apariencia roja y pueden ser muy dolorosas. Se producen comúnmente por el contacto momentáneo con objetos calientes o por la exposición a los rayos solares mucho tiempo y sin protección. A menudo se curan sin intervención médica en alrededor de una semana y sin cambios permanentes en la coloración, espesor o textura de la piel.
- Segundo grado: Resultan cuando la dermis también se ve afectada por la quemadura, éstas se clasifican en dos tipos dependiendo de la profundidad de la lesión:
 - De segundo grado superficial: Incluyen hasta la dermis papilar y son capaces de curarse después de tres semanas. Presentan una coloración roja con partes blancas, formación de flictenas o ampollas con liberación de líquido al reventarse, la superficie se mantiene húmeda y apéndices epidérmicos se mantienen intactos. Producen dolor severo.
 - De segundo grado profunda: El daño incluye también a la dermis reticular, por lo que toman más de tres semanas en repararse, aún con el tratamiento adecuado, y se pueden ocasionar cicatrices fibróticas en el lugar de la quemadura. Tienen una apariencia seca, blanca, con pérdida de los apéndices epidérmicos y no producen dolor.
- Tercer grado: Todos los elementos de la piel se ven afectados en este tipo de quemaduras, el daño incluso puede extenderse más allá de la piel. Debido a la gravedad de la quemadura, la herida no puede repararse sola por lo que requiere los injertos de piel. Tienen una apariencia correosa, seca, blanca o roja con vasos sanguíneos trombosados, los pacientes con estas quemaduras no presentan dolor.

Las quemaduras de mayor profundidad tienen un mayor riesgo de mortalidad así como peor prognosis (Farina, J. *et al*, 2013)

Por el mecanismo o causa, las quemaduras se pueden clasificar de la siguiente manera:

- Escalduras: causadas por líquido caliente o vapor
- Quemaduras por contacto: causadas por sólidos calientes como objetos de metal o utensilios de cocina, así como cigarrillos encendidos
- Quemaduras por flamas: causadas por flamas o fuego incandescente, por ejemplo velas o estufas
- Quemaduras químicas: causadas por exposición a sustancias químicas reactivas tales como ácidos o bases.
- Quemaduras eléctricas: causadas por el paso de una corriente eléctrica de una toma de corriente eléctrica, cable o aparato a través del cuerpo.
- *Quemaduras de vías aéreas*: Son el resultado de la respiración de gases calientes, vapor o productos tóxicos de combustión incompleta, como monóxido de carbono. Este tipo de quemadura está asociada a las quemaduras en piel hasta en un 35% y son la causa de muerte más común entre las personas que presentan una quemadura ocasionada por el fuego, ya que causan graves daños térmicos o químicos en las vías respiratorias y pulmones (World Health Organization, 2008).

Asimismo, las quemaduras se valoran numéricamente de acuerdo a la superficie del cuerpo que sufre el daño, la proporción se obtiene mediante la aplicación de la “Regla de los nueves”, que es la herramienta más común (ver Figura 1. A). Este método asigna un 9% a la cabeza y la región del cuello, 9% a cada brazo (incluyendo la mano), 18% a cada pierna (incluyendo los pies) y 18% a cada lado del tronco (espalda, pecho y abdomen) en personas adultas y niños mayores de 14 años. Para niños menores a 14 años se aplica el método el Lund and Browder, que es una pequeña modificación a la regla de los nueves. Para el niño recién nacido, la cabeza representa el 19% de la superficie corporal, mientras que cada extremidad inferior representa el 13%, así las extremidades superiores, espalda, pecho y abdomen mantienen las mismas proporciones. Por cada año de edad, se disminuye el porcentaje ocupado por la cabeza en un 1% y se aumenta 0.5% a cada extremidad inferior (Figura 1. B) (Evers, L. *et al*, 2010; Church, D. *et al*, 2006). Una mayor extensión de la herida está relacionada con mayores índices de mortalidad, ya que se estima que por cada 1% que abarque la quemadura, el riesgo de muerte aumenta en un 6 % (Farina, J. *et al*, 2013)

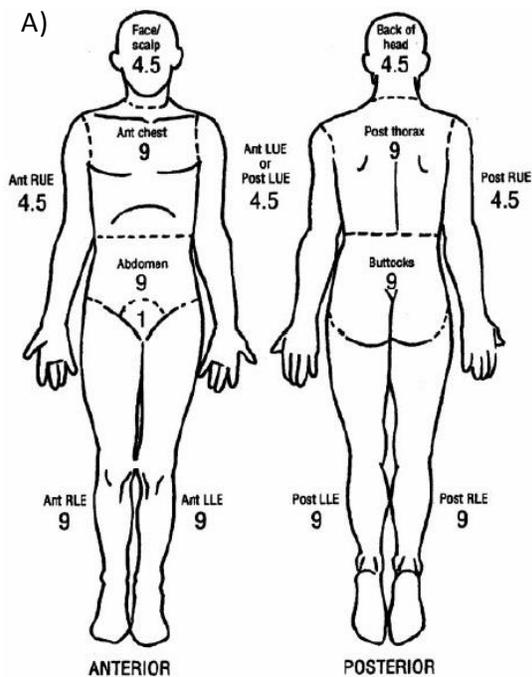
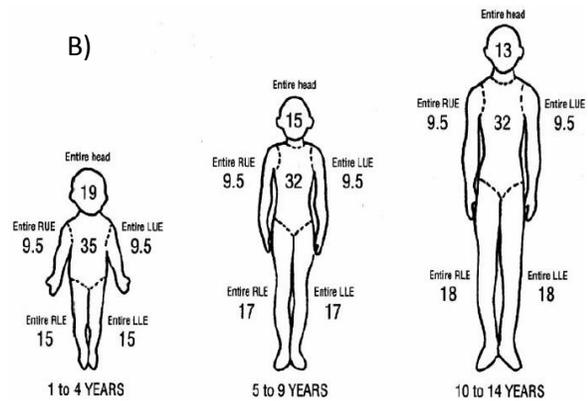


Figura 1 A) Representación de la estimación de la superficie corporal dañada. A) Estimación de la superficie corporal con quemadura, usando la regla de los nueves en pacientes adultos. B) Esquema de las modificaciones a la regla de los nueves en menores de 14 años. Tomado de Church, D. et al 2006.



Descripción del daño por una quemadura a nivel celular y tisular

Una quemadura produce un incremento súbito y exagerado de la temperatura que genera una alteración en la conformación molecular intra e intercelular, modificando el funcionamiento de distintas proteínas; por ejemplo el daño a proteínas de membrana, como lo son los canales iónicos, logra inducir la deshidratación de las células y liberación de radicales libres de alta oxidación, provocando la inestabilidad de las membranas y la posterior muerte celular debido a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática (Church, D. et al, 2006). Los cambios que ocurren en el tejido conducen a la necrosis de éste. El contenido celular liberado por las células muertas y dañadas, así como los restos tisulares y las células vecinas en las zonas cercanas al foco central de la herida, liberan al medio extracelular grandes cantidades de señales de daño tisular, que promueven la producción y secreción de una gran cantidad de mediadores químicos y bioquímicos que inducen tanto un proceso inflamatorio como un posterior proceso de reparación.

A nivel tisular, el agente térmico induce una modificación en la arquitectura de la piel, ya que las capas de la epidermis no son distinguibles entre sí, como tampoco se distinguen de la dermis y sus componentes (Fauce, D. et al, 1999). De acuerdo con Jackson (Jackson, D., 1953), los cambios que ocurren en el área afectada pueden clasificarse en tres zonas (figura 2):

- a) Zona de coagulación: Es el foco central de la herida y está formado por de tejido necrótico que forma la escara de la quemadura en la zona de mayor contacto con la fuente de calor.
- b) Zona de estasis: Comprende el tejido viable adyacente al área de la quemadura, el cual tiene el potencial de curar o desvitalizarse progresivamente, ya que la zona puede presentar isquemia y la posterior muerte del tejido por disminución de la perfusión; la cual sólo puede evitarse si la revascularización es restaurada en pocos días. Esta zona presenta los mayores cambios en una herida por quemadura, por ejemplo, la necrosis resultado de la isquemia puede conducir a la pérdida progresiva de tejido. Dicha necrosis en esta zona puede estar involucrada con la progresión de la lesión, por ejemplo, las quemaduras de segundo grado superficiales pueden aumentar a segundo grado profundo en un periodo de 2 a 4 días después de la quemadura (Evers, L. *et al*, 2010)
- c) Zona de hiperemia: Comprende de piel normal con mínimo daño tisular, que muestra una predominante vasodilatación, aumento en el flujo sanguíneo y cambios inflamatorios en respuesta a la herida. (Church, D. *et al*, 2006; Evers, L. *et al*, 2010)

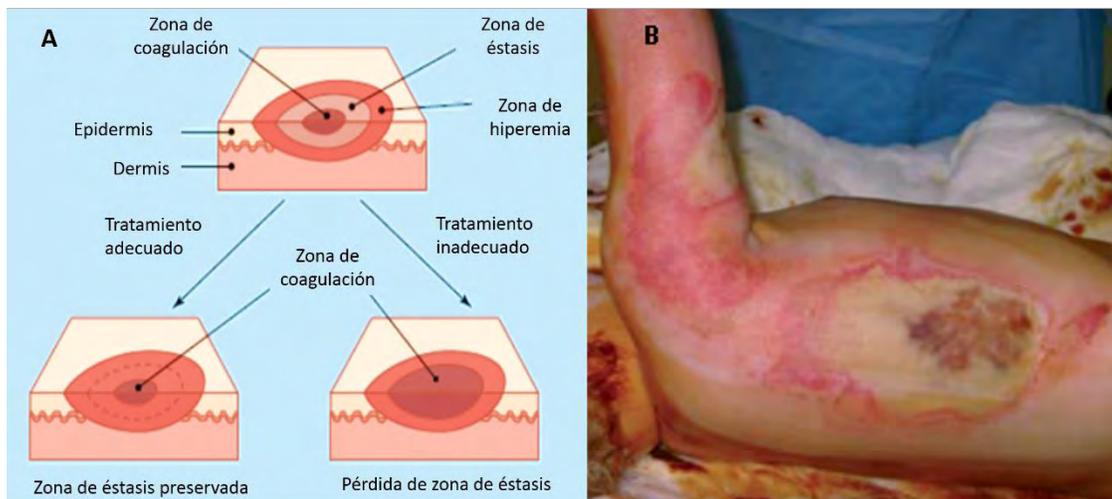


Figura 2. Zonas de la quemadura descritas por Jackson. A) Representación gráfica que resalta los cambios en la zona de estasis, la cual puede preservarse con una adecuada restauración de la vascularización o en su defecto, perderse. B) Caso clínico de una quemadura, al centro se localiza la zona de coagulación que corresponde al tejido en necrosis. Tomada de Hettiaratchy, S. *et al*, 2004.

Reparación de la herida

Una quemadura produce una respuesta tanto local como sistémica. En la respuesta local, el cuerpo inicia una cascada de señales en el tejido que tiene como finalidad mantener la homeostasis y conducir a la posterior reparación de la herida. Dicha reparación involucra una compleja y bien dirigida serie de eventos que pueden definirse en cuatro etapas, las cuales están bien definidas aun cuando se sobrelapan entre sí. Estas fases se conocen como: a) Fase de hemostasis, b) Fase de Inflamación, c) Fase de proliferación y d) Fase de remodelación del tejido. (Enoch *et al*, 2007; Singer *et al*, 1999; Wang *et al*, 2007). El éxito en la reparación de la herida está directamente relacionado con la correcta secuencia cronológica de eventos que forman parte del proceso.

Fase de hemostasis

Inicia inmediatamente después del daño a la piel y dura aproximadamente dos horas. El daño tisular ocasiona la coagulación y constricción de los vasos sanguíneos para disminuir el flujo sanguíneo al área afectada y a las zonas circundantes. Las quemaduras, a diferencia de heridas cutáneas con ruptura de los vasos sanguíneos, no tienden a presentar un sangrado excesivo; sin embargo, la pérdida de la escara de la quemadura puede producir una gran pérdida sanguínea (van der Veer, 2008). Las plaquetas tienen una importante función en esta etapa, ya que sus gránulos liberan diversos factores de crecimiento que inician la cascada de la curación por la atracción y activación de los fibroblastos, células endoteliales y macrófagos. Entre dichos factores se encuentran Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), Factor de crecimiento tipo insulina-1 (IGF-1), Factor de crecimiento epidermal (EGF), Factor de crecimiento transformante β (TGF- β), Factor de plaquetas IV, los cuales también activan otros sistemas, como son la cascada de complemento, mecanismo de coagulación, cascada de la cinina y generación de plasminina (Enoch *et al*, 2007; Singer *et al*, 1999). La actividad de las plaquetas conduce después a la formación de un coágulo formado por fibrina, fibronectina, vitronectina y trombospondina que restablece la homeostasis y provee una matriz extracelular provisional para la migración celular (van der Veer *et al*, 2008). La coagulación es un paso determinante para la curación de la herida, sin embargo, en quemaduras, este proceso suele sufrir anomalías caracterizadas por un agotamiento de los mediadores de la cascada de coagulación, aumento de los mediadores con capacidad fibronolítica y una ausencia de la actividad anticoagulante normal. La cascada de coagulación puede interactuar directamente con la actividad proinflamatoria y producir daños a la salud considerables. Las deficiencias en la

cascada de la coagulación son proporcionales a la extensión de la herida y aumentan el riesgo de mortalidad (Farina, J. *et al*, 2013)

Además de estos cambios, los vasos sanguíneos experimentan un gran aumento de la permeabilidad capilar que permite la fuga de plasma sanguíneo durante las primeras 8 horas posteriores a la quemadura, sin embargo dicho proceso se puede extender hasta 48 horas, después de las cuales se restablece la circulación normal; ya sea por la trombosis de los vasos sanguíneos por la recuperación de su permeabilidad habitual. La cantidad del plasma sanguíneo que se filtra de los vasos sanguíneos está directamente correlacionada con el tamaño de la quemadura (Tiwari, V., 2012). Los cambios en la permeabilidad vascular son regulados principalmente por el Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que permite también, la posterior extravasación de leucocitos que participan en la fase inflamatoria y la neovascularización (Infanger, M. *et al*, 2004)

Fase inflamatoria

La fase inflamatoria se caracteriza por la activación de múltiples señales intercelulares, desregulación de la inmunidad mediada por células y sobreexpresión de citocinas y factores de crecimiento, así como la activación de las células del endotelio vascular, neutrófilos, macrófagos, y otras poblaciones celulares. Dicha fase está altamente regulada por las citocinas y quimiocinas que se producen en respuesta al daño y que se ven incrementadas en sus niveles en el suero, ocasionando una respuesta sistémica. Se ha demostrado que la respuesta inflamatoria en quemaduras difiere significativamente del proceso de curación de una herida no ocasionada por quemadura; puesto que la secreción de los mediadores proinflamatorios es exacerbada (Schwacha M., *et al*, 2010). La duración de la fase inflamatoria también es exacerbada, ya que puede durar hasta 5 semanas después de la lesión (Jeschke, M. *et al*, 2007). La fase inflamatoria se divide en dos subfases que están determinadas por la duración de la respuesta y las células involucradas

Fase inflamatoria temprana: Esta fase dura alrededor de dos días y comienza con la activación de la cascada del complemento por la vía clásica o alternativa. Durante esta fase, las células endoteliales de los vasos sanguíneos son activadas por la participación de Interleucina 1 β (IL-1 β), Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), TGF- β e Interferón γ (IFN- γ) que promueven una mayor expresión de moléculas de adhesión celular como E-selectina, P-selectina y moléculas de adhesión intercelulares (ICAM) 1 y 2 (Eming, S. *et al*, 2007) principalmente, dichas moléculas son indispensables para

permitir la migración y extravasación de los neutrófilos que, conducidos por distintos quimioatrayentes, llegan al sitio de la herida unos minutos después de que ocurrió daño para comenzar su actividad fagocítica. Entre los quimioatrayentes que participan en la migración de los neutrófilos se encuentran interleucina 8 (IL-8), fragmentos de la matriz extracelular, TGF- β , elementos de la cascada del complemento, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), así como péptidos bacterianos (Eming, S. *et al*, 2007; Broughton, G. *et al*, 2006). Los neutrófilos cuentan con receptores que permiten reconocer bacterias, por lo que una vez en el área dañada, liberan enzimas degradantes con alto contenido de mieloperoxidasa, elastasa, lactoferrina, colagenasa y otras enzimas y agentes anti bacterianos, además de radicales libres de alta oxidación, que eliminan todas las bacterias y partículas que puedan infectar el área de la herida. También se encargan de producir citocinas proinflamatorias como IL-1 α y TNF- α (van der Veer, W. *et al*, 2008), las cuales estimulan la producción de quimiocina derivada de queratinocitos (KC) que a su vez es un potente atrayente de neutrófilos (Schwacha, M. *et al*, 2010). El flujo de los neutrófilos alcanza su pico máximo 24 horas después de la lesión y posteriormente disminuye significativamente durante los siguientes 6 días, ya que después de que la herida ha sido resguardada de los patógenos, dichas células son estimuladas para entrar en apoptosis y finalmente son fagocitadas por los macrófagos, siendo estos los últimos en llegar a la herida (Broughton, G. *et al*, 2006). En quemaduras superficiales, el flujo de neutrófilos disminuye después de 48 horas, mientras que en quemaduras profundas el flujo se mantiene constante después de dos días (Tyler, M. *et al*, 2000). El incremento persistente del flujo de los neutrófilos está asociado con una alta destrucción del tejido debido a su liberación de proteasas y especies reactivas de oxígeno; así como con una respuesta proinflamatoria aguda, por lo que el proceso de apoptosis en estas células es indispensable para la curación de la herida (Meszaros, A. *et al*, 2000).

Fase inflamatoria tardía: Posteriormente a la actividad bactericida de los neutrófilos, los monocitos llegan también al sitio de la herida en las siguientes 48 a 96 horas; la extravasación está regulada principalmente por la expresión de integrina $\alpha_4\beta_1$ y moléculas de adhesión celular del endotelio 1 (Eming, S. *et al*, 2007) y son dirigidos por un gradiente de quimiocinas que consiste principalmente de TGF- β , PDGF, Factor de plaquetas 4 (PF4), eucosanoides e Interleucina 1 (IL-1). En el sitio de la herida, los monocitos son activados por mediadores del micro ambiente (material procedente de bacterias, hipoxia, restos de matriz extracelular, partículas opsonizadas y citocinas proinflamatorias como IFN- γ ; además existe una vía de activación alternativa mediada por interleucina 4 (IL-4),

interleucina 10 (IL-10), interleucina 13 (IL-13) y TGF- β y glucocorticoides (Duffield, J., 2003) para cambiar su fenotipo a macrófagos, los cuales, además de fagocitar partículas externas, pueden directamente inducir apoptosis en los neutrófilos (Meszaros, A. *et al*, 2000), eliminar el tejido dañado y pueden también liberar factores de crecimiento como PDGF y VEGF, los cuales participan en la formación del tejido de coagulación y en la posterior reparación de la herida. Así mismo, los macrófagos pueden liberar un gran número de citocinas que incluyen IL-1, interleucina 6 (IL-6), TNF- α , IL-8, IL-10 e interleucina 12 (IL-12) para potenciar o disminuir la respuesta inflamatoria (Wolff, K., 2009). La actividad de los macrófagos alcanza su pico máximo de actividad 48 horas después de ocurrida la lesión (Figura 3) (van der Veer, W.*et al*, 2008).

