

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Efecto anti-inflamatorio del factor inhibidor de la locomoción de los monocitos (FILM) en la inflamación producida en lesiones controladas postraumáticas en ratas Wistar.

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ALMA KARINA LÓPEZ RUIZ

Dra. Sara Rojas Dotor
Directora

Dr. Alberto Monroy García
Asesor

2008



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.

Este trabajo se realizó en:

**La unidad de Investigación Médica en Inmunología,
Hospital de Pediatría, CMN S-XXI IMSS.**

**Financiamiento: FOFOI No 2006/1A/1/086
CONACYT No 089657**

**En colaboración con El Instituto Nacional de
Rehabilitación. Laboratorio de Biomecánica SS.**

DEDICATORIA

A mi abuela **ANA MARÍA ESPARZA MANJARES** por haber superado los retos que se le presentaron, TE AMO.

A mi abuela **GLORIA RUIZ PALLARES** por habernos apoyado en los momentos más difíciles. MIL GRACIAS

A **MIS PADRES** a quienes admiro por su gran capacidad y por sus logros en la vida.

A **TODA MI FAMILIA** por quererme tanto y reconfortarme cuando lo necesito.

A **MIS AMIGOS** por haberme apoyado en todo momento, quienes siempre tienen metas muy altas y contagian esa energía de hacer todo lo mejor que se pueda.

A todos aquellos que hicieron posible obtener una tesis de calidad.

A la gente que se esfuerza cada día por ser mejor.

A todos los que realizan su trabajo para mejorar la calidad de vida en nuestro país.

A los que no trabajarán ni un solo día porque aman su trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Muy especialmente porque su ayuda fue *esencial* al:

Dr. Raúl Silva García por haberme orientado en todo lo concerniente a todas las técnicas de Biología Molecular. Así como a la redacción de esta Tesis.

Dra. Guadalupe Rico por todas sus observaciones para que esta Tesis fuera de calidad.

Dr. Victor Manuel Domínguez Hernández y Dr. Victor Araujo por su apoyo en la producción de fracturas y contusiones.

INDICE

Dedicatoria

Agradecimientos

Abreviaturas

Resumen

1. Introducción

1.1. inflamación 1

1.2. Citocinas 4

1.2.1. Propiedades de las citocinas 5

Interleucina 10 (IL-10) 5

Interleucina 6 (IL-6) 6

Interleucina 12 (IL-12) 7

Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) 8

Interferón gama(IFN- γ) 9

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) 10

1.3. Anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) 11

1.3.1. Clasificación de los AINES 12

1.3.2. Derivados del ácido enólico (oxicams) 13

Antecedentes

1.4. Amibiasis 14

1.5. Factor inhibidor de la locomoción de los
monocitos (FILM) 14

2. Fundamento teórico 20

3. Planteamiento del Problema 20

4. Objetivos 21

4.1. General 21

4.2. Particulares 21

5. Hipótesis 22

6. Diseño de la investigación	23
6.1. Población	23
6.2. Criterios	23
7. Material y Métodos	24
7.1. Modelo de fractura y contusión	24
Producción de la lesión (figuras)	25
7.2. Obtención de las muestras biológicas	26
7.3. Obtención de RNA total (RNA _T) del tejido lesionado (fractura o contusión)	26
7.4. Cuantificación y verificación de la integridad del RNA _T	27
7.5. Síntesis de DNA complementario (cDNA)	28
7.6. Amplificación por PCR convencional de los genes IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β e IFN- γ Se utilizó como gen constitutivo la Hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT)	29
7.7. PCR Tiempo real	30
8. Diagrama de trabajo	32
9. Resultados	33
9.1. Obtención de RNA total	33
9.2. PCR convencional	34
9.3. PCR Tiempo Real	37
10. Discusión	51
11. Conclusiones	56
12. Glosario	57
13. Bibliografía	62
Perspectivas	72

Resumen

E. histolytica produce un pentapéptido termoestable Met-Gln-Cys-Asn-Ser, con un peso molecular de 581 Da, que *in vitro* inhibe la locomoción de los fagocitos mononucleares (de ahí el nombre asignado originalmente: Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos humanos (FILM)).

Este factor anti-inflamatorio aislado y descrito en nuestro laboratorio posiblemente proviene de un péptido mayor o una proteína que se fragmenta por la acción de una proteasa tipo tripsina / serina. El FILM también cancela la explosión respiratoria medida por quimioluminiscencia (ROI: H_2O_2 , O_2^- , OH^\bullet), y la producción de óxido nítrico (RNI: NO) en monocitos y neutrófilos humanos, todo ello sin afectar la viabilidad celular. Los eosinófilos no son afectados por el FILM.

El FILM *in vivo* retrasa el arribo de leucocitos mononucleares en cámaras de Rebeck en la piel humana; en cobayos y gerbos, inhibe la hipersensibilidad retardada cutánea por contacto al 1-cloro-2,4 dinitrobenzenu (DNCB) y abate la expresión de moléculas de adhesión VLA-4 en monocitos y VCAM-1 en el endotelio vascular.

Es posible que *E. histolytica* utilice este factor anti-inflamatorio en su beneficio, inhibiendo la fase tardía de la inflamación. Este factor podría contribuir a la escasa inflamación tardía que se observa en la amibiasis invasora (hígado, piel), y quizás por ello es seguida de una perfecta regeneración, sin cicatrización de los órganos afectados.

Tantos efectos del FILM sobre una cantidad enorme de células llevó a considerar una acción sobre la red de citocinas (pro-inflamatorias y anti-inflamatorias), como uno de los principales mecanismos de acción. Por lo que se midió la expresión de IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β , e IFN- γ en el proceso inflamatorio que ocurre después de un traumatismo agudo controlado (contusión y/o fractura) en las tibias derechas de ratas Wistar, seguido de la aplicación

intramuscular de Tenoxicam (3 mg/Kg/día IM) o de FILM (0.1 mg/ Kg/día IM) sacrificándose a los animales a 24 y 48 horas para realizar después un corte del músculo en el área lesionada.

Encontrándose que el tratamiento con FILM que se administró para tratar la inflamación que se produjo después de una contusión proporcionó el perfil de citocinas esperado (aumento en la expresión de IL-6, IL-10, e IL-12 y disminución de la expresión de IFN- γ , TNF- α , y TGF- β) y en la inflamación tratada con FILM después de una fractura se obtuvo aumento en la expresión de IL-6, IL-12 y TNF- α y disminución en la expresión de IFN- γ , TGF- β , e IL-10.

El FILM comparado con el tenoxicam en el modelo de contusión aumenta la expresión de IL-10 principal citocina anti-inflamatoria; y en el modelo de fractura se comportan de manera similar.

Concluyendo que FILM aumenta la expresión de las citocinas anti-inflamatorias y disminuye la expresión de las pro-inflamatorias.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. INFLAMACIÓN

La inflamación es una reacción vascular y celular inespecífica fundamental en una respuesta protectora del organismo, cuya función es proteger al organismo de la causa inicial del daño (organismos, toxinas, lesiones, etc.) y de las consecuencias de los mismos (células y tejido necrótico). Este proceso está en relación estrecha con la reparación del tejido, que en caso de ser una reparación por fibrosis, puede conducir a cicatrización anormal que limita la función o movilidad de los órganos afectados (1).