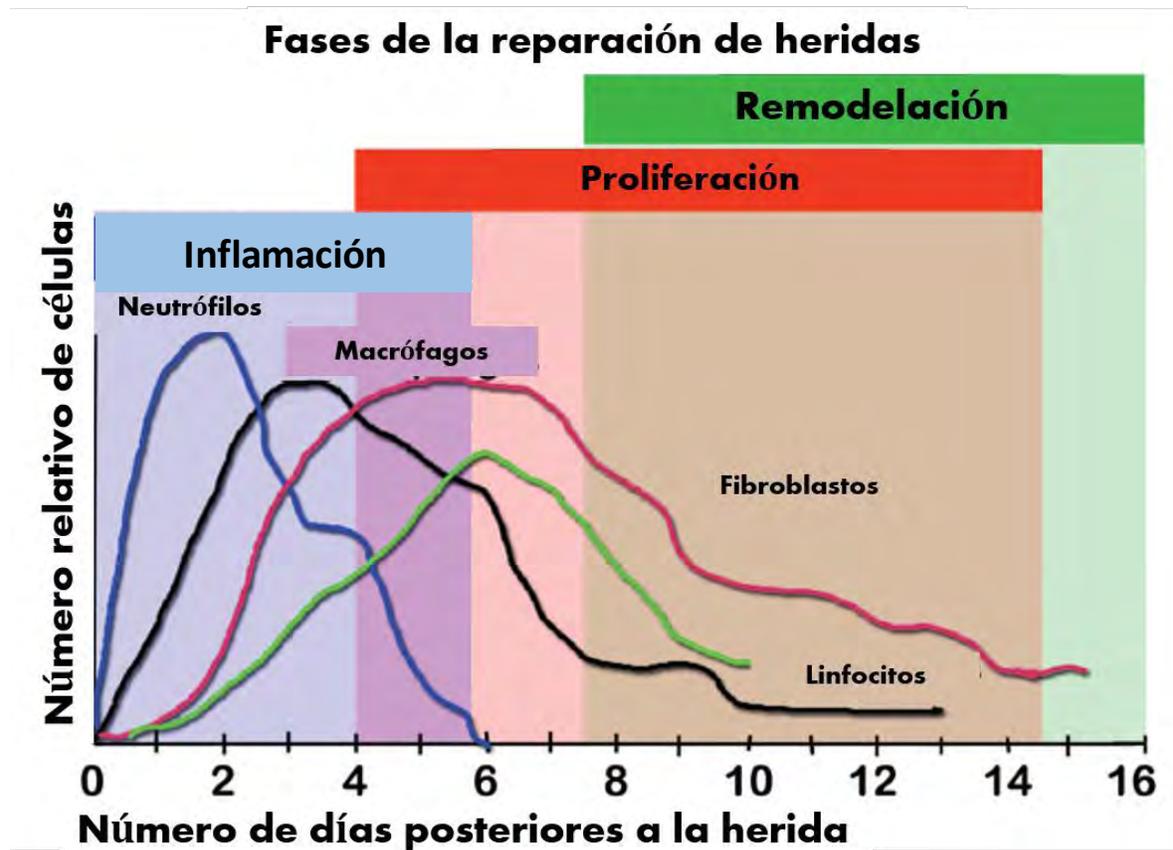


Figura 3. Número relativo de células en las fases del proceso de reparación. Neutrófilos y macrófagos son los principales participantes durante el proceso inflamatorio. La fase de remodelación termina hasta seis meses después de ocurrido el daño. Modificada de Broughton *et al*, 2006.

Citocinas proinflamatorias involucradas en la fase inflamatoria

En heridas por quemadura, la actividad de los macrófagos es hiperactiva, ya que puede desregularse y producir niveles anormales de citocinas proinflamatorias; como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 así como IL-10, que se presentan tanto local como sistémicamente (Farina, J. *et al*, 2013); su expresión es directamente proporcional al tamaño de la quemadura (Jeschke, M. *et al*, 2007). Las citocinas TNF- α e IL-1 son las principales promotoras de la reacción inflamatoria, ya que regulan la migración de los leucocitos al sitio del daño y estimulan la producción de diferentes citocinas y quimiocinas por distintas poblaciones celulares. Cuando TNF- α e IL-1 se unen a su receptor, conducen a la activación del factor de transcripción, factor nuclear κ B (NF- κ B) mediante diferentes vías de señalización, inducen a la expresión de genes relacionados con la producción de IL-6 e IL-8, quimiocinas, moléculas de adhesión, prostaglandinas E₂ (PGE₂), factor activador de plaquetas, óxido nítrico sintetasa (NOS), ciclooxigenasas (COX) y fosfolipasa A2. Así mismo, NF- κ B también puede promover la expresión de TNF- α e IL-1 (Wolff, K., 2009; Church, D. *et al*, 2006).

Interleucina 1 β (IL-1 β)

La Interleucina 1 β (IL-1 β) es una citocina que es causa de inflamación aguda y crónica; ya que actúa como el principal mediador de la respuesta inflamatoria y es producida en mayor medida por macrófagos activados, pero también es expresada por neutrófilos, linfocitos B y T, así como en células mesenquimales, endoteliales y epiteliales en respuesta al daño (Eming, S. *et al*, 2007; Salgado, M. *et al*, 2012). Está involucrada también en la producción de metaloproteasas de la matriz y producción de colágena de manera dosis dependiente, además de estimular la producción de factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) en fibroblastos para promover la reepitelización (van der Veer, W. *et al*, 2008; Broughton, G *et al*, 2006). Es producida como una proteína de 30 KDa y presenta un porcentaje de homología de apenas el 26 % con IL-1 α (Wolff, K., *et al*, 2009). Dicha proteína reside en el citoplasma, pero para ser activada requiere de una escisión por la caspasa 1; esta forma de IL-1 es también producida por células de Langerhans y células dendríticas; en las cuales favorece su proceso de migración hacia los ganglios. Ya que todas las células que producen IL-1 β se distribuyen y actúan dentro del cuerpo (a diferencia de IL-1 α , que es producida por células epiteliales), se requiere de una regulación de su proceso de activación, la cual ocurre en tres niveles: transcripción del gen de IL-1 beta, transcripción del gen de la caspasa 1 y la disponibilidad de las proteínas ASC e Ipaf, que interactúan con la caspasa 1 en el inflamosoma para la maduración de IL-1 β . (Wolff, K. *et al*, 2009).

En quemaduras, se ha demostrado que IL-1 β incrementa significativamente sus niveles en las primeras tres horas después del daño; en ratones alcanza su pico máximo a las 12 horas y se mantiene constante durante las siguientes 48 horas posteriores a la herida, finalmente desciende a sus niveles basales entre las 96 y 168 horas siguientes (Gauglitz, G. *et al*, 2008; Kubo, H. *et al*, 2014).

Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)

Al igual que IL-1 β , TNF- α muestra un aumento considerable en su expresión en relación con las heridas no producidas quemaduras (Schwacha, M. *et al*, 2010). El TNF- α es una potente citocina proinflamatoria producida por los macrófagos, monocitos, células T, mastocitos, granulocitos, células natural killer (NK), fibroblastos, neuronas, queratinocitos y células de músculo liso, en respuesta a diversos factores como productos bacterianos, citocinas como IL-1 β , factores del complemento, células tumorales, isquemia o hipoxia, la exposición a radiación ionizante, temperatura elevada, infección vírica o diversas sustancias producto de la quimioterapia contra cáncer (Karp, G. *et al*, 2010) Estos factores inducen la transcripción del mRNA en los 30 minutos siguientes al estímulo, mientras que la regulación de su expresión ocurre post-transcripcionalmente. El TNF- α se libera al medio extracelular después de que la proteína de 17 kDa es escindida de su precursor en la membrana celular por la enzima convertidora TNF- α (Tracey, D. *et al*, 2008). Esta citocina induce dos tipos de respuesta; actúa como citocina proinflamatoria activando el factor NF- κ B e induce apoptosis celular por unión al receptor, dependiendo del estado metabólico de la célula.

La actividad proapoptótica del TNF- α depende de la unión de éste al receptor TNFR1. El receptor TNFR1 es expresado constitutivamente en todas las células, con excepción de los eritrocitos, está constituido por un dominio denominado “dominio de muerte”, cuya unión a su ligando recluta a las proteínas citoplasmáticas adaptadoras TRADD y FADD así como a la procaspasa 8, la interacción de éstas conduce a la activación de la caspasa 8 o 10 para desencadenar el proceso de apoptosis (Karp, G. *et al*, 2010; Wolff, K. *et al*, 2009; Tracey, D *et al*, 2008).

Mediante la unión del TNF- α a su receptor, más no su internalización, se activa la vía de señalización que desencadena en la activación de NF- κ B. Dicho factor de transcripción induce la expresión de genes de inhibición de apoptosis, estimulan la producción de citocinas, diferenciación celular e incluso, está involucrada en cáncer, estimulando la proliferación celular y la invasión del tumor Por

ejemplo, en fibroblastos, es capaz de inducir la expresión de metaloproteasas de matriz, lo cual permite la migración celular. (Tracey, D. *et al*, 2008; Broughton, G. *et al*, 2006). Se ha comprobado que es indispensable para controlar la respuesta proinflamatoria, ya que su sobre expresión puede tener graves consecuencias en el tejido al estar asociada con inflamación crónica. En pacientes con quemaduras, los niveles de TNF- α en suero se muestran incrementados en comparación con las heridas no producidas por quemaduras (Kubo, H. *et al*, 2014) y alcanzan su pico máximo de expresión 2.5 días después de la lesión; Yeh y colaboradores reportaron una tendencia al aumento en los niveles de esta citocina en pacientes que fallecían en consecuencia a una quemadura, esta tendencia está relacionada con infecciones y el posterior desarrollo de sepsis en el área dañada (Yeh, F. *et al*, 1997)

Interleucina 6

Otra de las citocinas producidas por los macrófagos y de gran importancia en la fase inflamatoria es la IL-6, la cual es una glucoproteína de aproximadamente 30 kDa que es también producida por las células B y T, monocitos, fibroblastos, células endoteliales, células mesangiales, células de la glia, condrocitos, osteoblastos, células de músculo liso, granulocitos, mastocitos y células tumorales, en respuesta a la inflamación, estrés oxidativo, daño vascular y quemaduras. La producción de IL-6 es estimulada por diferentes citocinas en cada población celular; sin embargo, las principales inductoras son IL-1, TNF, INF- γ y péptidos virales, entre otros (Shizuo, A. *et al*, 1993). Actúa mediante la activación de dos vías de señalización a través de la molécula gp130, una dependiente de la proteína RAS que activa factores de transcripción y la otra permite la activación de la vía JAK/STAT (Wolff, K., 2009)

La citocina IL-6 es una de las principales mediadoras de la respuesta inflamatoria aguda, ya que tiene efectos sobre distintas poblaciones celulares; estimula la producción de anticuerpos por los linfocitos B, la proliferación de células B, diferenciación de macrófagos, diferenciación de células neuronales, la maduración de los megacariocitos, la diferenciación de células mieloides, crecimiento de las células mesangiales y crecimiento de plasmacitomas (Shizuo, A. *et al*, 1993), también es capaz de inhibir la diferenciación de los monocitos a macrófagos (Tilg H. *et al*, 1997). Además IL-6 participa en la reepitelización en la fase proliferativa, ya que actúa como quimioatrayente de queratinocitos, además de inducir su proliferación y diferenciación en la epidermis (Broughton, G. *et al*, 2006).

En quemaduras, los niveles de IL-6 aumentan considerablemente en comparación con los niveles encontrados en otras heridas no producidas por quemadura, ya que esta citocina juega un papel primordial en la respuesta de fase aguda al estimular la síntesis de proteínas de dicha fase en los hepatocitos. Los niveles elevados de IL-6 al momento de admisión al hospital están asociados con complicaciones y alta mortalidad en pacientes hospitalizados a causa de una lesión de este tipo, mientras que los niveles de IL-6 disminuyen paulatinamente en los pacientes que sobreviven (Yeh F. *et al*, 1999). Otro estudio llevado a cabo por Csontos y colaboradores demostró que en pacientes que sobrevivían a una quemadura, los niveles de IL-6 disminuían al segundo día, mientras que en los no sobrevivientes, los niveles se mantenían altos y alcanzaban su máximo pico a los 6 días posteriores (Csontos, C. *et al*, 2010). Sin embargo, se han discutido también las propiedades antiinflamatorias de esta citocina, ya que se conoce que IL-6 aumenta la liberación de un amplio número de proteínas que disminuyen la fase inflamatoria, como IL-10 (Gauglitz, G. *et al*, 2008). Además, se ha documentado que IL-6 puede disminuir el flujo de neutrófilos, participa en la regulación negativa de TNF y estimula la síntesis de antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra), que es un importante inhibidor de IL-1 β (Shizuo, A. *et al*, 1993; Tilg H. *et al*, 1997).

Factor de Crecimiento Transformante Beta

El TGF- β es una citocina multifuncional involucrada en la embriogénesis, crecimiento y diferenciación de un gran número de células y en los procesos inflamatorios. Es producida en mayor parte por linfocitos T, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, en placenta, hueso, riñón y células tumorales; sin embargo, se expresa por todas las células. Pertenece a una familia de citocinas que se nombra colectivamente “La superfamilia del TGF- β ” y presenta tres isoformas en mamíferos: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. Todas las células del cuerpo presentan receptores para TGF- β , de los que se conocen hasta el momento nueve, entre los cuales los receptores I y II presentan una mayor distribución. Cuando esta citocina es secretada en su forma activa, se une a sus receptores en la célula y activa una cascada de señalización a través de las proteínas R-SMAD (receptor SMAD), algunas de las cuales son transportadas al núcleo para participar en la regulación de la transcripción de genes específicos; otro subgrupo de proteínas, las I-SMAD (Inhibidor SMAD), pueden inhibir la vía de señalización del TGF- β y después son degradadas en el núcleo. (Chin, D. *et al* 2004; Wang X. *et al*, 2006)

La actividad proinflamatoria del TGF- β es esencial en la fase inflamatoria y comienza al ser secretado por las plaquetas y liberado en el sitio del daño; ahí induce la quimiotaxis de neutrófilos, monocitos,

linfocitos y fibroblastos (Yeh F. *et al*, 2002). Los distintos efectos que induce esta citocina son dependientes del tipo celular sobre el que actúa y del microambiente (Sanjabi, S. *et al*, 2009). En monocitos, induce la expresión de diversas citocinas y factores de crecimiento, como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), PDGF, TNF- α e IL-1 β y aumenta su propia producción en distintas células de manera autócrina (Broughton, G. *et al*, 2006). Su actividad facilita también la migración de granulocitos en la herida, ya que regula la actividad de metaloproteasas de matriz MMP1, MMP2, MMP3 y MMP9 (Wang X. *et al* 2006). El TGF- β puede modular la diferenciación de linfocitos T reguladores (Treg) y ayudadores 17 (Th17), de manera concentración-dependiente, así mismo actúa con IL-4 para estimular la diferenciación células T productoras de Interleucina 9 (IL-9) e IL-10, dicha actividad tiene lugar principalmente bajo condiciones proinflamatorias (Sanjabi, S. *et al*, 2009). El papel que juegue en cada órgano puede variar, sin embargo, en piel, el rol de TGF- β 1 es inicialmente pro inflamatorio por lo que el pico máximo de secreción de esta citocina coincide con el pico de la actividad inflamatoria (Wang X. *et al*, 2006). Sin embargo, su participación principal es en la fase proliferativa y de remodelación del tejido. También tiene una fuerte actividad como citocina antiinflamatoria.

En quemaduras, Yeh y colaboradores encontraron altos niveles de TGF- β en muestras de suero de pacientes quemados durante las primeras horas posteriores a la lesión (Yeh F. *et al*, 2002), mientras que Kubo y colaboradores reportan que este aumento es significativo en muestras de suero en ratas después de 12 horas de ocurrida la lesión (Kubo, H. *et al*, 2014).

La fase inflamatoria es un proceso clave en la reparación del tejido, ya que la naturaleza de dicha fase determinará el proceso de proliferación y remodelación del tejido; así, la herida puede repararse normalmente o conducir a la formación de una cicatriz después de un proceso inflamatorio crónico (Eming, S. *et al*, 2007; Darby, I., 2007; van der Veer, W. *et al*, 2008)

Resolución de la inflamación

Para que el proceso de reparación pueda llevarse a cabo de una manera satisfactoria, la inflamación debe ser resuelta correctamente, debido a que se ha comprobado que la respuesta inflamatoria está altamente relacionada con la cicatrización; por lo que es necesario que disminuyan los estímulos proinflamatorios, se disipen los mediadores, disminuya el flujo de células con actividad proinflamatoria y que eventualmente éste último se elimine totalmente (Darby, I., 2007). Dentro de

estos mecanismos antiinflamatorios se encuentra una desregulación en la producción de moléculas antiinflamatorias, como los antagonistas de IL-1 y TNF- α , apoptosis, desensibilización de los receptores involucrados por altas concentraciones de los ligandos, resolución de la inflamación mediada por el receptor de ácido hialurónico (CD44), así como la inhibición de la expresión de citocinas pro inflamatorias por IL-10. Gran parte de estos mecanismos anti inflamatorios son controlados por los macrófagos, los cuales sufren en cambio en su fenotipo pro inflamatorio a uno reparador, lo cual se considera un paso vital para la transición de la fase inflamatoria a la de proliferación (Koh, T. *et al*, 2011)

Interleucina 10

Esta citocina es reconocida por su capacidad para inducir una respuesta anti inflamatoria. Tiene una conformación homodimérica y es producida principalmente por linfocitos T, células B, monocitos, macrófagos y queratinocitos en respuesta a numerosos estímulos. La IL-10 actúa mediante su unión al receptor presente en macrófagos, células dendríticas, neutrófilos linfocitos B, T y células NK (Groux, H. *et al*, 2003) y activa la cascada de señalización JAK/STAT que actúa sobre el factor de transcripción NF- κ B; por lo que se reduce la producción de citocinas pro inflamatorias como IL-1 e IL-6 (Conti, P. *et al*, 2003); además inhibe la expresión de moléculas coestimuladoras y del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II) (Wolff, K., 2009), así como la secreción de distintos quimioatrayentes que promueven la migración de los leucocitos, como son la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y la Proteína inflamatoria de Macrófagos 1 α (MIP-1 α). En macrófagos, IL-10 inhibe la expresión de algunas citocinas, como son TNF- α IL-6, IL-12 e inhibe la expresión de moléculas de coestimulación, además de modular la actividad de las células B.

Sin embargo, IL-10 tiene diversos efectos en diferentes poblaciones celulares activadas; en linfocitos B puede actuar para inducir su cambio de fenotipo a células plasmáticas; en ellas es capaz de inducir un aumento en la proliferación y en la producción de anticuerpos, mientras que en mastocitos induce también un aumento en su proliferación (Groux, H. *et al*, 2003). En fibroblastos, su actividad es muy amplia, ya que puede disminuir la producción de colágena, aumentar la expresión de metaloproteasas de la matriz (MMPs) e inhibir su transformación a miofibroblastos (Shi, J. *et al*, 2013). En quemaduras de 2do. y 3er. Grado, se ha encontrado que los niveles de IL-10 aumentan significativamente en suero después del daño, alcanzando su primer pico máximo de expresión 4.5 días después de ocurrida la lesión. Se han encontrado diferencias significativas en los niveles de

expresión entre los pacientes que sobreviven a la herida y aquellos que fallecen; por ejemplo, en el estudio realizado por Yeh y colaboradores, todos los pacientes con quemaduras presentan una alta respuesta de IL-10 al momento de ingreso al hospital, sin embargo en los pacientes fallecidos, los niveles de esta citocina permanecieron elevados y acompañados por altos niveles de otras citocinas como IL-6 hasta su descenso, mientras que en los sobrevivientes dichas citocinas disminuyeron considerablemente al cabo de los primeros días (Yeh, F. *et al*, 2000). El aumento significativo en los niveles de IL-10 está asociado con la respuesta pro inflamatoria, pero tiene serias consecuencias, ya que al incrementarse de manera exacerbada disminuye la resistencia a infecciones (Csontos, C. *et al*, 2010)

Fase proliferativa

Esta fase tiene lugar cerca del 3er día y hasta 2 semanas después del insulto y se caracteriza por la migración, proliferación y producción de proteínas de la matriz extra celular por los fibroblastos. Comienza con la formación de un tejido de granulación que sirve como medio de anclaje y adhesión de las nuevas células que llegan al sitio o que son producto de la proliferación de las primeras, así como fuente de factores de crecimiento y citocinas. Dicho tejido se compone de fibrina, fibronectina y ácido hialurónico, los cuales son producidos por los fibroblastos que migran al sitio de la herida siendo atraídos por factores de crecimiento, principalmente TGF- β . Eventualmente, este tejido provisional es reemplazado principalmente por una matriz de colágena (Singer, A. *et al*, 1999).

La fase proliferativa es en un inicio regulada por los macrófagos que han sido activados de manera alternativa para producir TGF- β , VEGF, prostaglandina E₂, además de citocinas y factores de crecimiento involucrados en la angiogénesis, depósito de matriz extracelular y reepitelización (Brancato, S. *et al* 2011).

De esta manera, la actividad de los macrófagos después de la fase inflamatoria conduce no sólo a la resolución de la inflamación, sino también a la proliferación y remodelación del tejido dañado.

El papel de TGF- β en la reparación del tejido

Una de las moléculas con participación importante en la migración, proliferación, diferenciación y activación de fibroblastos, y por tanto en la producción de colágena y la fibrogénesis, es el TGF- β .

Como citocina clave en la reparación del tejido, el TGF- β regula la expresión de muchas proteínas de la matriz extracelular, como colágena I, III, V, VI, fibronectina, tenascina, proteoglicanos, etc. (Branton, M. *et al* 1999) Asimismo, esta citocina modula no sólo la síntesis de metaloproteasas (MMP) sino que además estimula la producción de sus inhibidores (TIMP) (Rosenbloom, R. *et al* 2008). El TGF- β está también involucrado la regulación del cambio de fenotipo de los fibroblastos a miofibroblastos, a través de las proteínas Smad (Evans, R. *et al* 2003) Dichos miofibroblastos presentan características fenotípicas de células de músculo liso y fibroblastos, con morfología similar a la de los fibroblastos, alta expresión de fibras de α -actina de músculo liso (α SMA) y filamentos intermedios que pueden ser de vimentina y/o desmina. La función de los miofibroblastos en la herida consiste en la contracción de la misma, además de la producción de altas cantidades de colágenas (Darby, I. *et al*, 2007; Li, B. *et al*, 2011) Los miofibroblastos realizan su función principalmente durante la fase proliferativa y una vez que la herida se ha reparado, su población celular muere por un proceso apoptótico. (Darby, I. *et al*, 2007). Sin embargo, bajo ciertas condiciones, como la inflamación crónica, los miofibroblastos pueden permanecer constitutivamente, conduciendo a la fibrosis crónica y ésta a su vez, a una reparación aberrante de la herida (McAnulty, 2007)

Se ha demostrado que otras poblaciones celulares que participan en la fase inflamatoria pueden estimular de manera paracrina a los fibroblastos para proliferar, diferenciarse a miofibroblastos y producir mayores cantidades de colágena, mediante la secreción de TGF- β . Los fibrocitos, células originadas de médula ósea que se caracterizan por presentar una morfología similar los fibroblastos, producción de colágena y presentación de antígenos, llegan rápidamente al sitio de la herida y son una fuente importante de TGF- β ; se sabe que la producción de esta citocina está directamente relacionada con el tamaño de la quemadura, ya que el tamaño de la herida es directamente proporcional al número de fibrocitos (Yang, L. *et al*, 2002). También se ha determinado que la fuente principal de TGF- β puede provenir de linfocitos CD4+, cuya población alcanza su pico durante la fase proliferativa y se ve aumentada en pacientes con quemaduras (Wang, J. *et al*, 2007) Así, distintas fuentes celulares pueden sensibilizar a los fibroblastos a producir TGF- β y mantener una retroalimentación positiva mediante un mecanismo autocrino de comunicación (Rosenbloom, J. *et al*, 2008)

Relación entre la fase inflamatoria y la fase proliferativa

Debido a que muchos factores que participan en la reacción inflamatoria regulan también la proliferación del tejido; existe una estrecha relación entre estas dos fases que ha sido motivo de muchos estudios, los cuales han permitido llegar a la conclusión de que la fase inflamatoria no sólo es necesaria para que proceda la fase proliferativa, sino que además es la naturaleza de la fase inflamatoria quien determina el proceso de curación y cicatrización de la herida (Darby, I. *et al*, 2007).

Como ya se mencionó, las quemaduras presentan característicamente una elevada respuesta proinflamatoria, que se caracteriza por mantener el flujo de distintas poblaciones celulares, principalmente por linfocitos T y macrófagos, así como exacerbados niveles de citocinas proinflamatorias, que además promueven la proliferación de queratinocitos y fibroblastos. Por ejemplo, se ha demostrado que tanto TNF- α como IL-1 β actúan sinérgicamente en la remodelación del tejido y ambas tienen actividad profibrótica en el proceso de cicatrización, a pesar de ser potentes inductores de metaloproteasas (Salgado, M. *et al*, 2012). De igual manera, IL-6 participa en la producción de moléculas de la matriz extracelular y en la diferenciación de los fibroblastos mediante la activación de STAT3 en cicatrices hipertróficas (Ray, S. *et al*, 2013), mientras que IL-10 actúa como inhibidor del TGF- β , de la producción de colágeno e inductor de la expresión de MMPs (Shi, J. *et al*, 2013).

De esta manera, una exacerbada o crónica reacción inflamatoria, como la que se presenta en las quemaduras de segundo grado, puede conducir a que los niveles de citocinas proinflamatorias y fibrogénicas, principalmente TGF- β , permanezcan sobre los niveles normales y que ello conduzca a un proceso de reparación fibrótico y a la posterior formación de cicatrices aberrantes (ver Figura 4) (Darby, I. *et al*, 2007; van der Veer, W. *et al*, 2008; McAnulty, R., 2007).

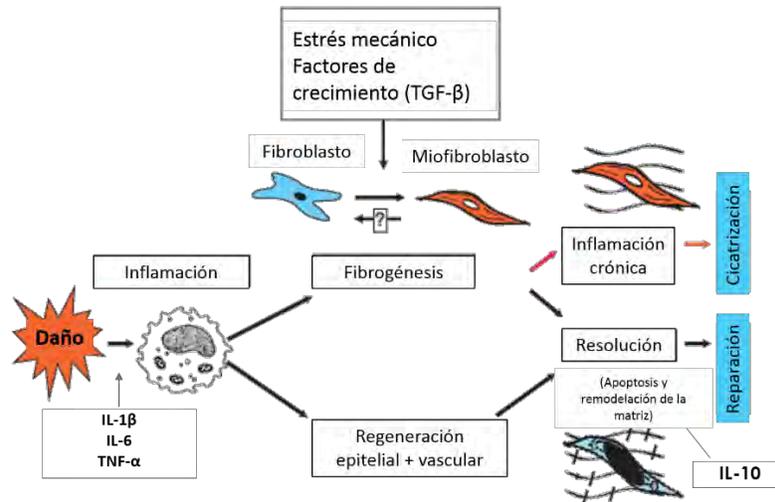


Figura 4. Modelo general de la reparación “vs” fibrosis crónica. La diferenciación de los fibroblastos está determinada por el estrés mecánico y la acción de TGF-β. El estrés mecánico se refiere a la fuerza de contracción que ejercen los fibroblastos y miofibroblastos para cerrar la herida, dicha fuerza puede estimular el cambio de fenotipo en los fibroblastos. La no resolución o retraso de la resolución de la inflamación puede conducir a la fibrosis crónica. Tomado de (Darby, I. *et al*, 2007)

Reparación aberrante: Cicatrices hipertróficas y queloides

La fibrosis, que es resultado de una exagerada fase inflamatoria, puede ser definida como el reemplazo de los elementos estructurales normales del tejido por una acumulación no funcional de colágena y demás tejido de cicatrización (Diegelmann, R. *et al*, 2004). Este reemplazo está asociado a un gran número de padecimientos en diferentes órganos; en piel conduce a la formación de cicatrices hipertróficas y queloides.

Las cicatrices hipertróficas se caracterizan por presentar una coloración rosada o rojiza, usualmente no exceden los límites de la herida y con frecuencia pueden desaparecer o disminuir su tamaño con el tiempo (Wolfram, D. *et al*, 2009). Su prevalencia difiere entre el color de piel y la edad; y es bastante alta posterior a una quemadura, ya que se estima que en los niños y personas afroamericanas alcanza hasta el 75%, mientras que en caucásicos es aproximadamente en un 60% (Bombaro, K. *et al*, 2003). Los queloides en cambio, se desarrollan más allá del borde de la herida y rara vez disminuye su tamaño con el tiempo (Tuan, T. *et al*, 1998). Su desarrollo depende de varios factores y su prevalencia después de las quemaduras es del 80% (Gagnani, A. *et al*, 2010).

Las cicatrices hipertróficas y queloides se caracterizan por presentar una depósito excesivo de colágena e inhibición en su degradación en la dermis y tejidos subcutáneos, lo cual resulta en anomalías en el tejido y dolor, con ello el paciente presenta una disminución en su calidad de vida. Histológicamente (ver Figura 5), las cicatrices hipertróficas y queloides exhiben sus fibras de colágena en la dermis alineadas en un plano paralelo a la epidermis, además de ser más abundantes y más gruesas; la población celular [caracterizada por miofibroblastos con filamentos de α -SMA y filamentos intermedios de desmina principalmente (Darby, I. *et al* 2007)] y los vasos sanguíneos en la dermis se encuentran en menor número y están distribuidos únicamente en “islas” rodeadas de colágena. Además, los paquetes de colágena en los queloides se encuentran mayormente concentrados, formando nódulos de colágena distribuidos entre la dermis (Tuan, T. *et al*, 1998). Los fibroblastos denominados queloides producen hasta 12 veces más colágena que los fibroblastos normales; mientras que los fibroblastos que se presentan en cicatrices hipertróficas producen hasta 4 veces más (Gagnani, A. *et al*, 2010).

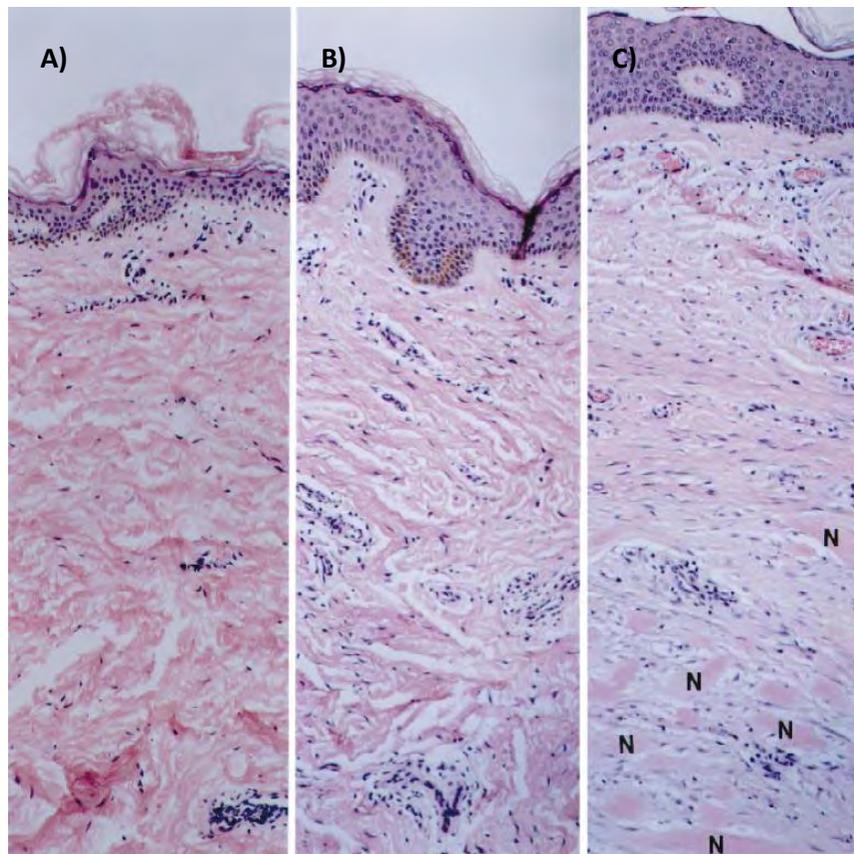


Figura 5. Comparación histológica entre piel normal, cicatriz hipertrófica y queloide. A) Piel normal, con células distribuidas uniformemente en la dermis y fibras de colágena irregulares. B) Cicatriz hipertrófica. C) Queloide. Tanto en B como en C se muestra un exceso de colágena alineada con la epidermis, población celular concentrada en islas y presencia de nódulos de colágena (N) en C. Tomada de (Tuan, I. *et al*, 1998).

Diversos estudios *in vitro* han demostrado que los fibroblastos provenientes de cicatrices hipertróficas y queloides difieren en su actividad de los fibroblastos normales de dermis mostrando una alta producción de distintas citocinas pro inflamatorias. En presencia de TGF- β , los fibroblastos provenientes de estas cicatrices aumentan su producción de colágena III y su proteína chaperona Heat Shock Protein 47 (HSP47), quien participa en la secreción de la colágena (Maitoh, M. *et al*, 2001), además de que presentan un porcentaje de contracción mayor cuando son sembrados en un gel de colágena en comparación con los fibroblastos normales (Smith P. *et al*, 1999). Además, Xue y colaboradores reportaron que en fibroblastos obtenidos de queloides se presentan altos niveles de IL-6 (Xue, H. *et al*, 2000) mientras que Boyce y colaboradores reportan una alta población de macrófagos y linfocitos CD3+ que relacionan con el incremento en las citocinas TNF- α e IL-1 β en queloides (Boyce, D. *et al*, 2001).

Algunos tratamientos contra las cicatrices hipertróficas y queloides están enfocados en disminuir y potenciar la respuesta inflamatoria, así como la producción de TGF- β y moléculas de la matriz extracelular. Por ejemplo, el uso de esteroides inyectados en la dermis papilar, como acetónido de triamcinolona y dexametasona, inhiben la óxido nítrico sintetasa y la proliferación de fibroblastos, disminuyendo entonces la producción de colágena. La terapia a base de esteroides comúnmente se combina con la crioterapia, que facilita la aplicación del esteroide y su absorción por parte del tejido, sin embargo puede tener efectos secundarios adversos como dolor y atrofia. Otros métodos son la escisión quirúrgica de la cicatriz y la presoterapia, que es muy usada en pacientes que desarrollan fibrosis por quemaduras; mientras que la escisión tiene un alto porcentaje de recurrencia, la presoterapia es poco funcional en lesiones con más de seis meses de evolución. También se ha explorado el uso terapéutico de Inmunomoduladores y antiinflamatorios como posibles antifibróticos, por ejemplo: Interferón α , que inhibe la producción de colágenas I y III, el Imiquimod, que es afín a algunos de los receptores toll like y que puede causar la degradación de la colágena y algunos agentes como tacrolimus y el sirolimus, que afectan directamente la producción de TNF- α y otras citocinas proinflamatorias (Ávila, A. *et al*. 2014). Sin embargo, actualmente no existen tratamientos que sean completamente eficientes para evitar el desarrollo de cicatrices aberrantes (Patel, P. *et al*, 2012; Rosenbloom, J. *et al*, 2008; Bloemen, M. *et al*, 2009), por lo que la mayoría de las medidas contra el desarrollo de estas fibrosis se enfocan en la prevención.

Pirfenidona

La pirfenidona (PFD) es una piridina (5-metil-1-fenil-2(1H)-piridona) que ha sido usada anteriormente como antihelmíntico y actualmente se encuentra en Fase clínica III por sus efectos antifibróticos en el tratamiento contra la fibrosis pulmonar idiopática. Por su estructura simple (ver figura 6), esta molécula es capaz de moverse a través de las membranas celulares sin requerir un transportador, además de que se ha reportado que no tiene efectos tóxicos a dosis menores a 2500 mg/al día, aunque los efectos adversos que produce (náuseas, dolor de cabeza, vómito, etc.) disminuyen cuando se administra oralmente acompañada con alimentos (Macías-Barragán, 2010).

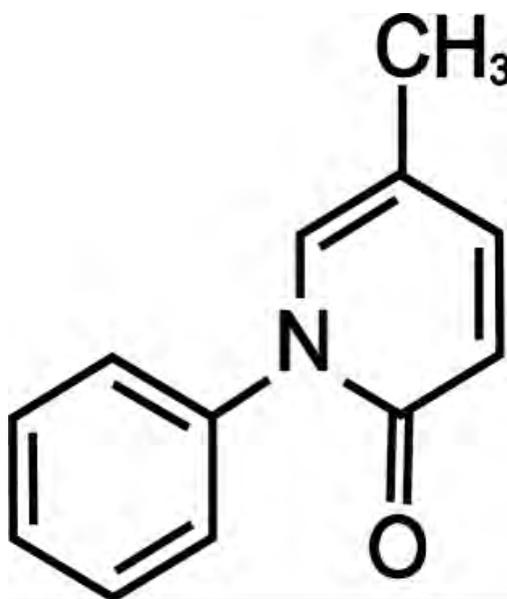


Figura 6. Estructura de Pirfenidona, Peso molecular: 185.22 [g/mol], Fórmula molecular: $C_{12}H_{11}NO$

Tomada de (Macías-Barragán, J. et al, 2010)

La pirfenidona se metaboliza rápidamente en el cuerpo, se ha estimado que su vida media de ésta después de su ingesta oral en forma de tabletas es de aproximadamente 2.5 hrs en adultos saludables; su principal vía de eliminación es a través de la orina, donde se elimina hasta el 80% del fármaco (Rubino, C. et al, 2009). Más de un 95% de la PFD se elimina como ácido carboxílico, y no se han encontrado los intermediarios que participan en esta reacción, por lo que se sugiere que es metabolizada a una alta velocidad, mientras que menos del 1% se elimina como PFD y menos del 0.1% se elimina en forma de sus metabolitos 4-hidroximetil o 5-hidroxil (Giri, S. et al, 2002) (Rubino, 2009). La enzima que realiza este proceso es el citocromo CYP1A2, perteneciente a la superfamilia

P450, sin embargo, múltiples isoformas de ésta misma participan también en la degradación de la pirfenidona (Rubino, C. *et al*, 2009). El fármaco también se distribuye en los tejidos rápidamente cuando se aplica directamente de manera tópica; Sun y colaboradores han probado la distribución de PFD en el ojo aplicando gotas de dicho fármaco al 0.5% diluido en agua estéril. En su estudio observaron que PFD se distribuye rápidamente en el tejido y permanece en el cuerpo por poco tiempo, entre 18 y 72 minutos; sin embargo, esta media puede prolongarse si se aplica en pomada (Sun, G. *et al*, 2011).

Se sabe que pirfenidona presenta una alta afinidad por p38 perteneciente a la familia de las MAPK y descrita como una proteína cinasa activada por estrés (SAPKs), ya que puede ser activada por numerosos factores que causan estrés celular, entre ellos el daño al DNA, radiación UV, estrés oxidativo y osmótico, y en respuesta a algunas citocinas proinflamatorias, entre ellas IL-1, y al TGF- β (Coulthard, L. *et al*, 2009). Este miembro de las MAPKS actúa activando distintos factores de transcripción, proteínas cinasas y proteínas nucleares, lo que conduce a desencadenar una respuesta inflamatoria, al arresto del ciclo celular, a la diferenciación celular, apoptosis, senescencia, producción de citocinas y regulación del empalme del RNA (Coulthard, L. *et al*, 2009). Por ello, es probable que la actividad antifibrótica y antiinflamatoria de PFD sea resultado de la inhibición de p38 en la vía MAPK (Ma, Z. *et al*, 2013).

La pirfenidona ha sido ampliamente probada en modelos *in vitro* e *in vivo*; su eficacia ha sido evaluada en modelos de fibrosis pulmonar, hepática y renal con resultados prometedores. (Macías-Barragán, J. *et al*, 2010). Usando el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina Iyer y colaboradores (Iyer, S. *et al*, 1999) probaron la pirfenidona como tratamiento contra fibrosis pulmonar en hamsters. En sus resultados reportaron un aumento significativo en los niveles de TGF- β en el grupo tratado sólo con bleomicina, mientras que el grupo tratado con bleomicina y pirfenidona mostró una disminución significativa en los niveles de TGF- β , a nivel postranscripcional y de mRNA, por lo que concluyeron que pirfenidona actúa como antifibrótico inhibiendo el TGF β a nivel transcripcional. Hirano y colaboradores (Hirano, A. *et al*, 2006) también reportaron una disminución en los niveles de TGF- β después del tratamiento con PFD en su ensayo sobre la actividad de dicho fármaco en hiperrespuesta de las vías aéreas y la inflamación crónica de éstas durante el asma bronquial. En este estudio, los autores estimularon las vías respiratorias con ovoalbúmina para inducir una sensibilización a ratones para presentar una hiperrespuesta, tras lo

cual midieron el flujo de leucocitos en el lugar y los niveles de citocinas que característicamente se encuentran elevadas en este tipo de respuesta. En sus resultados, los autores reportan una disminución en el flujo de eosinófilos y linfocitos en el sitio sensibilizado con el tratamiento con PFD, además de una disminución de las citocinas IL-4, IL-5, IL-13 y los factores de crecimiento PDGF Y TGF- β en relación con un grupo control sensibilizado en ausencia de PFD.