En la respuesta inflamatoria participan el plasma, las células circulantes (neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y plaquetas), las células del tejido conectivo (cebadas, fibroblastos, macrófagos y linfocitos), los vasos sanguíneos y los componentes extracelulares. La respuesta inflamatoria se divide en fase aguda y fase crónica. La fase crónica es de duración larga e histológicamente se asocia con la presencia de linfocitos, células plasmáticas, proliferación de vasos sanguíneos y con la destrucción del tejido. La fase aguda por el contrario es de duración corta (minutos, horas o pocos días) y sus características principales son: exudado, proteínas plasmáticas y migración de leucocitos (predominantemente neutrófilos).

Existen tres efectos principales en la fase aguda: 1) alteración del calibre vascular que conduce a un incremento en el flujo sanguíneo; 2) cambios estructurales en la microvasculatura que permiten a las proteínas plasmáticas y leucocitos salir de la circulación y 3) la migración de los leucocitos al foco del daño, determinadas por la unión de moléculas de adhesión y por mediadores químicos (2,3).

Una vez extravasados, los leucocitos migran hacia el sitio del daño; gracias a la quimiotaxis los neutrófilos son los primeros leucocitos que encontramos en los tejidos lesionados, producen citocinas pro-inflamatorias que activan a los fibroblastos y queratinocitos locales y se comportan

como unidades defensivas, después de fagocitar tejidos dañados y bacterias, mueren y son eliminados por los macrófagos (1).

La fagocitosis y la liberación de enzimas por los neutrófilos y macrófagos/monocitos (considerados como fagocitos profesionales) constituyen dos de los principales beneficios derivados de la acumulación de leucocitos al foco inflamatorio (4).

Los monocitos son atraídos hacia el tejido dañado mediante diferentes factores como fibronectina, colágena, elastina, trombina y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), iniciando su migración en la inflamación aguda y a las 48h constituyen el tipo celular predominante. Una vez en el espacio extravascular, se adhieren a la matriz extracelular gracias a los receptores de las integrinas y por la expresión del factor estimulante de colonias-1 (CSF-1) se diferencian a macrófagos, incrementando su tamaño celular, sus enzimas lisosomales, su metabolismo general, por lo que adquieren una mayor capacidad para fagocitar bacterias residuos de tejido necrótico y destruir microbios ingeridos. Las señales de activación incluyen citocinas secretadas por linfocitos T sensibilizados, por ejemplo, interferón gamma (IFN- γ), endotoxinas bacterianas y otros mediadores químicos. Después de su activación, los macrófagos secretan una amplia variedad de productos biológicamente activos que son mediadores de destrucción tisular, proliferación vascular y fibrosis (5).

Los macrófagos constituyen una de las principales fuentes de citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), la interleucina 1 (IL-1), el TGF α/β y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) entre otras.

Estas citocinas están implicadas en la cicatrización y favorecen la proliferación de fibroblastos, la síntesis de colágena y la persistencia de los macrófagos la cual se debe a estímulos quimiotácticos, incluyendo el C5a, y quimiocinas (producidas por macrófagos y linfocitos activos) (6).

Las células que desencadenan la respuesta inflamatoria, en las primeras 48h, son los neutrófilos, que son sustituidos por los macrófagos que permanecen entre el quinto y séptimo día, posteriormente arriban los fibroblastos para originar la cicatrización de la herida.

La inflamación es regulada por una variedad de factores solubles, los cuales se pueden clasificar dentro de cuatro grupos principales: 1) metabolitos inflamatorios lipídicos como el factor activador de plaquetas (PAF) y los numerosos derivados del ácido araquidónico (prostaglandinas, leucotrienos), los cuales son generados por fosfolípidos celulares; 2) tres cascadas de substratos/proteasa solubles (cascada de coagulación, sistema del complemento y cianinas), los cuales generan numerosos péptidos pro-inflamatorios; 3) óxido nítrico (ON), un potente vasodilatador endógeno y 4) un grupo de polipéptidos derivados de células, conocidos como citocinas, los cuales en gran parte orquestan la respuesta inflamatoria, por ejemplo, ellos son los principales determinantes de la integración del infiltrado celular, del estado de activación celular y de respuestas sistémicas a la inflamación. Muchas citocinas son multifuncionales. Son moléculas pleiotrópicas que muestran sus efectos de forma local o sistémica de manera autocrina o paracrina. Las citocinas se encuentran involucradas dentro de extensos sistemas que involucran interacciones sinérgicas así como antagónicas y exhiben efectos reguladores tanto negativos como positivos en varias células blanco (7).

Aunque una variedad de células pueden liberar citocinas, los principales productores son las células T cooperadoras (T_H) y los macrófagos. Las citocinas liberadas a partir de estos dos tipos celulares activan una red completa de células interactivas (8).

Las citocinas que participan en la inmunidad natural o en mecanismos de daño tisular, conducen a las células efectoras de la inflamación a reaccionar de forma inespecífica en respuesta hacia un antígeno, con participación mínima o nula de anticuerpos específicos. Las células T que producen este tipo de respuestas, se conocen como células T del tipo Th1 o pro-inflamatorias y se distinguen de las tipo Th2 o anti-inflamatorias, porque estas últimas producen primordialmente las citocinas que regulan la inflamación con especificidad inmunológica. En el

caso de una respuesta inmunológica se activan ambos tipos de células pero tiende a existir predominio de una de las dos formas de respuesta, ya que los dos tipos celulares producen citocinas que pueden inhibirse mutuamente (9,10).

1.2. CITOCINAS

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular (generalmente <20,000 kDa) que son producidas por los leucocitos y otros tipos celulares. Las citocinas se caracterizan por el pleiotropismo, o la habilidad de actuar sobre diferentes tipos celulares; redundancia, muchas citocinas son capaces de realizar la misma función; y pueden inducirse unas a otras, lo cual lleva a producir cascadas de citocinas. La producción de citocinas ocurre en pequeños estallidos durante las fases efectoras de la respuesta inflamatoria o inmune y está íntimamente regulada, debido al potencial de destrucción tisular mediado por citocinas (11).

El papel prominente de algunas citocinas, por ejemplo, en la inflamación, en la inmunidad y en la respuesta del huésped contra agentes infecciosos, indica que las redes de citocinas sirven de manera rápida y eficiente para la movilización de las respuestas del huésped cuando se necesita. Al mismo tiempo, estas redes de citocinas necesitan ser reguladas, y por lo tanto, la red de citocinas anti-inflamatorias se activa para prevenir daño al tejido y efectos sistémicos, los cuales están asociados con altos niveles de citocinas pro-inflamatorias (12).