La actividad antifibrótica de PFD también se ha probado en el efecto sobre la expresión de MMP y TIMP. Di Sario y colaboradores (Di Sario, A. *et al*, 2004) realizaron un estudio con PFD sobre fibrosis hepática, la cual fue inducida en ratas tres semanas antes de la administración del fármaco a probar en la dieta del grupo experimental. Posteriormente, se tomaron muestras de sangre y de hígado, para medir la expresión de α -SMA, procolágena α 1, TGF- β ₁, TIMP-1 y MMP-2 por las células estelares del hígado mediante *western blot* y *northern blot*. En sus resultados, encontraron que el grupo experimental tratado con PFD, mostró niveles menores de la proteína α -SMA, además menores niveles de mRNA que codifica para procolágena α 1, TGF- β , TIMP-1 y MMP-2. Por lo que concluyeron que el potencial antifibrótico de PFD radica en su actividad para disminuir los niveles de mRNA de TGF- β , lo cual tiene como consecuencia una reducción en los niveles de procolágena α 1 y TIMP-1, ya que ambos están regulados por el primero.

Nakayama y sus colaboradores (Nakayama, S. *et al*, 2007) estimularon fibroblastos de pulmón de humano con TGF- β que después fueron tratados con PFD para posteriormente evaluar los niveles de expresión, tanto a nivel de mRNA como de proteína, de colágena I y la proteína chaperona HSP 47, la cual está involucrada en la secreción de la colágena. En su estudio, los fibroblastos tratados únicamente con TGF- β mostraron un aumento significativo en la expresión de colágena I y HSP47, mientras que en el grupo estimulado por TGF- β y tratado con PFD mostró una disminución significativa en la expresión de ambas, a nivel transcripcional y proteico, de manera dosis-dependiente. Así, ellos concluyeron que el efecto antifibrótico de la PFD está dado no sólo por la inhibición de la expresión de la colágena I, sino también a través de la inhibición de la HSP47.

Por otro lado, se han comenzado a estudiar las vías de señalización en las que interviene la pirfenidona en modelos *in vitro*. Conte y colaboradores (Conte, E. *et al*. 2014) estimularon con TGF- β fibroblastos con fenotipo de fibrosis pulmonar idiopática para inducir una mayor producción de α SMA y colágena 1 (Col-1). Al mismo tiempo se adicionó pirfenidona en el medio de cultivo del

grupo experimental durante 48 horas. Posteriormente hicieron pruebas de citotoxicidad y proliferación y evaluaron niveles de α SMA, colágeno tipo 1 (col-1) así como la actividad de Smad3, p38 y Akt, las cuales son participantes en la cascada de señalización del TGF- β . Los autores reportaron que pirfenidona no tiene efectos citotóxicos en los fibroblastos en las dosis usadas; sin embargo sí disminuye la proliferación celular. La pirfenidona induce también una disminución en los niveles de mRNA de α SMA de manera dosis dependiente, con y sin el estímulo de TGF- β ; Col-1 también disminuye en sus niveles de mRNA y proteína de manera dosis dependiente con el tratamiento, sin embargo no disminuye de sus niveles basales. En las pruebas realizadas sobre la actividad de Smad3, p38 y Akt, los autores reportaron que dichas proteínas se inhiben bajo el tratamiento con pirfenidona a la mayor concentración usada en el estudio. Por lo cual, concluyen que la actividad antifibrótica de PFD está dada por su actividad directa sobre la cascada de señalización del TGF- β .

También se ha propuesto el uso de PFD para el tratamiento de cicatrices queloides, Masuyoshi y su equipo (Masuyoshi, S. *et al.* 2011) usaron un modelo de contracción de la herida, el cual consistió de gel de colágeno al que se le sembraron fibroblastos queloides. La contracción del gel fue examinada con y sin TGF- β , en presencia o ausencia de PFD. En sus resultados, ellos reportaron una contracción del gel significativamente mayor bajo el estímulo de TGF- β , la cual disminuyó en presencia de la PFD. De manera adicional, evaluaron la expresión de mRNA de TGF- β , del factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF), de α SMA y col-1 en fibroblastos queloides con y sin PFD. La expresión de α SMA y CTGF disminuyó significativamente en presencia de PFD, por lo que sus resultados muestran el potencial de la PFD en el tratamiento de cicatrices queloides.

Adicionalmente, se ha reportado que pirfenidona inhibe la secreción de otras citocinas proinflamatorias. Nakasato y colaboradores (Nakasato, S. *et al.*, 2002) estimularon la línea celular RAW264.7, procedente de monocitos de ratón, para la producción de citocinas proinflamatorias; los niveles en éstas en el sobrenadante fueron evaluados con y sin PFD. Sus resultados muestran una disminución en los niveles de TNF- α , IL-6 e IFN- γ en presencia de PFD. Evaluaron también la expresión de mRNA de dichas citocinas con y sin PFD, sin encontrar resultados significativos, por lo que concluyen que PFD actúa a nivel traduccional a través de un mecanismo de señalización dependiente de MAPK2. Además, PFD aumentó los niveles de IL-10 a nivel transcripcional, lo cual sugiere que PFD no sólo actúa como un anti fibrótico, sino también como antiinflamatorio.

La actividad de PFD sobre queloides ya ha sido evaluada en modelos murinos. Shetlar y colaboradores (Shetlar, M. *et al*, 1998) realizaron injertos de tejido queloide, proveniente de cirugías plásticas, en ratones atómicos. El tejido fue medido y pesado antes de realizar el implante, de igual manera al momento de retirarse. Los ratones del grupo experimental con PFD la recibieron en la dieta después del implante. En sus resultados, reportaron una disminución del peso húmedo y seco del implante de tejido queloide en aquellos ratones bajo tratamiento con PDF, a diferencia de los ratones en ausencia de dicho fármaco, por lo que concluyen que PFD puede ayudar a aumentar la tasa de degradación y reabsorción del tejido.

Antecedentes

Recientemente se han realizado estudios clínicos en pacientes con cicatrices hipertróficas y queloides, en las cuales se pusieron a prueba los efectos de PFD como antifibrótico. Salmeán (Salmeán, O., 2009) realizó un ensayo clínico para evaluar la actividad antifibrótica de la aplicación tópica de PFD en gel al 8% en cicatrices hipertróficas y queloides producidas por distintas causas, entre ellas quemaduras. El ensayo, con seguimiento durante 12 meses, buscó determinar la efectividad del tratamiento actuando sólo o en complemento con alguna otra terapia, la presencia o ausencia de efectos secundarios, así como las ventajas y desventajas del mismo. Para ello, se incluyó a pacientes con cicatrices hipertróficas o queloides, sin rango de edad, a los que se les aplicó PFD en gel en el área de estudio tres veces al día durante los 12 meses del ensayo. Cada mes se capturó en fotografías la evolución de la cicatriz, después se midieron las dimensiones de la misma, se compararon los cambios en la coloración y apariencia de la superficie y también se aplicó la escala de Vancouver para comparar la plegabilidad, altura, vascularidad y pigmentación de la cicatriz. El estudio mostró la regresión de las cicatrices en la mayoría de los pacientes, por lo que se concluyó que PFD es una molécula con un gran potencial antifibrótico que produce además pocos efectos secundarios.

Armendariz- Borunda (Armendariz-Borunda, *et al*, 2012) realizó un estudio prospectivo similar al mencionado anteriormente, pero con la aplicación de PFD en pacientes pediátricos con cicatrices hipertróficas o queloides producto de quemaduras. Los pacientes incluidos en el estudio fueron niños de entre 3 y 16 años, con cicatrices hipertróficas o queloides producto de quemaduras de cualquier etiología y que éstas tuvieran al menos tres meses de evolución sin tratamiento previo. El tratamiento consistió en la aplicación tópica de PFD en gel al 8% en la cicatriz tres veces al día, durante 6 meses; el grupo control recibió la terapia por presión sin PFD. La evolución de la cicatriz fue evaluada cada mes y mediante la escala de Vancouver, dichos parámetros fueron comparados en el tiempo para cada paciente, asimismo, se comparó el grupo experimental con el grupo control. Al cabo de los seis meses, Los autores encontraron una notable mejoría en los pacientes tratados con PFD, alcanzado la reducción de la cicatriz hasta un 67% en algunos pacientes. Cada uno de los pacientes mostró diferencias significativas en los valores de la escala de Vancouver iniciales con respecto a los finales. De la misma manera, se encontraron diferencias significativas entre el valor promedio de la regresión de la cicatriz con cada tratamiento; ya que en aquellos pacientes tratados con presión, el tamaño de la misma se redujo únicamente un 16% en promedio. El estudio reporta

la presencia de efectos secundarios, los cuales incluyen la formación de erupciones o eritemas en el 12% de los pacientes tratados con PFD; sin embargo, éstos desaparecieron una hora después de la aplicación del mismo. Por lo tanto, los autores concluyen que PFD puede ser una muy buena opción en el tratamiento de estas cicatrices.

Peral (Peral, M., 2013) realizó un estudio clínico en el que evaluó la velocidad del proceso de cicatrización, tamaño y calidad de las cicatrices en pacientes pediátricos que presentaron quemaduras de segundo grado. El estudio propuso la aplicación tópica de PFD podía modular la fase inflamatoria inicial después de una lesión por quemadura; para ello, se escogieron pacientes entre 5 meses y 17 años que presentaran quemaduras de segundo grado de cualquier tipo, que no rebasara el 30% de extensión y que no tuvieran más de 48 horas de evolución. El fármaco PFD fue aplicado como gel en el área de la lesión durante tres semanas; en las que se evaluó el tamaño de la cicatriz por planimetría, la calidad de cicatrización por escala de Vancouver y la velocidad de cicatrización mediante una evaluación visual. El estudio demostró que los pacientes con el tratamiento con PFD presentaron una disminución en la cicatrización que fue estadísticamente significativa; sin embargo, no encontraron diferencias entre el tiempo de recuperación de los pacientes con y sin tratamiento. Por todo lo anterior, PFD ha demostrado ser un fármaco con potente actividad antiinflamatoria y antifibrótico que debe ser aprovechada (Figura 7).

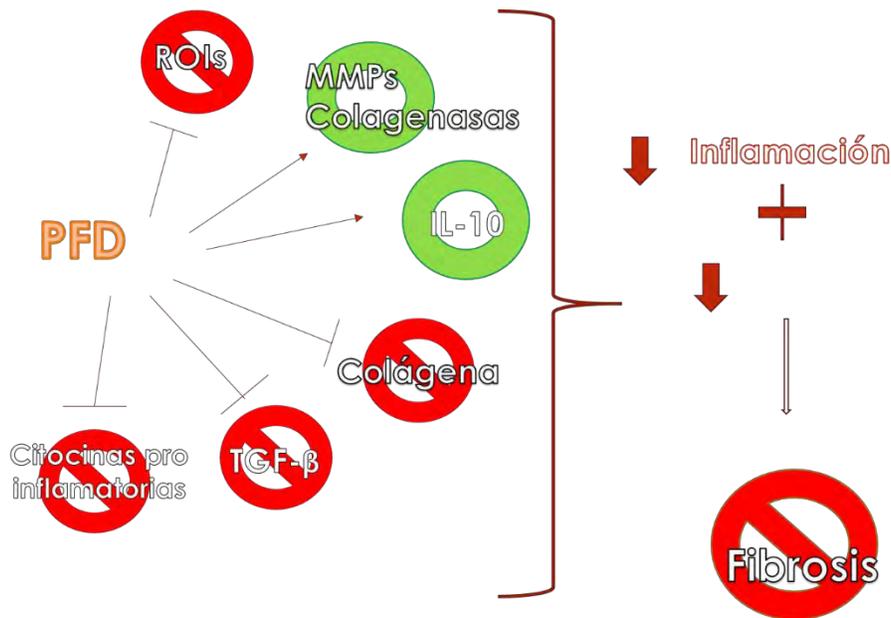


Figura 7. Potencial antifibrótico y antiinflamatorio de pirfenidona. Modificado de Macías-Barragán, J. *et al*, 2010.

Justificación

En las lesiones por quemaduras se observa de manera inmediata una potente respuesta inflamatoria, la cual se incrementa durante las primeras horas posteriores al daño, y se mantiene exacerbada por tiempos prolongados. Este proceso inflamatorio y las citocinas producidas se han asociado fuertemente con una profundización de la herida y procesos fibróticos de la reparación de la lesión. Por otra parte se ha observado que la utilización de agentes antiinflamatorios durante las primeras 24 horas posteriores a la quemadura, favorecen a una mejor reparación de la herida en términos de una menor profundización de la lesión y una cicatrización menos fibrótica. Sin embargo no se conocen las vías de señalización que modulan dichos efectos, por lo que resulta necesario estudiar no solo el efecto de la administración de estos agentes sino también el patrón de citocinas que se liberan en el micro ambiente de la lesión como resultado de la administración tópica de ellos. En particular la pirfenidona ejerce un importante papel anti inflamatorio, modulando la expresión de distintas citocinas, por lo que estudiar los efectos de su administración en lesiones de quemaduras de segundo grado y en equivalentes tisulares dérmicos permitirá no solo abundar en el conocimiento de dichos mecanismos sino también en ofrecer nuevas estrategias terapéuticas. Por lo que es necesario evaluar el patrón de citocinas anti y pro inflamatorias en lesiones de quemaduras tratadas de manera temprana con pirfenidona

Hipótesis

Si la pirfenidona administrada tópicamente en un gel al 8% modula la respuesta antiinflamatoria, entonces al administrarla directamente sobre lesiones de quemaduras de segundo grado se observará una disminución en la producción de TGF- β .

Objetivos

Objetivo general

Demostrar que la aplicación de la pirfenidona en quemaduras de segundo grado en pacientes pediátricos, induce una disminución en la respuesta proinflamatoria y profibrótica.

Objetivos particulares

- Evaluar en lesiones de quemaduras de segundo grado, la producción de TGF- β después de la administración de pirfenidona
- Evaluar en lesiones de quemaduras de segundo grado, la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 en presencia y ausencia de la administración de pirfenidona.

Material y método.

Consideraciones éticas.

Todas las muestras de tejidos utilizados en este estudio fueron colectadas de pacientes de entre 3 y 18 años de edad con lesiones por quemaduras de segundo grado superficial o profundo, que tuvieran una extensión afectada de entre el 10 y 30% de superficie corporal, que no cursaran con lesiones agregadas y/o quemaduras de vías aéreas, de acuerdo a las consideraciones éticas propuestas en el **PROYECTO DE INVESTIGACIÓN** (ensayo clínico controlado, aleatorizado, doble ciego) aprobado por los correspondientes **COMITES DE ÉTICA**, incluyendo criterios de selección (inclusión, no inclusión y eliminación), así como la firma del correspondiente consentimiento informado, por lo que en esta tesis con la finalidad de resguardar plenamente la información personal de los participantes, no se mencionarán: nombres, iniciales ni centros hospitalarios de atención.

Después aprobar los criterios de inclusión, a los sujetos seleccionados se les asignó un número de identificación único, y posteriormente se les asignó el tipo tratamiento que les correspondía, experimental o control (Ver apéndice 1).

Aplicación de tratamiento y toma de biopsia

Una vez que los pacientes aprobaron los criterios y demás requisitos para incorporarse al ensayo, se les tomó una biopsia de piel lesionada antes de aplicar el tratamiento.

De acuerdo al tratamiento asignado, a cada individuo se le aplicó PFD en gel al 8% o el vehículo, según correspondiera. El gel se aplicó formando una delgada capa sobre la quemadura, cada 12 horas durante al menos dos días, empezando después del ingreso del paciente al hospital; para un total de 4 a 6 aplicaciones. Después de que se realizaron dichas aplicaciones, se procedió a tomar una nueva biopsia de aproximadamente 3mm del centro la lesión, en cada paciente.

Las biopsias fueron fijadas mediante inmersión en solución de Zamboni y posteriormente fueron enviadas al Laboratorio de Inmunoterapia Experimental, del departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM, en la Ciudad de México, para su análisis. La muestra fue procesada en el laboratorio, mediante técnica histológica en parafina. De cada biopsia se

obtuvieron 5 cortes de 5 a 7 micras de espesor, cada uno de los cuales fueron teñidos mediante la técnica inmunohistoquímica (IHQ) dirigida contra las citocinas TGF- β , TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10.

Procesamiento por inmunohistoquímica

Para llevar al cabo la técnica IHQ, los cortes histológicos fueron desparafinados y rehidratados con agua desionizada y PBS. En los cortes para TNF- α , fue necesario realizar una técnica de recuperación antigénica, con buffer de citratos 0.1 M, pH= 6, en olla express a 120°C durante 3 minutos y posteriormente lavados con agua destilada. Se inhibió la peroxidasa endógena en todos los cortes con H₂O₂ en PBS al 3% durante 10 minutos. Después, se realizaron 3 lavados con PBS durante 10 minutos cada uno, al finalizar se bloquearon con PBS/Albúmina 0.1%/tween 0.05% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al terminar el bloqueo se incubaron durante 60 minutos a 37°C con el anticuerpo primario a la dilución correspondiente: TGF- β (Ms mAb TGF- β (abcam) 1/200), IL-1 β (Rb pAb IL-1 β (abcam) 1/200), IL-6 (Rb pAb IL-6 (abcam) 1/800) e IL-10 (Rb pAb IL-10 (abcam)). Luego de la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados nuevamente con PBS, cada uno durante 10 minutos y después se incubaron nuevamente con PBS/Albúmina al 0.1%. Al término de los lavados, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente: anti rabbit (pAb Rb IgG biotinado) y anti mouse (pAb Ms IgG biotinado), durante 60 minutos a 37°C. Finalmente se repitieron los lavados con PBS de la misma manera que los anteriores y los cortes fueron revelados con una solución de diamino bencidina (DAB).

Análisis cualitativo de las muestras.

Previo al análisis morfométrico con ayuda del software Image Pro Plus 7.0, se realizó una descripción cualitativa en función de la intensidad de la marca en las distintas biopsias con cada citocina. Dicha descripción consistió básicamente en la asignación de una etiqueta en una escala de “negativa” (aquellas muestras que no presentaran marca de IHQ) hasta “alta” para aquellas en las que la marca era de la mayor intensidad. Asimismo, se asignó una descripción cualitativa del estado del paciente; como “Inflamación” el caracterizado por alta expresión de citocinas proinflamatorias en la segunda o muestra ambas, y “Progresión” en aquellos pacientes que presentaron una disminución en dos o más citocinas proinflamatorias y aumento en IL-10. Dado que más de un paciente contó con más de un par de biopsias, se designó cada par como “caso”, teniendo un total de 23 casos pertenecientes a 19 pacientes.

Toma de fotos y análisis morfométrico mediante el programa IMAGE PRO PLUS 7.0®

Para realizar el análisis morfométrico, se procedió a tomar fotografías de los cortes histológicos, con una cámara digital Nikon DS-F, acoplada a un microscopio vertical Nikon Eclipse 80i y el software de captura Nis Elements-F, instalado en un equipo pc con Windows XP.

Para tomar las fotografías, previamente se seleccionaron los mejores parámetros de iluminación, en el microscopio con intensidad máxima de luz y en el programa de captura los parámetros y modificaciones digitales, éstos últimos se guardaron y se aplicaron a todas las fotografías. Se cuidó minuciosamente que cada fotografía fuera tomada con los mismos parámetros de luz. De cada corte histológico de piel, se tomaron entre 15 y 25 fotografías, dependiendo del tamaño del corte; las fotografías se capturaron con la lente objetiva de 40X para el análisis y de 4X para tener una imagen panorámica del corte.