1.2.1 PROPIEDADES DE LAS CITOCINAS

Para conocer más de las citocinas analizadas en este trabajo, describiremos algunas de sus características:

Interleucina 10 (IL-10)

La IL-10 es una importante citocina anti-inflamatoria y es una de las más potentes. Esta citocina es una proteína de 35 kDa, producida por la subpoblación Th2 de las células CD-4, células B, monocitos, keratinocitos, y células del epitelio bronquial. La IL-10 inhibe la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, la síntesis de óxido nítrico (ON) de los macrófagos y la translocación del factor nuclear- κ B (NF- κ B) después de la estimulación con lipopolisacáridos lo cual causa desregulación de receptores de TNF- α (13). La IL-10 suprime la producción de la IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α), sobrerregula la activación de células T expresadas y secretadas (RANTES), factor inhibidor de leucemia (LIF) y sobre ella misma. La IL-10 también inhibe la síntesis de gelatinasa y colagenasa (14). Además se puede detectar en las primeras 48 h y entre tres a cinco días, se encuentra en el 46% de las sepsis que no llegan a shock y en el 81% de los pacientes en shock séptico (15).

Interleucina 6 (IL-6)

La IL-6 es una citocina de 21-kDa producida por una variedad de células que incluyen fibroblastos, células endoteliales, fagocitos mononucleares, neutrófilos, hepatocitos, linfocitos B y T. El receptor de IL-6 está compuesto de dos cadenas, una cadena alfa (gp80; CD26) específico para IL-6 y una cadena beta (gp130) compartida con otros miembros de la familia de IL-6, que incluyen a IL-11, oncostatina M, LIF, el factor neutrófico ciliar y la cardiotropina (16).

IL-6 puede ser inducida por TNF- α e IL-1. Estimula el crecimiento de células T activadas, además, conjuntamente con IL-10 e IL-1, constituyen potentes inhibidores de la producción de TNF- α por las células mononucleares periféricas (17). Al ser una citocina dual, pero con efectos anti-inflamatorios sus niveles estarán incrementados en un estado de respuesta compensadora anti-inflamatoria (18).

La producción de IL-6 por varios tipos de células se relaciona con diversas funciones como la respuesta inmune, la producción hepática de reactantes de fase aguda, mediación de la fiebre y proliferación de progenitores hematopoiéticos (19).

Xing y colaboradores utilizando un ratón knockout para IL-6, (20) identificaron un componente anti-inflamatorio en relación a la acción de IL-6 en respuestas inflamatorias agudas (local y sistémica) provocadas por exposición del pulmón a toxinas de manera local o sistémica. Demostrarán que IL-6 es relevante en el control de la extensión de las respuestas inflamatorias agudas (locales y sistémicas), particularmente del nivel de citocinas pro-inflamatorias en compartimentos locales y sistémicos.

En general, en un huésped normal, IL-6 suprime el nivel de citocinas pro-inflamatorias sin comprometer el nivel de las citocinas anti-inflamatorias (20,21). Los niveles normales de IL-6 alcanzan un pico máximo entre 24 y 48 h, después de una lesión (22).

Interleucina 12 (IL-12)

IL-12, previamente conocida como factor estimulante de células asesinas naturales (NKSF) y factor de maduración de linfocitos citotóxicos (CLMF), fue aislado originalmente del virus Epstein-Barr transformante de células B. Es un heterodímero compuesto de dos subunidades de 35 y 40 kDa. Los DNAs complementarios (o cDNAs) para ambas subunidades fueron clonados en 1991 (23). Sus actividades biológicas incluyen aumento de células T citotóxicas, generación y activación celular del asesino activado de linfocinas (LAK), aumento en la citotoxicidad natural de las células asesinas naturales (NK), inducción de células T activadas, proliferación de células NK, induce la producción de IFN- γ por medio de células NK y de células T (23-25).

IL-12 se produce principalmente por células fagocíticas en respuesta a bacterias, parásitos, o por formas de bajo peso molecular del componente de la matriz extracelular ácido hialurónico demostrado recientemente. TGF- β inhibe la producción de IL-12 (26-28).

IFN- γ aumenta la capacidad de los polimorfonucleares para producir IL-12, incrementando probablemente la producción de IL-12 dentro de los tejidos inflamados (29,30). La inducción de IL-12 por IFN- γ es un mecanismo de retroalimentación positiva para aumentar la producción de IL-12. También debido a que IL-12 es la citocina responsable de la diferenciación de las células T cooperadoras 1 (Th1) las cuales son productoras de IFN- γ (31), el efecto potencializador de IFN- γ sobre la producción de IL-12 se observa cuando el IFN- γ se agrega de manera simultánea al estímulo (por ejemplo el lipopolisacárido), pero es más efectivo cuando las células productoras son estimuladas por varias horas en presencia de IFN- γ (32,33).

Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

TGF- β es miembro de una gran superfamilia y existen 3 isoformas TGF- β 1, β -2 y β -3, las cuales comparten numerosas actividades reguladoras que influyen sobre el desarrollo, reparación de tejidos, defensa del huésped, inflamación y tumorigénesis (34-37).

TGF- β como una molécula inmunoreguladora que surge de manera natural, promueve el proceso inflamatorio manteniendo, la adhesión, el reclutamiento y la activación de las células no activadas. Por otra parte, TGF- β es un poderoso inmunosupresor y contribuye en la fase de resolución de la respuesta inflamatoria y reparación de la herida. El balance entre estas dos actividades opuestas es crucial para mantener la homeostasis inmunológica en el huésped, así como también para proporcionar mecanismos de defensa sin lesionar al huésped.

Cuando hay lesión o daño al huésped, las plaquetas, una fuente rica en TGF- β , secretan gránulos en el sitio de infección, liberando TGF- β al ambiente local. A bajas concentraciones (femtomolar) TGF- β actúa como quimioattractante (38), reclutando células inmunes, incluyendo monocitos, linfocitos, células NK, neutrófilos, y fibroblastos al sitio de lesión.

Los monocitos/macrófagos activados, linfocitos, neutrófilos, y fibroblastos sintetizan y liberan TGF- β y la autoinducción de TGF- β sirve para amplificar la respuesta inflamatoria, reclutando células adicionales a la región y amplificando la cascada de citocinas (39).

Además suprime la producción de una gran variedad de citocinas inflamatorias y quimiocinas, que están involucradas en atraer fagocitos mononucleares y que son esenciales para finalizar la respuesta inflamatoria e inducir el proceso de reparación (40).

TGF- β regula la supresión y diferenciación de las células T reguladoras, participa en respuestas para la reparación que lleva a la deposición de la matriz y la reconstrucción del tejido, y está involucrado en la eliminación de células apoptóticas (es sintetizado, liberado y activado en respuesta a estas células) (41).

Interferón gama (IFN- γ)

IFN- γ , interferon tipo II, interferon inmune fue descubierto a principios de los 60's como un producto de las células mononucleares estimuladas por un mitógeno, capaz de interferir con la infección por virus en cultivos celulares. Después se encontró que era indistinguible de la linfocina llamada factor activador de macrófagos (MAF) (42,43).

Las células asesinas naturales producen IFN- γ debido a su interacción con células blanco (células tumorales, células infectadas con virus) y puede ser incrementado por ciertas citocinas, en particular por IL-12. La producción de IFN- γ por las células T es resultado de la activación, seguida de la interacción del receptor de células T antígeno-específicas con su ligando.

La producción de IFN- γ por poblaciones de células T activadas policlonalmente podría ser potencializada o inhibida por otras citocinas. IL-12 es típicamente potencializadora e IL-10 típicamente inhibidora.

IFN- γ actúa de manera sinérgica con TNF- α el cual ejerce efectos sobre las células endoteliales y fagocitos mononucleares que llevan a la inflamación. En particular TNF- α causa liberación de factores procoagulantes, prostaglandinas, proteasas, citocinas y quimiocinas.

El IFN- γ muestra un pico fugaz en el SIRS de origen séptico, fácilmente detectado en los sujetos previamente sensibilizados a una endotoxina. Se detectan interferón α , β y γ , la tasa de IFN- γ es la más confiable (44).

Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)

El gen que codifica para TNF- α se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, entre el loci de HLA clase I y clase II (45). La transcripción de este gen en monocitos, macrófagos y células T lleva a la secreción de un monómero de proteínas soluble de 17kD que se combina subsecuentemente para formar un trímero de 51kD, la forma activa del ligando de TNF- α (46,47).

Hay dos receptores transmembranales para TNF- α identificados en muchos tipos de células: una proteína de 55kD (p55) y una proteína de 75kD (p75) (48,49). Los trímeros circulantes de TNF- α se unen a dos o tres receptores de TNF- α lo que lleva a un cruce y transducción de señal (50,51). Ambos receptores de TNF- α p55 y p75 sufren una ruptura enzimática por la cinasa C en la superficie membranal liberando proteínas de unión solubles que aumentan la actividad de TNF- α a bajas concentraciones (debido al incremento en la vida media de TNF- α por su liberación tan lenta) e inhiben la actividad de TNF- α a concentraciones más altas (52-54).

Después de unirse a sus receptores de membrana, la citocina proinflamatoria regula múltiples efectos biológicos incluyendo reclutamiento de neutrófilos a los sitios locales de inflamación, inducción de edema, activación de la coagulación e inducción en la formación de granuloma (55,56).

Aunque muchos tipos de células producen TNF- α , la fuente principal de esta citocina son los monocitos y los macrófagos. TNF- α induce un número de cambios pro-inflamatorios en las células endoteliales, incluyendo la producción de citocinas, la expresión de moléculas de adhesión, liberación de sustancias procoagulantes, la inducción de iNOS (inductora de óxido nítrico sintasa) (56); así como de prostaglandinas.

1.3. ANTI-INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES)

Químicamente son un grupo heterogéneo de compuestos que en su mayoría son ácidos orgánicos. Poseen propiedades anti-inflamatorias, analgésicas y antipiréticas (57).

Mecanismo de acción.

Sus acciones anti-inflamatorias derivan de su habilidad para inhibir la producción de prostaglandinas. La principal enzima involucrada en la síntesis de prostaglandinas es la prostaglandina G/H sintasa, también conocida como ciclooxigenasa o COX. Esta enzima convierte el ácido araquidónico (AA) en intermediarios inestables PGG₂ (prostaglandina G₂) y PGH₂ (prostaglandina H₂) y lleva a la producción de tromboxano A₂ (TXA₂) y una variedad de prostaglandinas estables (57).

Existen dos formas de ciclooxigenasa, la ciclooxigenasa 1 (COX-1) y la ciclooxigenasa 2 (COX-2). COX-1 es la isoforma constitutiva principal se encuentra en muchas células y tejidos normales mientras que las citocinas (IL-1 y TNF α principalmente) y los mediadores inflamatorios que acompañan a la inflamación inducen la producción de COX-2. Sin embargo, COX-2 también se expresa constitutivamente en ciertas áreas del riñón y el cerebro y se induce en células endoteliales (57).

1.3.1 CLASIFICACION DE LOS AINES

Tabla 1.

Clasificación de los AINES según su mecanismo de acción

Inhibidores no selectivos de la COX (inhiben COX-1 y COX-2).

Derivados del ácido salicílico: aspirina, salicilato de sodio, acetilsalicilato de lisina.

Derivados del para-aminofenol: paracetamol, proparacetamol, fenazopiridina.

Derivados de las pirazolonas: metamizol, propifenazona, fenilbutazona, oxifenbutazona.

Derivados del ácido propiónico: ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno.

Derivados del ácido acético: indolacéticos, pirrolacéticos, fenilacéticos, naftilacéticos.

Derivados del ácido enólico (oxicams): **tenoxicam**, piroxicam, pivoxicam.

Derivados del ácido antranílico (fenamatos): ácido mefenámico, ácido meclofenámico.

Inhibidores selectivos de la COX-2.

Oxicams: meloxicam

Sulfoanilida: nimesulida

Indolacéticos: etodolaco

Coxibs: celecobix, refecobix, etoricobix

Fuente: Farmacología Básica y Clínica, Velázquez P.L (58).

1.3.2 Derivados del ácido enólico (oxicams): Tenoxicam

Se introdujeron a finales de los años setenta como AINES de semivida larga, lo que permite una sola dosis diaria (58). Entre ellos se encuentra el tenoxicam (4-hidroxi-2-metil-N-2-piridinil-2H-tieno[2,3-e]-1,2-tiazina-3-carboxamida 1,1-dioxido) (Figura 1) (59).

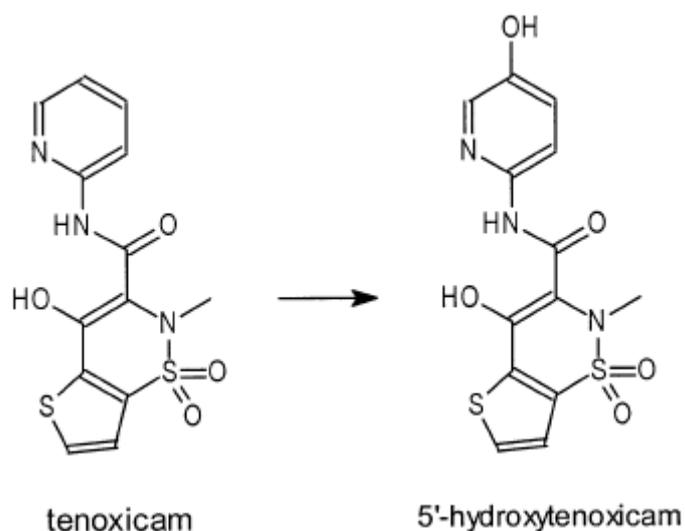


Fig. 1. El Tenoxicam es metabolizado en los humanos principalmente por hidroxilación dando el metabolito inactivo 5-hidroxi-tenoxicam (59).

Su vida media es de 60-75 h. Sufre metabolismo hepático. Se excreta por el riñón el 66%, el resto por la bilis. Su volumen de distribución es de 0.15 l/kg. Posee una biodisponibilidad del 100% (60,61).