El análisis morfométrico se realizó mediante la utilización del software de análisis morfométrico Image Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics), para lo cual fueron estandarizados los parámetros de calibración de área y densidad óptica, así como los rangos de color a analizar. Posteriormente, se realizó una programación para llevar al cabo el análisis de las fotografías de manera automática; el cual se aplicó a cada una de las fotografías tomadas con el lente de 40X de todas las citocinas evaluadas. Dicho macro contenía los siguientes pasos:

1. *Calibración espacial: El programa, de manera automática, entrega los resultados en unidades de pixel, por lo que fue necesario grabar una calibración para que las unidades de los resultados fueran entregadas en micrómetros. Esta opción fue calibrada en la barra de herramientas superior, sobre la opción [Measure] -> [Calibration] -> [Spatial calibration], la última opción abre una ventana donde se configura la calibración (Figura 8.b).*
2. *Calibración de intensidad: Esta calibración se realiza para indicarle al programa el rango de colores que se deben de considerar como oscuros y claros, para que se pueda llevar a cabo el cálculo de la densidad óptica. De manera similar a la anterior, la herramienta fue aplicada en [Measure] -> [Calibration] -> [Intensity calibration] y ajustando la curva a "Std. Optical Density", después se configuró con los colores de imagen la imagen que presentó la marca de IHQ más intensamente teñida (Figura 8.c).*
3. *Segmentación: Esta herramienta permitió escoger el rango de color que se determinó como marca positiva para IHQ. Para ello, fue necesario acceder a la barra de herramientas [Count/size] -> [Intensity range selection] -> [Manual], con lo que se abre la ventana de "Segmentation". Para este análisis, se eligió determinar el color mediante el histograma de color y utilizando el canal HSI (tonalidad, saturación e intensidad), ya que mediante este sistema fue más sencillo discriminar los colores. Finalmente se determinó un rango de tonalidad (H) que abarcaba toda la marca considerada por el usuario como positiva, este rango se estableció después de analizar 10 fotografías con distintos niveles de tonalidad, desde tenue a intensa (Figura 8.d y e).*
4. *Conteo de área y densidad óptica: Una vez que se configuró el rango de color a analizar, continuó el análisis de área y densidad óptica. Para ello, en el menú [Count/size] -> [Measure] -> [Select Measurements] se despliega una ventana con todas las características que el programa puede medir. Aquí se seleccionó "Área" y "Densidad óptica", para las cuales también se estableció un rango de medición. Al cerrarse la ventana de [Select Measurements], en la ventana [Count/size] se determinaron las opciones de color de la máscara, tipo y forma de conteo así como la manera en la que se muestran los resultados, en el botón "Options" Finalmente, después de regresar a la ventana [Count/size], se aplicó "Count" para que el programa realizara las mediciones (Figura 8.f, Figura 9.a y b).*

5. *Limited watershed: Esta herramienta permitió dividir el área medida en áreas de menor tamaño, aumentando así la sensibilidad de la medición. Para ello, en la ventana [Count/size], aplicamos [Edit] -> [Limited Watershed], con lo que el programa abre una ventana para indicar el número de píxeles en los que se dividirá el área contada. Al aplicar esta herramienta, toda el área medida se dividió en fracciones de menor tamaño, lo cual permitió que el análisis fuera mucho más exacto (Figura 9.c y d).*
6. *Obtención de resultados: Después de que el programa llevó a cabo los pasos anteriores, la misma ventana [Count/size] contiene en su parte superior la herramienta "View" la cual, al desplegarse, tiene la opción de mostrar los resultados calculados e incluso, los estadísticos de los mismos. Para este trabajo, se usaron únicamente los estadísticos entregados por el programa, con promedios, desviaciones estándar y sumas totales.*

Resultados

Se incluyeron en el estudio un total de 20 pacientes, entre los cuales se seleccionaron aleatoriamente a los que conformarían el grupo con tratamiento placebo y el grupo con tratamiento PFD. Sólo uno de los pacientes quedó excluido de los análisis debido a la falta de muestras, por lo cual sólo se consideraron 19 en el estudio. Entre ellos se tomaron 47 biopsias, algunos pacientes tuvieron replicados que incluían piel lesionada sin PFD (Tratamiento B o Placebo) y piel lesionada con PFD (Tratamiento A), dependiendo de la extensión de la quemadura. El estudio que se desarrolló fue doble ciego por lo que no se conocía qué muestras correspondían a cada tratamiento.

En la figura 8 se muestra una serie de fotografías de los cortes histológicos provenientes de distintos pacientes procesadas mediante inmunohistoquímica contra las distintas citocinas, en donde se aprecia una tinción diferencial para cada citocina.

En una primera intención estas imágenes fueron analizadas de manera subjetiva señalando únicamente si la intensidad de la tinción se modificó, ya sea disminuyendo, incrementando o bien si no hubo cambios entre la primera y segunda muestra de cada caso.

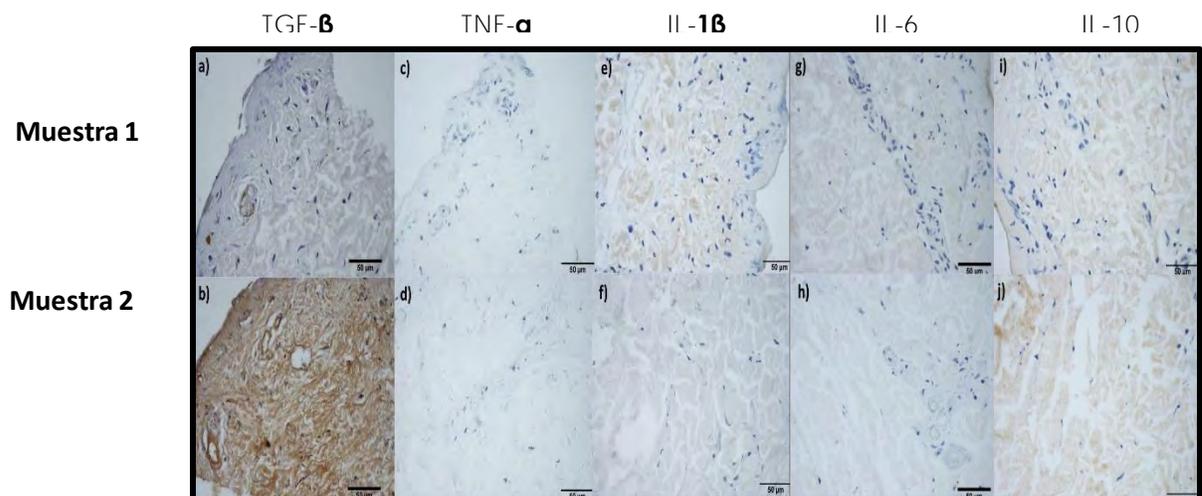


Figura 8. Fotomicrografías de cortes histológicos procesados por inmunohistoquímica contra las distintas citocinas. Se observan imágenes representativas de la expresión diferencial de cada citocina en dos biopsias distintas provenientes del mismo paciente. a) y b) **TGF-β**, c) y d) **TNF-α**, e) y f) **IL-1β**, g) y h) **IL-6**, i) y j) **IL-10**. Nótese que en términos de intensidad de la marca la expresión de las distintas citocinas es diferencial, siendo TGF-β (a y b), e IL-10, las que muestran una mayor variación entre las dos muestras.

Cuando evaluamos de manera individual cada uno de los casos, encontramos que en 13 casos, es decir el 56% de las muestras, no mostraron una mejoría en términos de la intensidad de la tinción para TGF- β y las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-6; es decir que en la segunda muestra de cada uno de los casos se observó un marcaje similar o incluso aumentado con respecto a la muestra inicial, mientras que el 44% de los casos mostró una reducción y por lo tanto, una mejoría en relación a la intensidad de la marca de IHQ en las citocinas pro inflamatorias. Cabe señalar que la expresión de TNF- α no mostró cambios evidentes en la intensidad de su marca, este análisis cualitativo se llevó a cabo durante la primera fase del estudio, sin tener conocimiento acerca de cuáles eran los casos de pacientes que conformaban cada grupo experimental, ya que hasta este momento el estudio permanecía como doble-ciego. En el análisis cualitativo, encontramos que aún cuando los cortes de biopsia provienen del mismo paciente, muchos de éstos muestran distinta expresión de la marca de IHQ, lo cual indica que la expresión de estas citocinas en dermis es diferencial y posiblemente sea resultado de las condiciones en las que se tomaron las biopsias.

Análisis morfométrico: Área y Densidad Óptica Integrada (DOI).

Con la finalidad de poder evaluar la expresión de las distintas citocinas en toda la superficie de las distintas lesiones, se tomaron numerosas microfotografías de distintos campos a un aumento de 400X seleccionados aleatoriamente, para cada biopsia de cada citocina evaluada. A cada una de las imágenes obtenidas se les analizó con el software de análisis digital **Image Pro Plus 7.0** como se menciona en la sección de métodos, obteniendo para cada campo la sumatoria del área ocupada por tejido con marca positiva (ÁREA) y el promedio de la intensidad de la marca en cada imagen (DENSIDAD ÓPTICA INTEGRADA).

En las figura 9 y 10 se ilustra el proceso de análisis digital, donde en primera instancia se calibra al software indicando que rango de color, intensidad y tamaño de espécimen debe considerar para el análisis. En la segunda parte del análisis digital se procede a realizar el conteo de las estructuras con marca positiva y se le aplican distintos filtros con la finalidad de eliminar del conteo aquellas estructuras que pudieran consistir en fondo o depósito inespecífico del cromógeno.

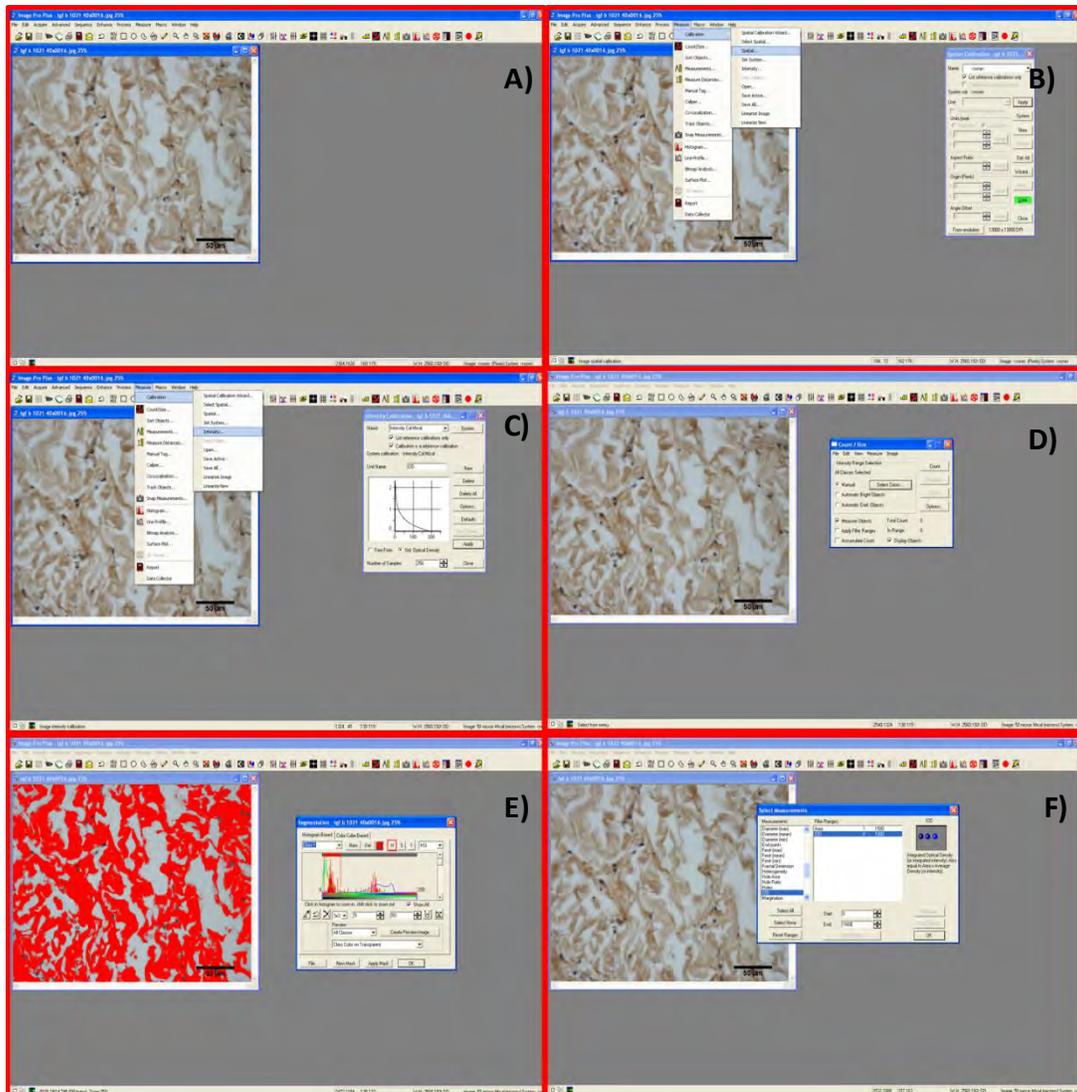


Figura 9. Macro grabado para realizar el análisis morfométrico en Image Pro Plus 7.0. A) Ventana de inicio. B) Calibración espacial. C) Calibración de intensidad. D) Menú "Count/Size". E) Segmentación. F) Seleccionar mediciones.

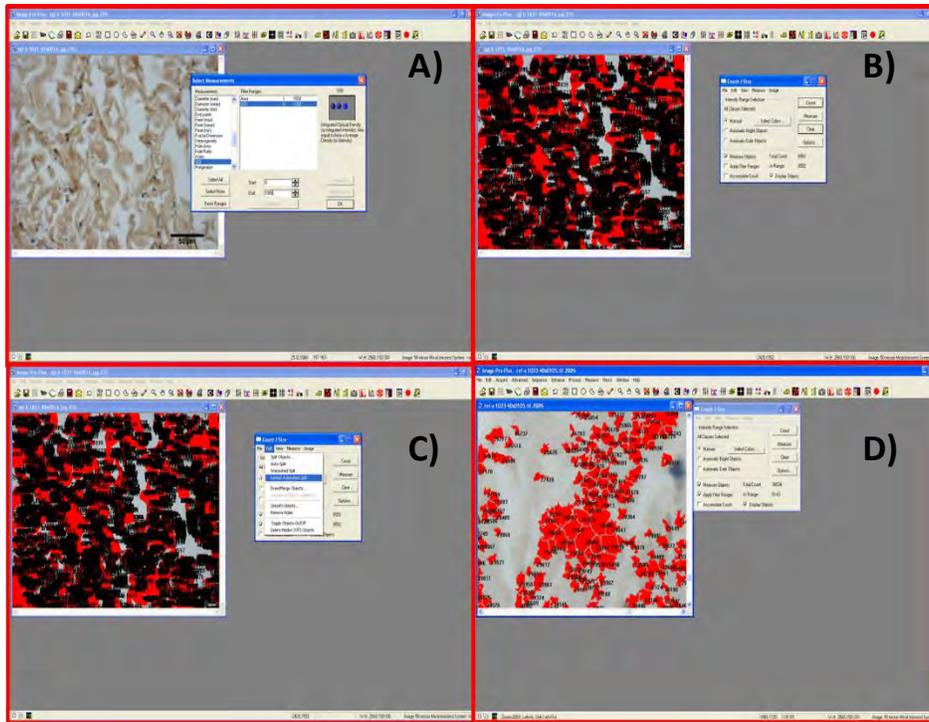


Figura 10. Programación ejecutada para realizar el análisis morfométrico en IMAGE PRO PLUS 7.0. Conteo de ÁREA y DOI y eliminación de fondo y depósito inespecífico de cromógeno. A) Selección de ÁREA y DOI B) Áreas y DOIs calculadas por el programa. C) Limited watershed. D) Objetos finales analizados.

Posteriormente, con la finalidad de poder hacer una comparación semicuantitativa de la intensidad de la expresión de estas citocinas entre la muestra inicial del tejido dañado y la muestra obtenida después de haber recibido alguno de los tratamientos, se utilizó el análisis digital *Image pro plus 7.0* (Media Cybernetics) de acuerdo al procedimiento mencionado previamente en la sección de métodos se analizaron las fotografías obtenidas de cada biopsia, en los parámetros de área marcada por campo en cada imagen y el promedio de densidad óptica integrada (DOI).

Cuando comparamos el patrón de tinción observado entre las dos muestras de los 23 casos, encontramos un comportamiento similar a lo observado en el análisis subjetivo, en donde 13 de los casos incluidos en el estudio, es decir, 56%, mostraron un perfil de “Progresión” mientras que al resto se le asignó el perfil “Inflamación”.

Debido a que para ninguna de la citocinas estudiadas en el presente trabajo se contó con un valor de referencia que nos permitiera correlacionar la DOI observada con la concentración de la expresión de cada citocina, se clasificaron 50 fotografías de manera subjetiva mediante apreciación en las que se notara un cambio evidente en la intensidad de la tinción, asignándoles valores de expresión de 0 a 100 de acuerdo a la siguiente escala, 0, 16.6, 33.3, 49.8, 66.4, 83.1 y 100, correspondiendo 0 a las fotografías negativas y 100 a las fotografías con mayor intensidad de la tinción, posteriormente se calculó el promedio de la DOI de las fotografías asignadas a cada rango de expresión y con ello se generó una curva, con la que posteriormente se obtuvo una correlación lineal entre la escala subjetiva de expresión y la DOI de las imágenes. Lo anterior sirvió para saber si de manera semicuantitativa el valor de la DOI se podía utilizar como parámetro de concentración de las distintas citocinas, como se aprecia en la (Fig. 11). La curva muestra una buena correlación, lo que nos permite utilizar dicho parámetro en nuestra evaluación.

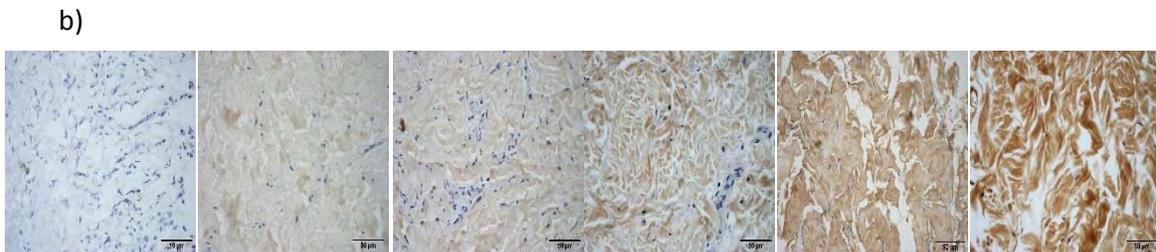
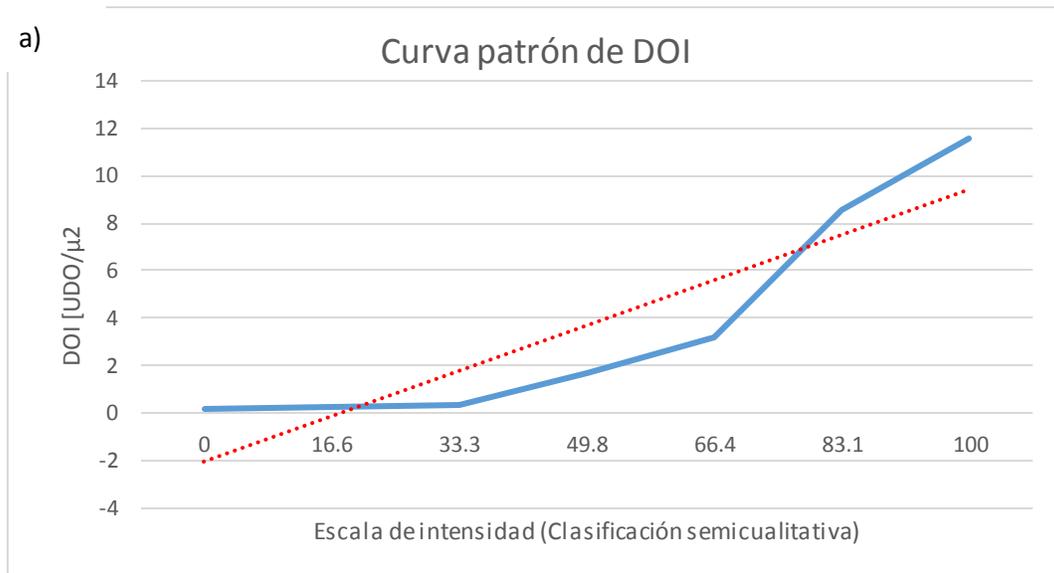


Figura 11. Curva patrón de evaluación subjetiva. A) Esta curva se realizó para convertir la evaluación subjetiva observacional en semicuantitativa, mediante la evaluación de la Densidad Óptica. B) Las fotografías empleadas para llevar a cabo la curva corresponden a las del presente estudio y para llevar a cabo la curva, éstas fueron clasificadas cualitativamente con los valores 0, 16.6, 33.3, 49.8, 66.4, 83.1 y 100 de acuerdo al grado de intensidad de la tinción con IHQ, respectivamente. En la imagen se muestran las fotografías más representativas de cada clasificación cualitativa.

Cuando realizamos una primera comparación cualitativa entre el estado inflamatorio de los pacientes, basándonos en los resultados del análisis morfométrico de las distintas imágenes de cada una de las biopsias para todas las citocinas, encontramos que las muestras se comportaban formando claramente dos patrones de tinción, el primer patrón consistió en una amplia cobertura de tejido con marca positiva al igual que una fuerte expresión y el segundo patrón consistió en una área positiva de dimensiones similares pero con una débil expresión, como se muestra en la figura 12.