Entre sus efectos adversos se encuentran los siguientes: Náuseas, diarrea, estreñimiento, vertigo, cefalea, prurito, elevación de creatinina, elevación de la bilirrubina, baja de hemoglobina, granulocitopenia, trombocitopenia, hipertensión, edema, palpitaciones, trastornos de la visión y fotosensibilidad entre otros.

ANTECEDENTES

1.4. AMIBIASIS

Parasitosis producida por *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), protozoo caracterizado por su forma irregular, debido a la emisión de prolongaciones citoplásmicas conocidas como pseudópodos. La forma infectante de este microorganismo es el quiste, el cual se excreta con las heces y se transmite mediante la contaminación fecal de manos, alimentos, bebidas y fomites, de tal manera que es ingerido, y en el intestino da lugar al trofozoito, responsable del daño que se presenta en esta enfermedad.

La infección generalmente compromete al colon, pero puede extenderse hacia otros órganos por vía hematógena, tales como el hígado, y con menor frecuencia, a los pulmones y cerebro (62).

E. histolytica causa anualmente un estimado de 50 millones de casos de amibiasis invasiva alrededor del mundo, en su mayoría en forma de disentería amibiana, pero ocasionalmente complicaciones extraintestinales serias, principalmente absceso hepático amibiano (AHA). Se ha puesto atención especial a las características inflamatorias inusuales que acompañan a esta enfermedad en humanos y animales de experimentación (63).

1.5. FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCIÓN DE LOS MONOCITOS (FILM)

En el absceso hepático amibiano llama la atención la escasez de elementos inflamatorios en los estadios avanzados (64). Para explicar este fenómeno se han propuesto fundamentalmente dos hipótesis, que no resultan necesariamente excluyentes: la "citolítica" y la "antimigratoria". Según la primera, la amiba destruiría los leucocitos conforme éstos fueran arribando al tejido infectado (65). La hipótesis "antimigratoria" propuesta por Pérez-Tamayo sugiere que *E. histolytica* podría producir y liberar factores capaces de inhibir el arribo de los leucocitos al foco de la infección (64). La falta de estos elementos inflamatorios tardíos pueden, a su vez, estar

relacionados con la ausencia de tejido cicatricial y en consecuencia con la perfecta regeneración del parénquima hepático. En relación con esta segunda hipótesis, Kretschmer y col., demostraron que en el sobrenadante de cultivos axénicos de *E. histolytica* se encuentra un factor capaz de inhibir *in vitro* la locomoción (aleatoria, quimiocinesis y quimiotaxis) de los fagocitos mononucleares (FM) humanos, y no la de los polimorfonucleares humanos (PMN) por esta razón al factor se le dió el nombre de factor inhibidor de la locomoción de monocitos (FILM) (Figura 2) (66).

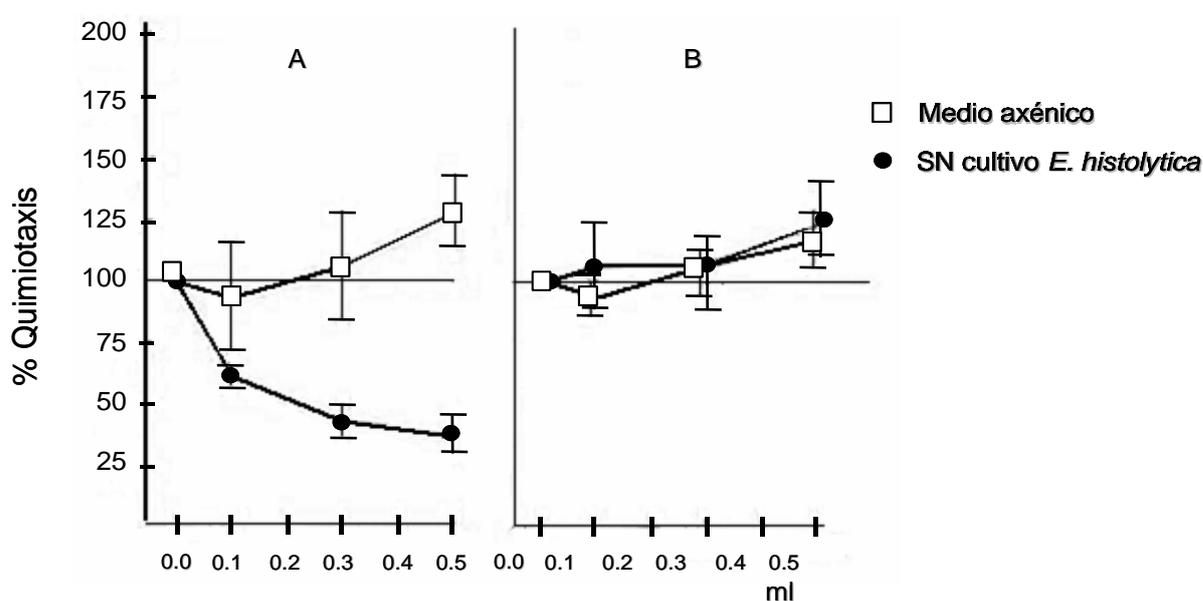


Fig. 2. Efecto del sobrenadante (SN) de cultivos axénicos de *E. histolytica* sobre la quimiotaxis de: A) monocitos humanos y B) polimorfonucleares humanos. El SN del cultivo de *E. histolytica* ejerce un efecto dosis dependiente (ml) sobre la quimiotaxis de monocitos humanos pero no sobre la de los polimorfonucleares (66).

El FILM *in vivo* inhibe en forma dosis-dependiente la locomoción de los FM, pero no la de los leucocitos polimorfonucleares, como lo revelaron los estudios con cámaras de Rebeck en voluntarios humanos (66).

El efecto biológico del FILM sobre la quimiotaxis de FM puede cancelarse inhibiendo la síntesis de proteínas en los FM mediante cicloheximida. El FILM es una molécula de 765-478 Da (Figura 3), termoestable y que almacenada a -70°C no pierde su actividad biológica (67).

El FILM se purificó a partir de sobrenadantes de cultivos de amibas ultrafiltrado por Sephadex G-15, la actividad biológica del FILM se detectó entre los 765-478 Da (Figura 3) (67). Esta fracción fue sometida a HPLC de fase reversa, se obtuvieron 5 picos, y solamente uno mostró actividad biológica (Figura 4), este pico se concentró de nuevo por HPLC, se sometió a espectrofotometría de masas y finalmente se secuenció por la técnica de degradación de Edman, con la que se obtuvo la estructura primaria del factor: Met-Gln-Cis-Asn-Ser de 581Da (68, 69).

Los estudios posteriores revelaron que los monocitos que resultan inhibidos por este factor muestran un aumento de microtúbulos asociados al centriolo, lo que sugiere una congregación excesiva de microtúbulos como la causa directa de la reducción de la locomoción (70).

El FILM se ha detectado también en el extracto soluble y en el paquete de redispersión de amibas sometidas a lisis lavadas exhaustivamente y procesadas según el método de Aley y col., (71), lo que sugiere que el FILM es producido por las amibas, hecho comprobado con estudios de cisteina marcada radiactivamente donde se verificó que el FILM se sintetiza de *novο* y no por ingestión-digestión y regurgitación de algún componente del medio (72).