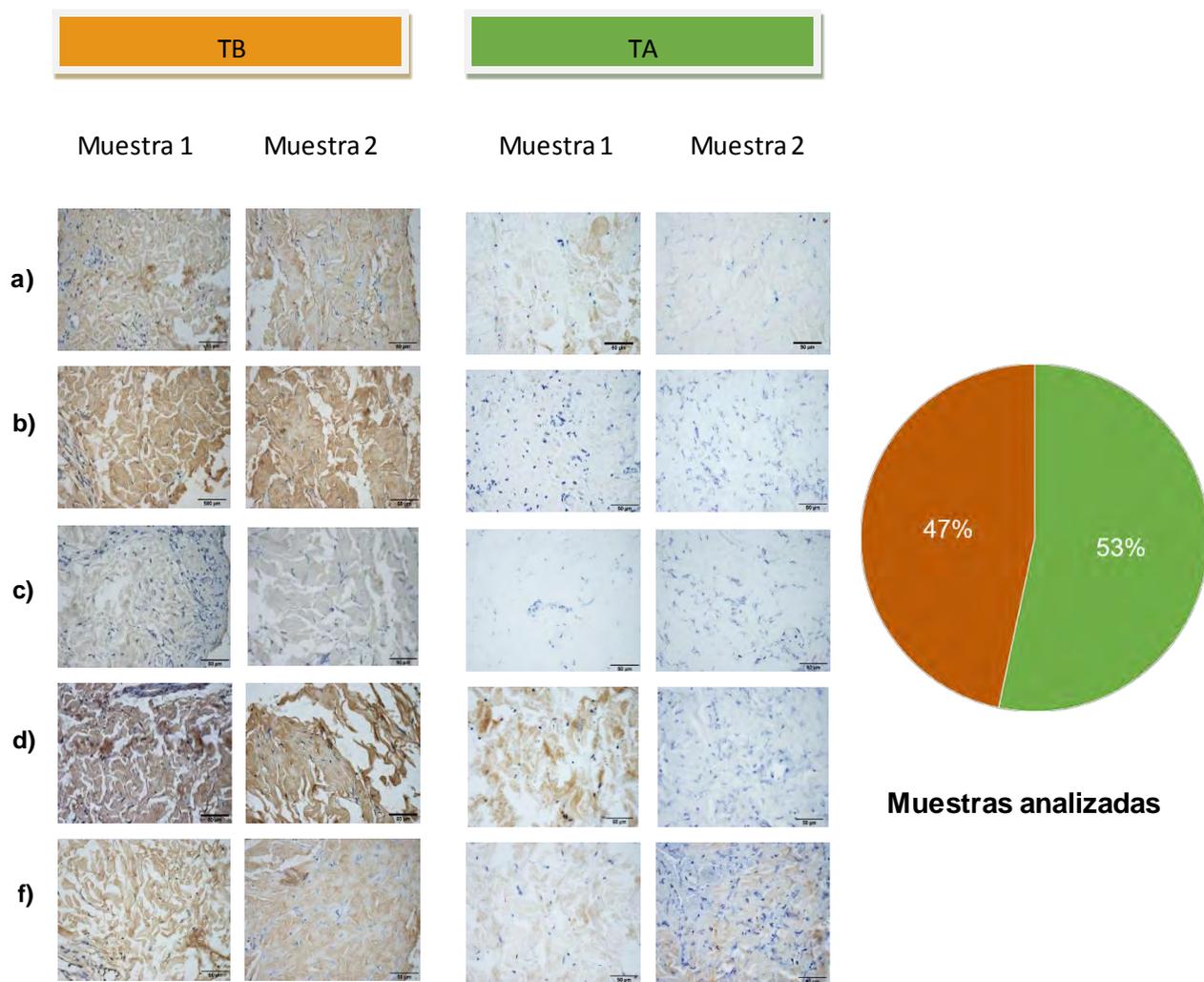


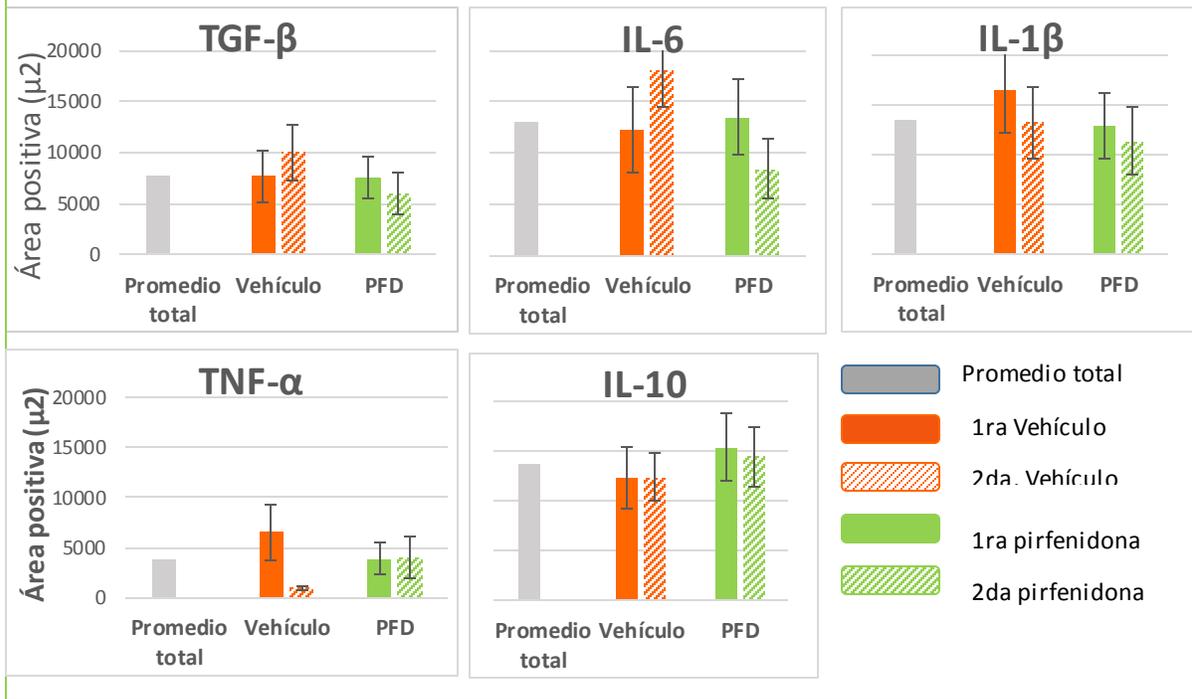
Figura 12. Comparación de los patrones de tinción. A) TGF-beta, b) IL-1beta, c) TNF-alfa, d) IL-6 y f) IL-10. La figura muestra las fotografías del perfil de citocinas de un paciente representativo de cada grupo antes (muestra 1) y después (muestra 2) de la aplicación del tratamiento. El grupo marcado con naranja no mostró cambios evidentes en la marca de cada citocina después de 96 horas posteriores a la primera aplicación del vehículo, manteniendo una marca intensa en todas las citocinas. Mientras tanto, el grupo señalado marcado con verde mostró una disminución de la marca en TGF- β e IL-6, mientras que TNF- α e IL-1 β se mantuvieron en niveles bajos e IL-10 aumentó la intensidad de su marca en la muestra 2, ello al cabo de 48 horas posteriores a la primera aplicación del tratamiento. Al analizarse todas las muestras, 53% mostró una mejoría en su perfil de citocinas, mientras que el 47% mantuvo su estado de inflamación.

Posteriormente, al destapar los casos de acuerdo a la clave previamente establecida, las muestras fueron analizadas agrupando a las muestras provenientes de pacientes que pertenecían a cada grupo experimental, el tratamiento A correspondió al grupo de pacientes que recibieron PFD y el Tratamiento B al grupo de pacientes que recibieron tratamiento con un placebo. Posteriormente se realizó la prueba estadística Mann-Whitney para comprobar si existían diferencias significativas entre los promedios de la suma de área marcada y el promedio de DOI, como podemos apreciar en la figura 12, las muestras provenientes de pacientes del grupo placebo mostraron una mayor expresión que las muestras provenientes del grupo experimental de PFD.

Cuando comparamos el patrón de expresión de las distintas citocinas entre los pacientes que recibieron el placebo y los que recibieron el tratamiento con PFD, estos últimos aparentemente tienen un patrón invertido a lo observado en el grupo control (Ver figura 12). Cabe señalar que en **Área marcada**: En el grupo de pacientes que presumiblemente recibió el tratamiento con placebo, se incrementa en la segunda muestra a excepción de **IL-1** y **TNF- α** , mientras que en el grupo que recibió PFD consistentemente el área marcada disminuye con en las citocinas **TGF- β** , **IL-1 β** e **IL-6**. Sin embargo, de acuerdo con el análisis estadístico, el cambio en ninguna de éstas es significativo. Por otra parte, en términos de la **DOI**: En el grupo de pacientes que recibió el tratamiento con placebo, únicamente disminuyó la expresión de **TNF- α** mientras que en el grupo de pacientes que recibió tratamiento con PFD, la expresión de **TGF- β** , **IL-1** e **IL-10** se encuentran disminuidas mostrando un comportamiento inverso a lo observado en el grupo control (ver figura 13). En este caso, la diferencia entre el promedio de las muestras de **TGF- β** sí fue significativa con la prueba Mann-Whitey ($P > 0.05$).

Aunque se observa un patrón de expresión distinto entre los grupos experimental y control, cabe señalar que aparentemente PFD no modula a **TNF- α** , además de que la expresión de esta citocina parece ser muy inferior a la de **IL-6** e **IL-1 β** . También es necesario resaltar que el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los distintos tratamientos para ninguna de las citocinas, con excepción de la IOD de **TGF- β** .

A) Promedio de Área de las muestras antes y después de la aplicación del tratamiento



B) Promedio de DOI de las muestras antes y después de la aplicación del tratamiento

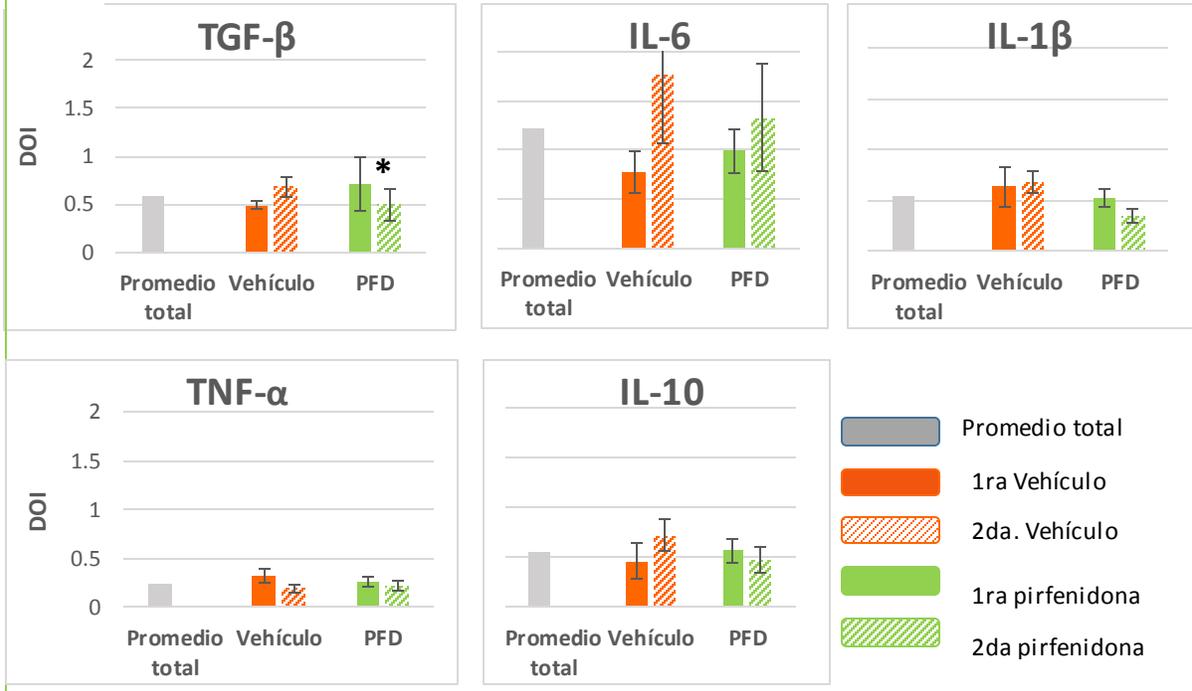


Figura 13. Gráficas comparativas entre los Tratamientos A (PFD) y B (vehículo) de cada citocina. A) Promedio de la suma de Área de la marca de IHQ para TGF-β, TNF-α, IL-1 β, IL-6, IL-10 prueba Mann-Whitney no mostró diferencias significativas entre las muestras 1 y 2 en ninguna de las citocinas. B). Promedio de DOI de la marca de IHQ para TGF-β, grupo TA mostró diferencias entre las muestras 1 y 2 (*P<0.05). Promedio de la suma de DOI de la marca de IHQ para TNF-α, IL-1 β, IL-6, IL-10, la prueba Mann-Whitney no mostró diferencias significativas entre las muestras 1 y 2 en ninguna de estas citocinas.

Dado que sólo TGF- β mostró una diferencia significativa entre el promedio de las muestras 1 y 2 y esperando observar mejores resultados, los pacientes fueron separados y clasificados, con sus respectivas muestras, en grupos, dependiendo el número de aplicaciones de pirfenidona recibido por cada uno. Ello debido a que, en al menos la mitad de los pacientes, se aplicaron únicamente dos dosis de pirfenidona, es decir; la segunda biopsia fue tomada al día siguiente de iniciado el tratamiento. En sólo un caso, la biopsia fue tomada después de 4 días de haber comenzado el tratamiento. Debido a estas diferencias en el tiempo del tratamiento y del número de aplicaciones, los pacientes se dividieron en seis grupos: TB 24h (pacientes que recibieron el placebo sólo durante 24 horas), TB tiempo 48h (pacientes que recibieron el placebo como se indica en el protocolo) TB 96h (pacientes que recibieron el placebo por 96 horas), TA 24h (pacientes que recibieron el tratamiento con pirfenidona sólo durante 24 horas), TA 48h (pacientes que recibieron pirfenidona como se indica en el protocolo) y TA 96h (pacientes que recibieron la pirfenidona por 96 horas) (ver gráfica 14).

El análisis estadístico de DOI de cada grupo TA y TB en cada citocina tampoco mostró diferencias significativas entre ninguna de las muestras 1 y 2. En la gráfica 14, puede observarse que las citocinas IL-6 e IL-10 presentaron una mayor DOI en relación con el resto, sin embargo no se encontró ninguna relación o comportamiento que fuera similar entre las citocinas proinflamatorias y los respectivos tratamientos, el TGF- β sin embargo, sí mostró una tendencia a la disminución en los grupos pertenecientes al tratamiento con pirfenidona, sin ser significativa.

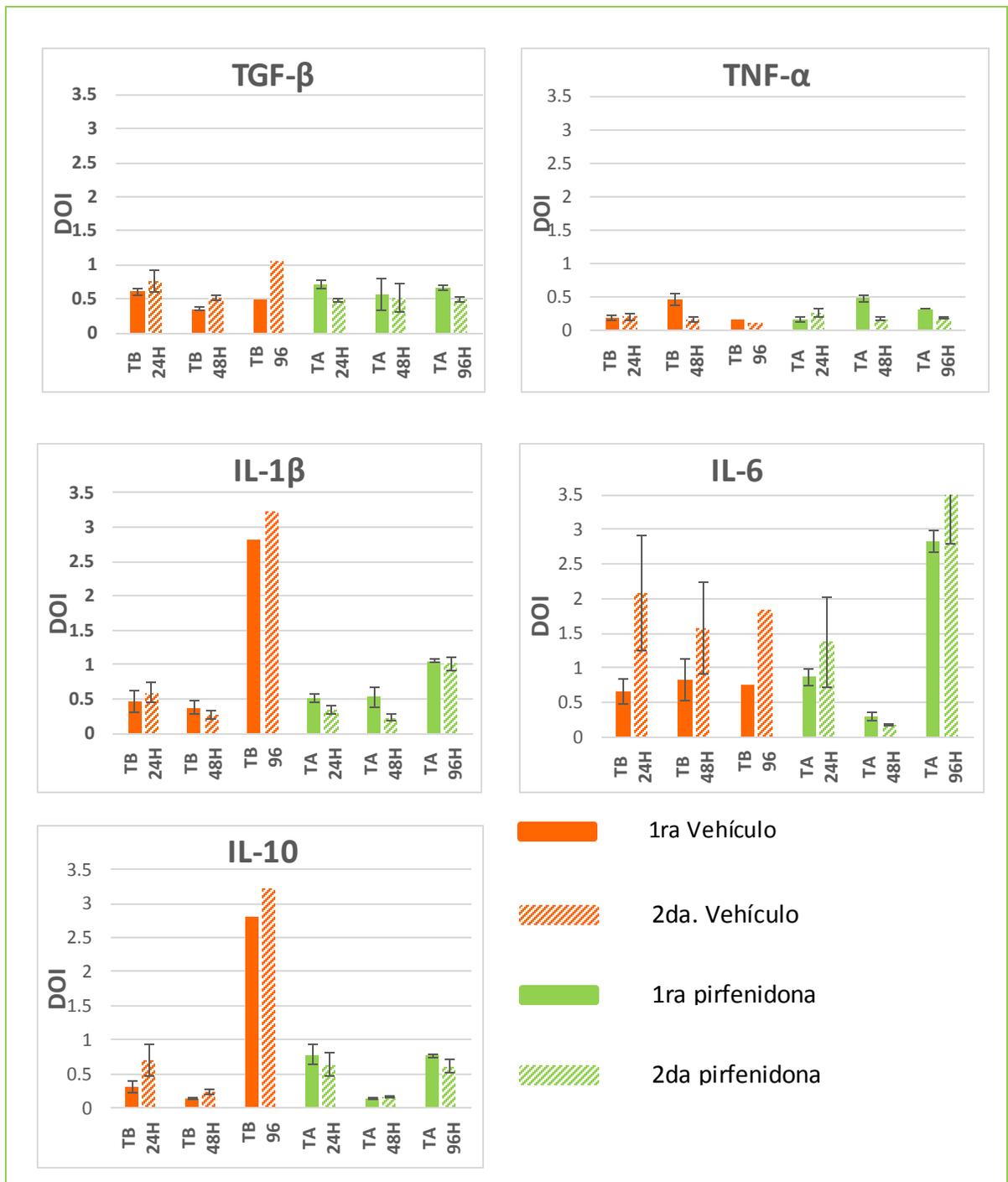


Figura 14. Gráficas comparativas de DOI de cada citocina, separada en grupos de acuerdo al tiempo de realización de las biopsias después de la aplicación del tratamiento. Los términos TA y TB corresponden al tratamiento con pirfenidona y al placebo, respectivamente; mientras que los grupos "24H", corresponden a los pacientes a quienes se les realizó la biopsia 24 horas después de iniciado el tratamiento, "48H" agrupa a los pacientes que recibieron de 4 a 6 aplicaciones de cualquiera de los dos tratamientos y los grupos "96H" son a aquellos pacientes que recibieron el tratamiento por más de 72. Ninguna de los grupos mostró diferencias entre las muestras 1 y 2 de ninguna citocina, de acuerdo con la prueba la prueba Mann-Whitney ($p > 0.05$). Cabe destacar que el grupo TB tiempo largo sólo contenía un par de muestras de un solo paciente, por lo que no se incluyó el error estándar en la gráfica.

El análisis estadístico de DOI de cada grupo TA y TB en cada citocina tampoco mostró diferencias significativas entre ninguna de las muestras 1 y 2. En la gráfica 14, puede observarse que las citocinas IL-6 e IL-10 presentaron una mayor DOI en relación con el resto, sin embargo no se encontró ninguna relación o comportamiento que fuera similar entre las citocinas proinflamatorias y los respectivos tratamientos, el TGF- β sin embargo, sí mostró una tendencia a la disminución en los grupos pertenecientes al tratamiento con pirfenidona, sin ser significativa.