El factor inhibidor puede absorberse con FM y recuperarse subsecuentemente por elusión ácida (pH=3.0), lo cual sugiere una interacción dinámica y reversible entre el FILM y su receptor sobre la membrana de los FM. Los PMN absorben el FILM sólo parcialmente, mientras que los linfocitos no lo hacen (73).

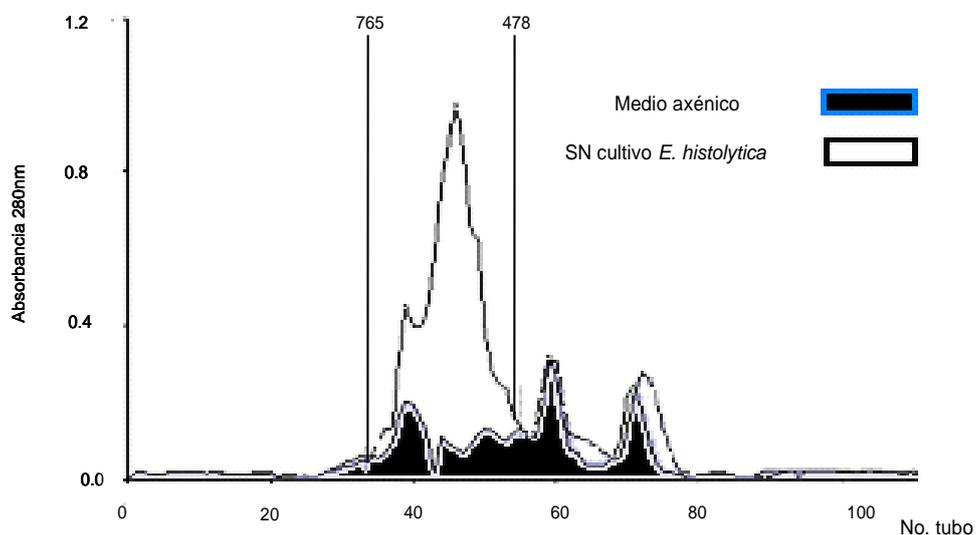


Fig. 3. Cromatografía por Shephadex G-15 del sobrenadante del cultivo de *E. histolytica* y medio axénico. La actividad biológica se detectó en el SN del cultivo de *E. histolytica* entre los pesos moleculares señalados (67).

El tratamiento del FILM con peryodato no modifica su efecto inhibitor sobre la quimiotaxis de FM. En cambio, el tratamiento de los FM con concanavalina (ConA) o con peryodato cancela o al menos disminuye importantemente el efecto inhibitor, lo que sugiere que el FILM no contiene carbohidratos con grupos vecinales OH-OH u OH-NH₂, mientras que él o los receptores sí los contienen. Cuando el ensayo de la quimiotaxis inhibida por FILM se realizó en presencia de diversos carbohidratos, sólo se observó disminución significativa de la inhibición usando D-manosa, 4-0-β-galactosil-D-manósido y manana, pero no con otros carbohidratos (incluyendo glucosa y fucosa) (74).

El FILM *in vivo*, retrasa el arribo de leucocitos mononucleares en cámaras de Rebeck en la piel humana (66); en cobayos y gerbos, inhibe la hipersensibilidad retardada cutánea por contacto al 1-cloro-2-4-dinitrobenzono (DNCB) (75) y abate la expresión de moléculas de adhesión VLA-4 en monocitos y VCAM en el endotelio vascular (76).

Además el FILM cancela la explosión respiratoria medida por quimioluminiscencia (ROI: H₂O₂, O₂⁻, OH⁻) y la producción de óxido nítrico (RNI:NO) en monocitos y neutrófilos humanos, todo ello sin afectar la viabilidad celular (77, 78). Los eosinófilos no son afectados por el FILM (79).

El efecto del FILM sobre la expresión de citocinas pro y anti-inflamatorias en linfocitos T CD4⁺ humanos reveló que inhibe la expresión de IL-1 β principal citocina proinflamatoria, pero aumenta la expresión de IL-10 que es el prototipo de las citocinas anti-inflamatorias (80).

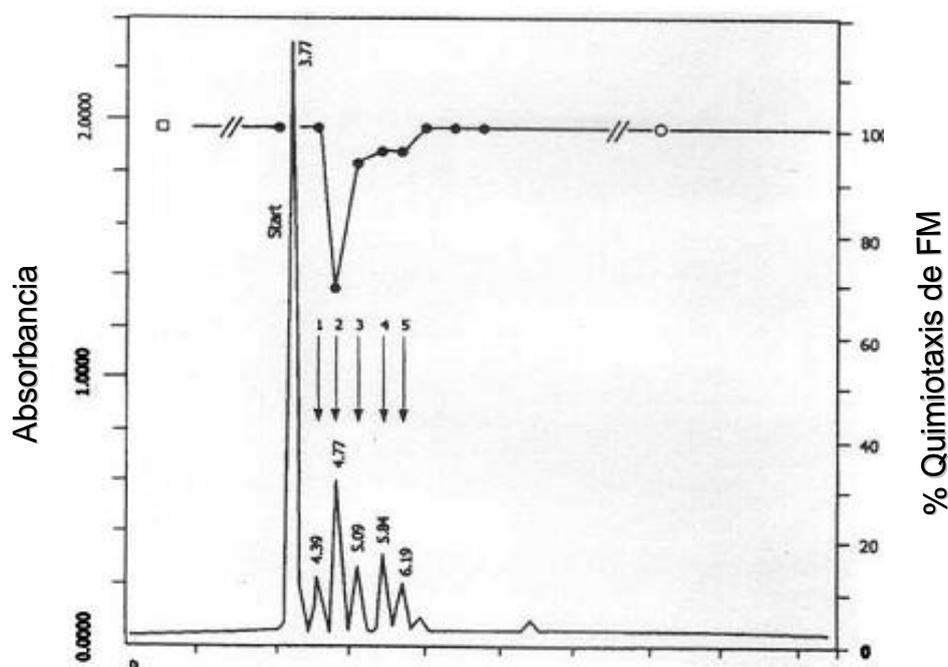


Fig. 4. Cromatografía por HPLC de la fracción 765-478 con la actividad biológica. El pico 2 inhibió la quimiotaxis de los FM (68).

Un péptido sintético con la misma secuencia del FILM (obtenido de American Peptide Company, INC.) reprodujo el efecto biológico del FILM nativo (FILMn), por otro lado, un pentapéptido con los mismos aminoácidos pero en diferente posición (Gln-Cis-Met-Ser-Asn) ("scramble") carece de los efectos biológicos mencionados (68).

Mediante estudios de la estructura electrónica, de sus propiedades estructurales y fisicoquímicas a nivel Hartree-Fock, se identificó la estructura química espacial y el sitio reactivo más probable en el FILM. Los resultados geométricos, estructurales y de orbitales destacan la presencia de un grupo farmacóforo – ...Cis-Asn-Ser – en la secuencia del FILM, el cual podría ser relevante e imprescindible con respecto a la actividad anti-inflamatoria (Figura 5) (81).