Finalmente para evidenciar si la intensidad en la expresión de TGF-B como principal citocina disminuye consistentemente en los pacientes que recibieron PFD, se analizó de manera individual la DOI de esta citocina, y la de IL-10 como principal citocina antiinflamatoria. Como se puede observar en la figura 15, el 62% de los pacientes que recibieron el tratamiento con placebo, muestran un incremento significativo en la expresión de TGF- β , mientras que el 50% de los mismos mostraron un incremento de IL-10. En el grupo de pacientes que recibieron tratamiento con PFD, un 63% mostró una disminución significativa en la DOI de TGF- β y aun cuando el 37% restante no mostró diferencias significativas, la DOI de esos casos fue baja en comparación con el grupo placebo. De igual manera el 27% de ellos mostró un incremento significativo en la citocina IL-10, mientras que en la mayoría de los pacientes no se encontraron diferencias significativas. El 18% de los casos presentó una disminución en la DOI de IL-10 con el tratamiento PFD.

Expresión de TGF-β en dermis de lesiones por quemaduras de 2º Grado

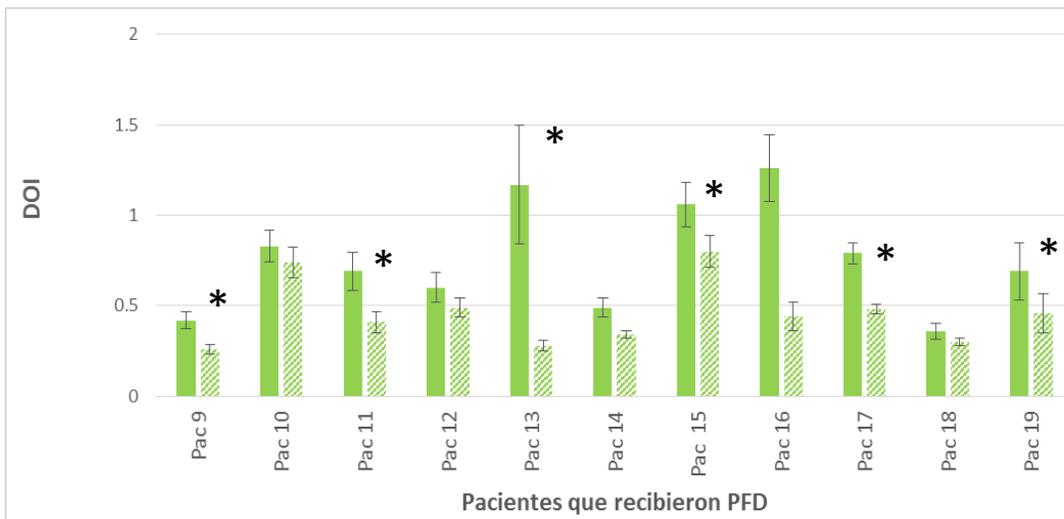
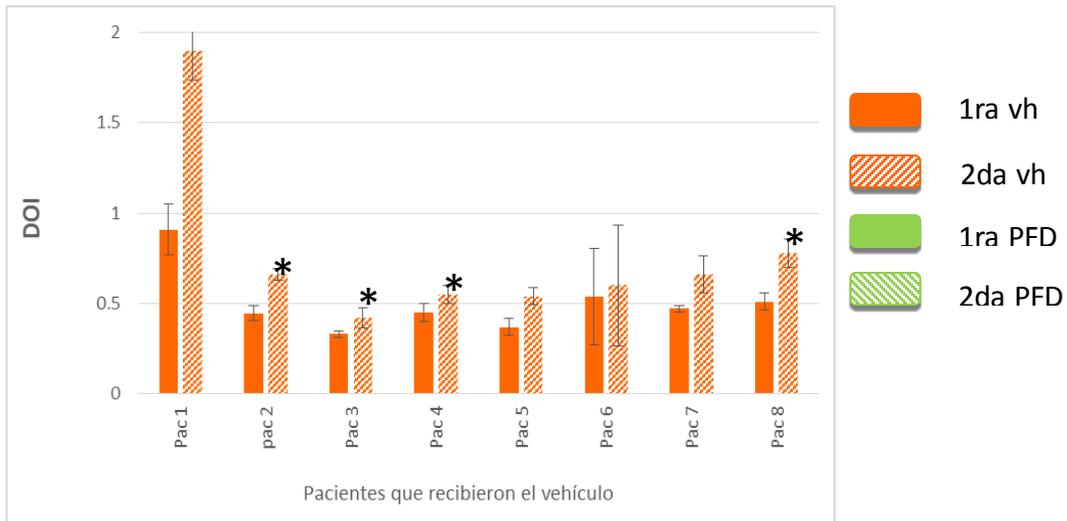


Figura 15. Comparación de la DOI en unidades de densidad óptica (UDO) de TGF-β, en cada paciente por grupo TA (pirfenidona) o TB (vehículo). Los pacientes pertenecientes al grupo con el tratamiento B mostraron un incremento en la DOI de TGF-β, mientras que ésta disminuyó en 60% de los pacientes del grupo TA, con pirfenidona (Prueba Mann-Whitney *P<0.05).

Expresión de IL-10 en dermis de lesiones por quemaduras de 2º Grado

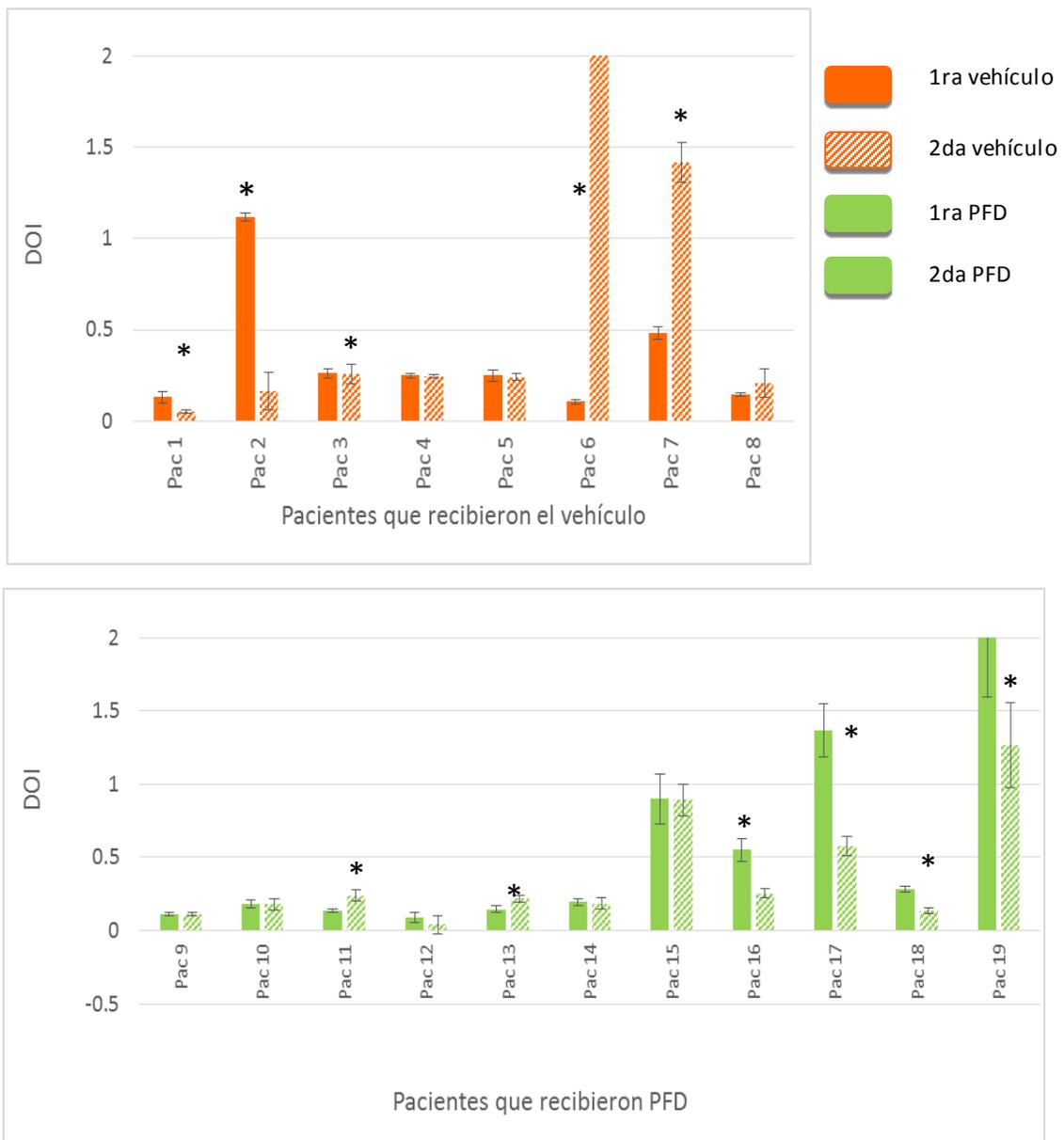


Figura 16. Comparación de la DOI en unidades de densidad óptica (UDO) de IL-10, en cada paciente por grupo TA (pirfenidona) o TB (vehículo) La mayoría de los pacientes del grupo con pirfenidona mostraron un incremento significativo en la DOI de IL-10, misma que disminuyó en la mayoría de los pacientes del grupo control TA, sin pirfenidona (Prueba Mann-Whitney * $P < 0.05$).

Discusión

En este estudio, se evaluó el efecto en la producción de citocinas proinflamatorias luego de la aplicación temprana de pirfenidona en quemaduras de segundo grado en pacientes pediátricos. Para ello, se tomaron biopsias de la piel con lesión en presencia o ausencia del fármaco.

Dichas biopsias fueron clasificadas mediante un análisis subjetivo y cualitativo de la expresión de las citocinas. Dado que se trató de un estudio doble ciego, dicho análisis brindó un amplio panorama de la situación de los distintos pacientes participantes del estudio, donde se observó que no todos los pacientes mostraban el mismo estado inflamatorio. Por otra parte, cuando se analizaron las muestras de manera cualitativa, se distinguieron dos grandes perfiles en términos de la secreción de citocinas; uno inflamatorio, caracterizado por una alta expresión de citocinas pro inflamatorias; y el otro perfil en progresión a una fase reparativa, con una marca menos intensa de la expresión de dichas citocinas. De acuerdo con este análisis subjetivo, prácticamente la mitad de los pacientes se clasificaron con un perfil inflamatorio. Después de realizar el análisis morfométrico los pacientes también fueron asignados a uno de los dos perfiles de acuerdo a los niveles de expresión de cada citocina y se observó que el porcentaje de casos en estado inflamatorio fue de 56% de los casos en progresión y un 44% en estado inflamatorio. Es decir, el análisis con el software brindó un análisis descriptivo más preciso del comportamiento de cada citocina en las distintas muestras. Sin embargo, al comparar a los pacientes dentro de los grupos correspondientes TA, con pirfenidona, y TB, con el vehículo, el análisis estadístico no encontró diferencias significativas entre la primera y segunda muestra, en ninguna citocina, con excepción del TGF- β .

De acuerdo a la literatura existente, se esperaba la modulación del proceso inflamatorio en respuesta a la PFD, sin embargo esto no se observó ya que este proceso no se modificó en ninguno de los pacientes tratados (ver Figura 13 y 14). Por otro lado, se esperaba encontrar el mismo patrón de comportamiento entre las citocinas pro inflamatorias TGF- β , TNF- α , IL-1 β e IL-6, puesto que de acuerdo con la bibliografía consultada (Iyer, S. *et al.*, 1999; Nakasato, H. *et al.*, 2002; Hirano, A. *et al.*, 2006; Grattendinck, K. *et al.*, 2008; Visner, G. *et al.* 2009), todas éstas que disparan la fase inflamatoria post-quemadura, son inhibidas por pirfenidona en las distintas poblaciones celulares de estudio evaluadas por cada autor, mientras que induce la expresión de IL-10. Sin embargo, el patrón esperado se observó únicamente en 3 de los 11 casos de progresión, en estos mismos casos la IL-6 incrementa su área de expresión mientras que IL-1 β y TNF- α , ésta última que mostró la menor

expresión en términos de área marcada, disminuyen. También es importante destacar que muchos de los trabajos citados aquí corresponden a estudios *in vitro*, por lo que, a pesar de los buenos resultados obtenidos con pirfenidona, en un modelo *in vivo* la acción de las citocinas depende también del microambiente inflamatorio y de la interacción entre las distintas poblaciones celulares, por lo que podríamos no ver un efecto real con pirfenidona debido a muchos diversos factores que actúen en conjunto propiciando el estado inflamatorio local.

En el caso específico de TNF- α , esta citocina se expresó débilmente en el tejido, lo que ha corroborado los estudios de Gauglitz y sus colaboradores (Gauglitz, G., *et al*, 2008), quienes estudiaron la fase inflamatoria postquemadura en un modelo murino y no encontraron cambios significativos en la expresión de TNF- α antes, durante y después de la fase inflamatoria. Finnerty y colaboradores (Finnerty, C *et al*, 2006) realizaron un estudio comparativo entre la expresión de citocinas de pacientes pediátricos con quemaduras y pacientes pediátricos con heridas de otra índole, no ocasionadas por el primer factor. En este estudio, ellos tampoco encontraron diferencias significativas entre los niveles de TNF- α en el suero de los pacientes quemados, con relación a los pacientes del grupo control que no presentaban quemaduras. Asimismo, en los estudios de Yeh sobre la expresión de las citocinas inflamatorias en suero, él y su equipo de investigación reportan una concentración de alrededor de 6 pg/ml de TNF- α en el suero de los pacientes fallecidos, que es la mayor concentración reportada en esta referencia y, que en comparación con los niveles de IL-6 reportados por el mismo equipo en un estudio independiente, es sumamente baja; ya que la concentración de IL-6 en suero alcanzó entre los 1000 y 1500 pg/ml en pacientes que no sobrevivieron al terminar el estudio. Ello nos habla del potencial de TNF- α como amplificadora de la respuesta inflamatoria, ya que las concentraciones mínimas no limitan su función. No obstante, nuestros resultados indican que pirfenidona parece no tener efecto sobre la expresión de esta citocina que no mostró ningún cambio significativo en los pacientes. De manera que, al actuar como inductor de la fase inflamatoria, TNF- α podría estar participando en dicha fase induciendo la producción de las citocinas IL-1 β e IL-6, mismas que tampoco mostraron ningún efecto con el tratamiento con pirfenidona. Sin embargo es necesario realizar un análisis más minucioso para conocer el efecto de esta citocina frente a la aplicación de pirfenidona, ya que varios autores han reportado que sí puede modular los efectos proinflamatorios de TNF- α (Bayhan, Z *et al*, 2016; Grattendick, K. *et al*. 2008, Hirano, A. *et al*, 2006; Cain, C., 1998), IL-6 e IL-1 β (Nakasato, H. 2002; Visner, G. 2009)

Con respecto a TGF- β , se esperaba que esta citocina actuara en conjunto con IL-1 β y TNF- β , ya que la primera es uno de los primeros participantes que desencadena la fase inflamatoria, induciendo la expresión de la segunda. Sin embargo, el comportamiento de ambas no mostró ningún patrón en específico. También es importante destacar la actividad de IL-10, ya que se expresó fuertemente tanto en casos inflamatorios como en casos de progresión. Sin embargo, se ha reportado que durante fases inflamatorias sostenidas, IL-10 también se expresa fuertemente en respuesta al ambiente pro inflamatorio (Csontos, et. al, 2010), por lo que su actividad en dichos casos es coherente con lo observado en estas muestras.

Para ninguna de las citocinas se encontraron diferencias significativas en el área de expresión de las mismas, en ninguno de los tratamientos, razón que quizá se deba al corto período entre la toma de las muestras 1 y 2, puesto que a pesar de que en el protocolo se estableció que la segunda muestra debía tomarse 48 horas después de la primera aplicación, al menos la mitad de ellas fueron tomadas apenas 24 horas después. Por ello, que se decidió separar a los pacientes en grupos y analizar la DOI en función del tiempo entre el inicio del tratamiento y la realización de la biopsia. Este análisis tampoco mostró diferencias significativas en ninguno de los casos, posiblemente debido a que el número de muestras de cada grupo fue muy reducido y no fue representativo para ninguno de los periodos. Además, de acuerdo con el área y la DOI de las muestras iniciales, el estado inflamatorio de cada paciente fue diferente, dicho estado es definido por la profundidad de la quemadura y el porcentaje de superficie corporal que abarca la lesión en el cuerpo, por lo que puede variar considerablemente entre cada paciente, dependiendo también del tiempo de evolución entre la quemadura y la primera aplicación del tratamiento. Los diferentes estados inflamatorios de cada paciente pueden ser un factor que también nos impida ver el comportamiento real con el tratamiento con pirfenidona. Por todo lo anterior, se decidió comparar únicamente TGF- β e IL-10, para contrastar los resultados obtenidos en DOI entre cada paciente perteneciente a los grupos TA y TB.

Los grupos TA (con PFD) y TB (con placebo) se compararon de acuerdo con la DOI de la marca de cada citocina en las muestras 1 y 2 de cada paciente (ver figura 15). Los resultados corroboraron lo obtenido previamente en la figura 13, donde la DOI de TGF- β entre la muestra 1 y 2 mostró una disminución que sí fue estadísticamente significativa con el tratamiento TA. En las gráficas de DOI por paciente, TGF- β mostró también una disminución de su expresión con pirfenidona en el 63% de

los pacientes. Con ello, se comprobó que en el grupo con PFD se redujo la expresión de TGF- β después de la aplicación del tratamiento, además de que se encontró un aumento en la expresión de IL-10 en un tercio de los casos.

La DOI fue el parámetro que pudo describir mejor la relación entre las citocinas TGF- β e IL-10, ya que en el grupo TA con PFD, TGF- β mostró consistentemente la mayoría de los pacientes una disminución en la intensidad de la expresión en la segunda muestra, mientras que en los pacientes asignados al grupo TB (placebo) mostraron ya sea un incremento o el mantenimiento de niveles similares en la segunda biopsia con respecto a la primera. Estos resultados son consistentes con lo esperado, ya que de acuerdo con la bibliografía consultada, pirfenidona actúa inhibiendo la expresión de TGF- β , además que ya se está probando como tratamiento contra la fibrosis pulmonar idiopática por inhibir los efectos provocados por la sobreproducción de este factor. Sin embargo, pirfenidona no en todos los casos indujo una mayor expresión de IL-10, por lo que es necesario verificar la actividad que tiene sobre esta citocina, ya que se ha reportado que es capaz de inducir su expresión (Nakasato, *et al*, 2002; Iyer, S. *et al*, 1999; Burghardt, E. *et al*, 2007; Burghardt, I., 2007.)

La aplicación temprana de PFD fue capaz de disminuir la expresión de TGF- β , no así con las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6, que pese a lo reportado en la literatura, en nuestro estudio no encontramos relación entre la aplicación de pirfenidona y alguna disminución de estas citocinas.

Dado las condiciones del estudio, seguir el comportamiento de las distintas citocinas luego de la aplicación de PFD podría no ser viable al tratarse de pacientes pediátricos con quemaduras de 2do grado; sin embargo, una buena manera de complementar los resultados obtenidos con las biopsias sería seguir la fase inflamatoria sistémica, es decir, con pruebas de sangre, a fin de corroborar los resultados que reflejan la dinámica de la fase inflamatoria local. Además, con el fin de tener un análisis más descriptivo, los pacientes podrían separarse en, al menos 3 grupos, dependiendo de la superficie corporal con quemadura; es decir, un grupo con al menos 10%, el segundo en un rango del 10 al 20% y el tercero en un rango del 20 al 30%; ello permitiría comparar mucho mejor la fase inflamatoria en cada grupo y los efectos de pirfenidona en cada uno de ellos.

Mientras tanto, los resultados de esta tesis representan el potencial de pirfenidona como antifibrótico, por lo cual puede aplicarse de manera temprana para prevenir los efectos de una fase inflamatoria exacerbada en quemaduras, como son los procesos de reparación fibróticos comunes después de una lesión de este tipo.

Conclusiones.

- ❖ Pirfenidona comprobó tener potencial como fármaco antifibrótico al aplicarse durante las primeras horas posteriores a la lesión, ya que disminuyó la expresión de TGF- β .
- ❖ Pirfenidona también aumentó la expresión de IL-10, sin embargo, necesario repetir el experimento para comprobar la actividad reportada sobre la relación pirfenidona/IL-10 y descartar el aumento de esta citocina en respuesta a la fase inflamatoria.
- ❖ En nuestro estudio, pirfenidona parece no tener ningún efecto antiinflamatorio sobre TNF- α , citocina que modula también la actividad de IL-1 β e IL-6.
- ❖ PFD podría probarse en un estudio prospectivo con el fin de comprobar sus efectos preventivos contra las consecuencias de una exagerada fase inflamatoria, como son los procesos que conllevan a la pérdida del tejido en la zona de éstasis y la cicatrización fibrótica.

Apéndice: Criterios de Selección (Pacientes con PFD y con control)

Inclusión

1. Pacientes con quemaduras de segundo grado de profundidad por escaldadura y con al menos 10% y con no más de 30 % de superficie corporal quemada evaluados mediante valoración clínica.
2. Registrados en los servicios de quemaduras del Hospital General Nicolás San Juan, del Instituto de Salud del estado de México y del Hospital Civil de Guadalajara Jalisco, Juan I. Menchaca.
3. Género masculino o femenino.
4. Pacientes en edad de 3 a 18 años.
5. Pacientes que no presenten a su ingreso lesión agregada y/o alteraciones neurológicas.
6. Pacientes que no presenten quemaduras en vías aéreas.
7. Con consentimiento informado por escrito del Padre o tutor del paciente.
8. Pacientes con quemaduras de segundo grado superficial y profundo.

No inclusión

1. Pacientes con Quemaduras de segundo grado de profundidad por escaldadura, menores al 10% de superficie corporal quemada.
2. Pacientes con Quemaduras de segundo grado de profundidad por escaldadura, mayores al 30% de superficie corporal quemada.
3. Pacientes con quemaduras superficiales (1er grado).
4. Pacientes con quemaduras de tercer grado.
5. Pacientes con quemaduras por electricidad.
6. Pacientes con hipersensibilidad conocida al PFD o a derivado del mismo.
7. Pacientes con infecciones que afecten el área de la quemadura.
8. Pacientes cuyo Padre o tutor se niegue a firmar el consentimiento informado

Eliminación.

1. Retiro del consentimiento informado.

2. Pacientes con efectos secundarios importantes al uso de PFD.
3. Pacientes que cursen con alteraciones metabólicas o infecciosas que a criterio del médico investigador, considere deban ser excluidos del estudio por necesidad de procedimientos quirúrgicos o de cuidados que puedan aumentar el proceso inflamatorio en el paciente. (Se excluirá del estudio pero se incluirá en el análisis).

Referencias

- Armendariz, J., Lyra, I., Medina, D., González, I., Martínez, D., Ariel, M., Magaña, R., Peña, P., García, S., Bautista, C., Godoy, J., Flores, J., Floresvillar, J., Armendariz, O., Lucano, M., Vazquez, M., Sanchez, M., (2012). A Controlled Clinical Trial With Pirfenidone in the Treatment of Pathological Skin Scarring Caused by Burns in Pediatric Patients. *Annals of Plastic Surgery*, 68(1), 22-28.
- Ávila, A., Amaya, M., Martínez, J. y Moreno, J. 2014. Panorama actual de las alternativas en el tratamiento de la cicatriz hipertrófica y queloide. *Dermatol Rev Mex*, 58:247-261
- Bayhan, Z., Zeren, S., Kocak, F., Kocak, C., Akcilar, R., Kargi, E., Tiryaki, C., Yaylak, F. y Akcilar, A. 2016. Antiadhesive and anti-inflammatory effects of pirfenidone in postoperative intra-abdominal adhesion in an experimental rat model. *Journal of surgical research* 201, 348-355
- Bloemen, M., van der Veer, W., Ulrich, M., van Zuijlen, P., Niessen, F., Middelkoop, E. (2009). Prevention and curative management of hypertrophic scar formation. *Burns*, 35, 463-475.
- Bombaro, K., Bombaro, K., Engrav, L., Carrouger, G., Wiechman, S., Faucher, L., Costa B., Heimbach, D., Rivara, F., Honari, S. (2003). What is the prevalence of hypertrophic scarrins following burns? *Burns*, 29, 299-302.
- Boyce, D., Ciampolini, J., Ruge, F., Murison, M., Harding, K. (2001). Inflammatory cell subpopulations in keloid scars. *British Journal of Plastic Surgery*, 54, 511-516.
- Brancato, S., Albina, J. (2011). Wound Macrophages as Key Regulators of Repair. Origin, Phenotype, and Function. *The American Journal of Pathology*, 178(1), 19-25.
- Branton, M. , Kopp, J. (1999). TGF- β and fibrosis. *Microbes and Infection*, 1349-1365.
- Broughton, G., Janis J., Attinger, C. (2006). The Basic Science of Wound Healing. *Plast. Reconstr. Surg.*, 117, 12-34.
- Burghardt, I., Tritschler, F., Opitz, C., Frank, B., Weller, M. y Wick, W. 2007. Pirfenidone inhibits TGF-b expression in malignant glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354, 542-54.
- Cain, C., Stuart, R., Lefkowitz, D., Starnesb, J., Margolinc, S. y Lefkowitz, S. 1998. Inhibition of tumor necrosis factor and subsequent endotoxin shock by pirfenidone. *International Journal of Immunopharmacology* 19, 574-584.
- Chin, D., Boyle, G., Parsons, P., Coman, W. (2004). What is transforming growth factor-beta (TGF-beta)? *The British Association of Plastic Surgeons*, 57, 215-221.

- Church, D., Elsayed, S., Reid, O., Winston, B., Lindsay, R. (2006). Burn wound infections. *Clinical Microbiology Rev.*, 19(2), 403.
- Conti, P., Kempuraj, D., Kandere, K., Di Gioacchino, M., Barbacane, R., Castellani M., Felaco, M., Boucher, W., Letourneau, R., Theoharides T.. (2003). IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunology Letters*, 86 , 123-129.
- Conte, E., Gili, E., Fagone, E., Fruciano, M., Iemmolo, M., Carlo Vancheri. 2014. Effect of pirfenidone on proliferation, TGF- β -induced myofibroblast differentiation and fibrogenic activity of primary human lung fibroblasts. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 58, pp 13–19.
- Coulthard, L., Coulthard, L., White, D., Jones, D., McDermott, M., Burchill, S. (2009). p38MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends Mol Med*, 15(8), 369–379.
- Darby, I. y Hewitson, T. (2007). Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *International review of cytology*, 257, 143-170.
- Csontos C, Foldi V, Palinkas L, Bogar L, Roth E, et al, . (2010) Time course of pro- and anti-inflammatory cytokine levels in patients with burns—prognostic value of interleukin-10. *Burns* 36: 483–494.
- Di Sario, A., Bendia, E., Macarri G., Candelaresi, C., Taffetani, S., Marzioni, M., Omenetti, A., De Minicis, S., Trozzi, L., Benedetti, A. (2004). The anti-fibrotic effect of pirfenidone in rat liver fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1 (I), TIMP-1 and MMP-2. *Digestive and liver disease*, 36, 744-751.
- Diegelmann, R., Evans M., (2004) Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, 9, 283-289.
- Duffield, J. (2003). The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clinical Science*, 104, 27-38.
- Eming, S., Krieg, T., Davidson, J. (2007). Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *Journal of investigative dermatology*, 127, 514-525.
- Enoch, S., Leaper, D. (2007). Basic science of wound healing. *Surgery*, 26(2).
- Evans, R., Tian, Y., Steadman, R., Phillips, A.(2003). TGF- β -mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation- the role of Smad proteins. *Experimental cell research*, 282, 90-100.
- Evers, L., L., Bhavsar, D., Mailänder, P. (2010). The Biology of burn injury. *Epidermal Dermatology*, 19, 777-783.

- Farina, J., Junqueira, M., Rosique, R. (2013). Curbing Inflammation in Burn Patients. *International Journal of Inflammation*, 1-10.
- Faunce, D., Llanasa, J., Patela, P., Gregory, M., Duffner, L., Kovacs, E. (1999). Neutrophil chemokine production in the skin following scald injury. *Burns*, 25, 403-410.
- Finnerty, C., Herndon, D., Przkora, R., Pereira, C., Oliveira, O., Queiroz, H., Rocha, R., Jeschke, M. (2006) Cytokine expression profile over time in severely burned pediatric patients. *SHOCK*, Vol. 26, No. 1, pp. 13- 19.
- Gauglitz, G., Song, J., Herndon, D., Finnerty, C., Boehning, D., Barral, J., Jeschke, M. (2008). Characterization of the inflammatory response during acute and post-acute phases after severe burn. *Shock*, 30:5, 30(5), 503-507.
- Giri, S., Wang, Q., Xie Y., Lango, J., Morin, J., Margolin, S., Buckpitt, A. (2002). Pharmacokinetics and metabolism of a novel antifibrotic drug pirfenidone, in mice following intravenous administration. *Biopharmaceutics and drug disposition*, 23, 203-211.
- Gragani, A., Warde, M., Furtado, F., Masako, L. (2010). Topical tamoxifen therapy in hypertrophic scars or keloids in burns. *Arch Dermatol Res*, 302, 1-4.
- Grattendick, K. J., Nakashima, J. M., Feng, L., Giri, S. N., Margolin, S. B. (2008) Effects of three anti-TNF- α drugs: Etanercept, infliximab and pirfenidone on release of TNF- α in medium and TNF- α associated with the cell in vitro. *International Immunopharmacology*, 679-687.
- Groux, H., Cottrez, F. (2003). The complex role of interleukin-10 in autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 281-285.
- Hirano, A., Kanehiro, A., Ono, K., Ito, W., Yoshida, A., Okada, C., Nakashima, H., Tanimoto, Y., Kataoka, M., Gelfand, E., Tanimoto, M. (2006). Pirfenidone modulates airway responsiveness, inflammation, and remodeling after repeated challenge. *Respir Cell Mol Biol.*, 35, 366-377.
- Infanger, M., Schmidta, O., Kossmehld, P., Gradb, S., Ertela, W., Grimmd, D. (2004). Vascular endothelial growth factor serum level is strongly enhanced after. *Burns*, 30, 305-311.
- Iyer, S., Gurujeyalakshmi, G., Giri, S. (1999). Effects of pirfenidone on transforming growth factor- β gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.*, 291(1).
- Jeschke, M., Mlca, R., Finnerty, C. (2007). Burn size determines the inflammatory and hypermetabolic response. *Critical Care*, R90, 1-11.

- Karp, G. (2010). Apoptosis (muerte celular programada). En G. Karp, *Biología celular y molecular* (págs. 642-646). México, D.F.: McGraw Hill.
- Koh T., DiPietro, L. (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*, 12(23), 1-12.
- Kubo, H., Hayashia, T., Agoa, K., Agoa, M., Kanekura, M., Ogata, M. (2014). Temporal expression of wound healing-related genes in skin burn injury. *Legal Medicine*, 13, 8-13.
- Li, B., Wang, J. (2011). Fibroblast and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement. *Journal of tissue viability*, 20, 108-120.
- Ma, Z., Pan, Y., Huang, W., Yang, Y., Wang, Z., Li, Q., Zhao, Y., Zhang, X., Shen, Z. (2013). Synthesis and biological evaluation of pirfenidone derivatives as antifibrotic agents. *Bioorganic and Medical chemistry letters*, 24, 220-223.
- Macías-Barragán, J., Sandoval, A., Navarro, J. (2010). The multifaceted role of pirfenidone and its novel targets. *Fibrogenesis and tissue repair*, 3(16).
- Maitoh, M., Hosokawaa, N., Kubota, H., Tanaka, T., Shiraned, H., Sawada, M., Nishimura, Y., Nagata, K. (2001). Upregulation of HPS47 and collagen type III in the dermal fibrotic disease, keloid. *Biochemical and biophysical research communications*, 280(5), 1316-1322.
- Masuyoshi, S., Yamazaki, M., Maeda, T., Matsumura, H. (2011) Pirfenidone suppresses keloid fibroblast-embedded collagen gel contraction. *Dermatol Res*, 304, 217-222.
- McAnulty, R. (2007). Fibroblast and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 666-671.
- Meszaros, A. Reichner, J., Albina, J. (2000). Macrophage-Induced Neutrophil Apoptosis. *J Immunol*, 165, 435-441.
- Nakasato, H., Oku, H., Yamane, S., Tsuruta, Y., Suzuki, R. (2002). A novel anti-fibrotic agent pirfenidone suppresses tumor necrosis factor- α at the translational level. *European Journal of Pharmacology*, 446, 177 – 185.
- Nakayama, S., Mukae, H., Sakamoto, N., Kakugawa, T., Yoshioka, S., Soda, H., Oku, H., Urata, Y., Kondo, T., Kubota, H., Nagata, K. & Kohno, S. (2007) Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF- β -stimulated human lung fibroblasts. *Life sciences*, 82, 210-217.
- World Health Organization (22 de Octubre de 2008). *World report on child injury prevention. Chapter 4. Burns*. Recuperado el 03 de Septiembre de 2014, de http://www.who.int/violence_injury_prevention/child/injury/world_report/Burns.pdf?ua=1

- Orozco, M., Miranda, R., Méndez, M., Celis, A. (2012). Tendencia de mortalidad or quemaduras en México, 1979-2009. *Gaceta Médica de México* (148), 349-357.
- Patel, P., Bailey, J., Yakuboffa, K. (2012). Treatment outcomes for keloid scar management in the pediatric burn population. *Burns*, 38, 767-771.
- Peral, M. G. (2013). Manejo de quemaduras faciales de segundo grado con Pirfenidona en pacientes del Hospital Pediátrico de Tacubaya/ tesis que para obtener el grado de Especialista en Medicina (Pediatria), presenta Mario Peral Rios ; asesor Luis Ramiro García López. Cd. de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, División de estudios de Posgrado e investigación.
- Ray, S., Ju, X., Sun, H., Finnerty, C., Herndon, D., Brasier, A. (2013). The IL-6 Trans-Signaling-STAT3 Pathway Mediates ECM and Cellular Proliferation in Fibroblasts from Hypertrophic Scar. *Journal of Investigative Dermatology* (2013), Volume 133, 133, 1212–1220.
- Rosenbloom, J., Jiménez, S. (2008). Molecular ablation of TGF- β signaling pathways by tyrosine kinase inhibition: The coming of a promising new era in the treatment of tissue fibrosis. *Arthritis Rheum*, 58(8), 2219–2224.
- Rubino, C., Bhavania, S., Ambrosea, P., Forresta, A, Loutit, J. (2009). Effect of food and antacids on the pharmacokinetics of pirfenidone in older healthy adults. . *Pulm Pharmacol Ther*, 279-285.
- Salgado M., Alcántara, L., Mendoza, A., Cerbón, M., Hidalgo, C., Mercadillo, P., Moreno, L., Álvarez, R., Krötzsch, E. (2012). Post-burn hypertrophic scars are characterized by high levels of IL-1 β mRNA and protein and TNF- α type I receptors. *Burns*, 38, 668-676.
- Salmeán, O. S. (2009). Tratamiento de las cicatrices hipertróficas y queloides utilizando pirfenidona / tesis que para obtener el grado de Especialista en Cirugía Plástica presenta Óscar Eduardo Salmeán Piña; asesor Silvia Espinoza Maceda. Cd. de México, México: UNAM, Facultad de Medicina, División de estudios de posgrado e Investigación.
- Salud, S. (2014). *Anuarios de morbilidad*. Recuperado el 2 de Septiembre de 2014, de <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>
- Sanjabi, S., Zenewicz, L., Kamanaka, M., Flavell, R. (2009). Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Current Opinion in Pharmacology*, 9, 447–453.

- Schwacha, M., Thobe, B., TanJanika, D., Hubbard, W. (2010). Impact of Thermal Injury on Wound Infiltration and the Dermal and dermal inflammatory response. *Journal of Surgical Research*, 158, 112-120.
- Shetlar, M., Shetlar, D., Blooma, R., Shetlara, C., Margolina, S. (1998). Involution of keloid implants in athymic mice treated with pirfenidone or with triamcinone. *J Lab Clin Med*, 491-496.
- Shi, J., Guan, H., Shi, S., Cai, W., Bai, X., Hu, X., Fang, X., Liu, J., Tao, K., Zhu, X. Tang, C., Hu, D. (2013). Protection against TGF-beta1-induced fibrosis effects of IL-10 on dermal fibroblasts and its potential therapeutics for the reduction of skin scarring. *Arch. Dermatology Res*, 305, 341-352.
- Shizuo, A., Taga, T., Kishimoto, T. (1993). Interleukin-6 in Biology and Medicine. *Advances in immunology*, 54, 1-78.
- Singer, A., Clark, R. (1999). Cutaneous wound healing. *The new England journal of medicine*, 341(10), 738-745.
- Smith P., Mosiello, G., Deluca, L., Ko, F., Maggi, S., Robson, M. (1999). TGF-beta2 activates proliferative scar fibroblasts. *Journal of surgical research*, 82, 319-323.
- Sun, G., Lin, X., Zhong, S., Yang, Y., Qiu, X., Ye, C., Wu, K., Yu, M. (2011). Pharmacokinetics of pirfenidone after topical administration in rabbit eye. *Molecular vision*, 17, 2191-2196.
- Tilg H., Dinarello, C., Mier, J. (1997). IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Inmunology today*, 18(9), 427-432.
- Tiwari, V. (2012). Burn wound: How it differs from other wounds? *Indian J Plast Surg*, 45(2), 364-373.
- Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E., Salfeld, J., Takd, P. (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanism of action: A comprehensive review. *Pharmacology and Therapeutics*, 117, 244-279.
- Tuan, T., Nichter, L. (1998). The molecular basis of keloid and hypertrophic scar formation. *Molecular medicine today*, 19-24.
- Tyler, M., Watts, A., Perry, M., Roberts, A., McGrouthera, D. (2000). Dermal cellular inflammation in burns. An insight into the function of dermal microvascular anatomy. *Burns*, 27, 433-438.
- van der Veer, W., Bloemenb, M., Ulricha, M, Molemac, P., van Zuijlenb, P., Middelkoop, E., Niessena, F. (2008). Potencial cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation. *Burns*, 35, 15-29.

- Villalobos, J. Á. (20 de Marzo de 2009). *Secretaría de Salud*. Recuperado el 31 de Agosto de 2014, de http://www.salud.gob.mx/unidades/dgcs/sala_noticias/discursos/2009_03_20-inaugurac.htm
- Visner, G., Liu, F., Bizargity, P., Liu, H., Liu, K., Yang, J., Wang, L. y Hancock, W. 2009. Pirfenidone Inhibits T Cell Activation, Proliferation, Cytokine and Chemokine Production, and Host Alloresponses. *Transplantation* 88(3): 330–338
- Wang, J., Jiao, H., Stewart, T., Shankowsky, H., Scott, P., Tredget, E. (2007). Increased TGF-beta-producing CD4+ T lymphocytes in postburn patients and their potential interaction with dermal fibroblasts in hypertrophic scarring. *Wound and repair regeneration*, 15, 530-539.
- Wang, X., Han, G., Owens, P., Siddiqui, Y., Li, A. (2006). Role of TGFb-Mediated Inflammation in Cutaneous Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 11, 112–117.
- Wolff, K., K., G. L. (2009). *Dermatología en medicina general, Tomo 1.. (7a ed., Vol. I)*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Wolfram, D., Tzankov, A., Pülzl, P., Piza-Katzer, H. (2009). Hypertrophic Scars and Keloids FA Review of Their Pathophysiology, Risk Factors, and Therapeutic Management. *Dermatol Surg* 2009, 35, 171–181.
- Xue, H., McCauley, R., Zhang, W. (2000). Elevated Interleukin-6 expression in keloid fibroblasts. *Journal of surgical research*, 89, 74-77.
- Yang, L., Scott, P., Giuffre, J., Shankowsky, H., Ghahary, A., Tredget, E. (2002). Peripheral Blood Fibrocytes from Burn Patients: Identification and Quantification of Fibrocytes in Adherent Cells Cultured from Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Laboratory Investigation*, 82(9), 1183-1192.
- Yeh, F., Lin, W., Shen, H., Fang, R. (1997). Changes in serum tumour necrosis factor- α in burned patients. *Burns*, 23(1), 6-10.
- Yeh, F., Lin, W., Shen, H., Fang, R. (1999). Changes in circulating levels of interleukin 6 in burned patients. *Burns*, 25, 131-136.
- Yeh, F., Lin, W., Shen, H. (2000). Changes in circulating levels of an anti-inflammatory cytokine interleukin 10 in burned patients. *Burns* 26, 26, 454-459.
- Yeh, F., Shen, H., Fang, R. (2002). Deficient transforming growth factor and interleukin-10 responses contribute to the septic death of burned patients. *Burns*, 28, 631-637.