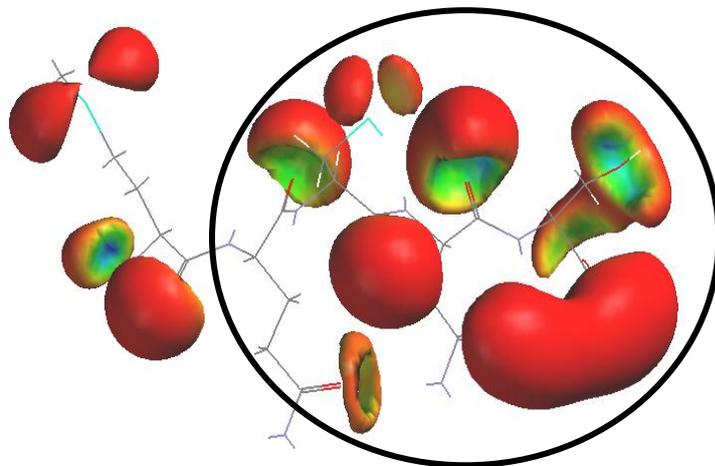


Fig. 5. El estudio de la isosuperficie del potencial electrostático destaca la presencia de una mayor densidad electrónica en el segmento del grupo farmacóforo que está constituido por los aminoácidos ...Cis-Asn-Ser (81).

La proteína que origina al FILM no se conoce todavía, sin embargo, una búsqueda en el genoma amibiano en el Instituto Sanger (The Sanger Institute Research) (82) reveló la existencia de tres secuencias candidatas de nucleótidos que pueden originar el factor con los siguientes números de acceso: *Ent394b09.plc*; *Ent639c05.qlc*; *Ent1747a01.plk*, esta última es la que más probablemente de origen al FILM. Por otro lado, se encontró en el GenBank (National Center For Biotechnology Information, NCBI) (83) que la secuencia de aminoácidos (Met-Gln-Cis-Asn-Ser) del FILM presenta un 100% de homología dentro de 28 secuencias de proteínas distribuidas en 46 especies (*Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Sandfly fever naples virus*, *Cryptosporidium hominis*, *Homo sapiens* entre otras).

Tantos efectos del FILM sobre una cantidad enorme de células llevó a considerar una acción sobre la red de citocinas (pro-inflamatorias y anti-inflamatorias), como uno de los probables mecanismos de acción.

2. Fundamento Teórico

La inflamación es la reacción del organismo frente a la invasión por un agente infeccioso, ante un estímulo antigénico o simplemente en lesiones físicas como las contusiones o las fracturas. Es una respuesta en la que se produce un desplazamiento de leucocitos y moléculas plasmáticas hacia las regiones de la infección o de lesión tisular, estas funciones biológicas son reguladas por una amplia red de citocinas. La lesión dispara una cascada inflamatoria a través del incremento en la expresión de citocinas.

El factor inhibidor de la locomoción de monocitos (FILM), un pentapéptido con propiedades anti-inflamatorias, podría contribuir regulando la inflamación observada después de un traumatismo, a través de los efectos que ejerce directamente sobre los monocitos o indirectamente, modulando la producción y/o expresión de citocinas involucradas en el reclutamiento de células mononucleares al foco inflamatorio

3. Planteamiento del problema

Las citocinas son sustancias activas que interfieren de forma muy importante regulando el proceso inflamatorio. El FILM posee propiedades anti-inflamatorias selectivas sobre los leucocitos. Los efectos del FILM sobre la inflamación podrían estar causados por un efecto directo sobre las células efectoras como lo sugieren los estudios *in vitro*, (inhibición de la locomoción de los monocitos y la explosión metabólica) pero también indirectamente a través de su efecto sobre la red de citocinas, disminuyendo el estado inflamatorio.

4. Objetivos

4.1. General

Analizar el efecto del factor inhibidor de la locomoción de monocitos (FILM) sobre la expresión de citocinas (IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β e IFN- γ) en el proceso inflamatorio que ocurre después de un traumatismo agudo controlado (contusión y/o fractura).

4.2. Particulares

- I) Evaluar si el FILM afecta la expresión *in situ* de citocinas pro y anti inflamatorias producidas después de una contusión en ratas Wistar.
- II) Evaluar si el FILM afecta la expresión *in situ* de citocinas pro y anti inflamatorias producidas después de una fractura en ratas Wistar.

5. Hipótesis

Debido a los efectos comprobados del FILM tanto *in vivo* como *in vitro* los cuales se relacionan con el proceso inflamatorio, este afectará la expresión de citocinas pro- inflamatorias sin dañar la expresión de aquellas anti-inflamatorias, con lo cual disminuirá la inflamación que se genera debido a la producción de una fractura o de una contusión

6. Diseño de la investigación

Estudio: experimental longitudinal prospectivo

6.1. Población

Ratas Wistar machos adultos jóvenes sanos de 200-300 g de peso

6.2. Criterios

Inclusión: Ratas Wistar machos jóvenes sanos

Exclusión: Ratas con más de 300 g de peso

Variable dependiente

Expresión de citocinas: anti-inflamatorias (IL-12, IL10, e IL-6) y pro-inflamatorias (TNF- α , TGF- β e IFN- γ)

Variable independiente

Ratas Wistar adultos jóvenes de 200-300 g de peso

7. Material y Métodos

Todos los estudios en las ratas Wistar se llevaron a cabo teniendo en cuenta la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (84).

Los ensayos incluyeron 5 grupos experimentales con 6 ratas Wistar cada uno, distribuidos de la siguiente manera:

- 1) Grupo control
- 2) Grupo con contusión tratado con anti-inflamatorios no esteroideos (tenoxicam 3mg / Kg /día IM)
- 3) Grupo con fractura tratado con anti-inflamatorios no esteroideos (tenoxicam 3 mg / Kg /día IM)
- 4) Grupo con contusión tratado con FILM (0.1 mg / Kg / día IM)
- 5) Grupo con fractura tratado con FILM (0.1 mg / Kg / día IM)

7.1. Modelo de fractura y contusión

Los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una mezcla de xilazina 13 mg / Kg (sedaject, servicios veterinarios Darwin) y ketamina 87 mg / Kg, (inoketam, servicios veterinarios darwin). Las tibias derechas de ratas Wistar anestesiadas se fracturaron (fijadas previamente con un clavo de forma intramedular) o se les provocó la contusión usando una máquina para producir fracturas controladas, (con un peso de 497.540 g que se deja caer desde una altura de 30 cm y una ganancia de 5 mm para la producción de la fractura y de 28 cm de altura y 2 mm de ganancia para la contusión) por el método propuesto por An Y y col. 1999 (85), y modificado por Domínguez y col. (86) seguido de la aplicación intramuscular de tenoxicam o de FILM de acuerdo al grupo correspondiente.

Las figuras 6-8 muestran diferentes fases en la producción de la lesión (fractura y contusión).



Fig. 6. Posición del espécimen para la producción de la lesión.



Fig. 7. Ajuste correcto de la tibia derecha para la producción de la lesión.



Fig. 8. Producción de la lesión.

7.2. Obtención de las muestras biológicas

En condiciones de esterilidad (quirófano para pequeñas especies) con 1 mL de pentobarbital sódico (65 mg / Kg) se sacrificaron 6 ratas de cada grupo 24 y 48 h después de inyectar FILM (0.1 mg / Kg / día IM) o tenoxicam (3 mg / Kg / día IM). Se eliminó el pelo con una rasuradora en el área en donde se provocó la contusión o la fractura, posteriormente se limpió esta área con alcohol etílico, se eliminó la piel del animal, con un bisturí se realizó un corte del músculo en el área de la lesión y se colocó en solución salina al 0.9 % para los estudios por PCR convencional y PCR tiempo real.

7.3. Obtención de RNA total (RNA_T) del tejido lesionado (fractura o contusión)

Del tejido obtenido se pesaron 100 mg y se disgregó con un bisturí (realizando este procedimiento en hielo). Se virtió el tejido con la solución salina en un tubo estéril de 15 mL, se centrifugó por 5 min / 4 °C a 4,000 rpm, y se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 1000 µL de trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), y se homogeneizó en el cuarto frío con un homogenizador (PRO Scientific INC, Germany). Se centrifugó 15 min / 4 °C a 4,000 rpm, se obtuvo el sobrenadante y se transfirió a tubos eppendorf de 2 ml.

Se agregaron 12.5 µL de glicógeno (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), se mezcló con vortex 5-10 s y se colocó en hielo por 5 min, posteriormente se adicionaron 220 µL de cloroformo y se homogeneizó con vortex 5-10 s, se colocó en hielo por 5 min, se centrifugó 15 min / 4 °C a 10,000 rpm y se obtuvo la fase acuosa.

A la fase acuosa se le adicionaron 500 µL de una mezcla de cloroformo – isoamílico (24:1), se homogeneizó con vortex por 15 s, se centrifugó 15 min / 4 °C a 12,000 rpm. El sobrenadante se pasó a otro tubo estéril, se agregaron 500 µL de isopropanol a -70 °C, se mezcló con vortex ligeramente 3 s, se colocó en hielo 15 min y se centrifugó 15 min / 4 °C a 10,000 rpm, se eliminó el isopropanol, se adicionaron 1000 µL de etanol al 80 % a -70° C, se homogeneizó

con vortex ligeramente y se centrifugó 5 min / 4 °C a 6,000 rpm. Se eliminó el etanol, se centrifugó 2-5 s a 1000 rpm y se eliminó el exceso de etanol.

EL botón obtenido se colocó en un baño de agua a 45 °C, por 3 min, y posteriormente se dejaron los tubos destapados a temperatura ambiente 5 min.

Se adicionaron 22 µL de agua inyectable (previamente calentada a 45 °C) y se calentaron los tubos nuevamente en un baño de agua a 45 °C por 3 min.

El RNA obtenido se resuspendió suavemente de 10 a 15 veces.

7.4. Cuantificación y verificación de la integridad del RNA_T

Se mezclaron 2 µL de las muestras de RNA_T obtenidas en 98 µL de agua inyectable y se cuantificó en un espectrofotómetro (Gen Quant Prospectrophotometer, Amersham Pharmacia Biotecia, Uppsala, Sweden) la concentración se midió en ng / µL a una longitud de onda de 260 nm y la pureza a 260 / 280 nm, contra un blanco de agua inyectable.

La integridad del RNA_T se verificó en un gel desnaturalizante de agarosa al 1.5% utilizando 2 µg del RNA_T obtenido más 5 µL de solución de carga (Gel Loading Buffer, Clinical Systems). Se utilizó un marcador de 100 pares de bases (pb) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) como control de peso molecular. El gel se corrió utilizando una solución de tris-borato-EDTA 1X (TBE) como solución de corrida.

Se colocaron alícuotas de 2 µg de RNA en tubos eppendorf y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

7.5. Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Se realizó la siguiente mezcla en un tubo eppendorf de 0.2-0.5 ml (mezcla 1)

Componente	Cantidad por reacción
(Oligo dT) ₂₀	1 μ L
RNA (2 μ g)	X μ L
dNTP's 10 mM	2 μ L
Agua DEPC	X μ L
Volumen total	12 μ L

La mezcla 1 se incubó a 65 °C por 5 min para desnaturalizar el RNA_T. Por otro lado se preparó

la mezcla 2 en hielo como sigue:

Componente	Cantidad por reacción
Regulador para síntesis de cDNA 5x	4 μ L
RNAsa OUT TM (40 U / μ l)	1 μ L
0.1 M DTT	1 μ L
Agua DEPC	1 μ L
Enzima Thermoscript TM RT (15 U / μ l)	1 μ L

Nota: La enzima Thermoscript se agregó al último.

Se agregaron los 7 μ L de la mezcla de reacción número 2 a la mezcla 1 y después se adicionó la enzima Thermoscript, se transfirió la muestra al termociclador precalentado a la temperatura apropiada para la síntesis de cDNA y se incubó de la siguiente manera:

60 min a 55°C, 5 min a 85 °C, posteriormente se agregó 1 μ L de RNAsa H y se incubó a 37 °C por 20 min.

El cDNA obtenido de esta forma se utilizó para la amplificación de los fragmentos de los genes seleccionados.

7.6. Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional de los genes IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β , e IFN- γ , como gen constitutivo se utilizó Hypoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT).

Primers utilizados

Las secuencias de los primers fueron diseñadas a partir de secuencias de cDNA de la base de datos del Gene Bank del National Center for Biotechnology Information (84) con el programa Integrated DNA Technologies "Primer Quest" (tabla 2).

GEN	OLIGO DERECHO	OLIGO REVERSO	PARES DE BASES	GENE BANK
HPRT	GAA CTA GCA GAC GTT CTA GTC CTG	GAT CTG TCT GTC TCA CAA GGG AAG	185	NM_012583
IL-6	TGT GGA AGA CAA ACC ATG TTG CCG	TAT TGC AGG TGA GCT GGA CGT TCT	117	NM_001008725
IL-10	ACC AAT GGT GTC CTT TCA CTT GCC	GCG CTG AGC TGT TGC AAG GAT AAT	132	X60675
IL-12	TGC CAA GTG TCT TAA CCA GTC CCA	TGA TCG ATG TCT CCA GCA GTG CAA	111	ACC NM_053390
TNF- α	CTC TTC TGT CTA CTG AAC TTC GGG	GAG AAG ATG ATC TGA GTG TGA GGG	115	NM_012675
TGF- β	AGA CGG AAT ACA GGG CTT TCG CTT	TCG ACG TTT GGG ACT GAT CCC ATT	100	NM_021578
IFN- γ	CAA CCA GGC CAT CAG CAA CAA CAT	TCT GTG GGT TGT TCA CCT CGA ACT	128	NM_138880

Tabla. 2

Se agregó para cada tubo de reacción lo siguiente:

Componente	Cantidad por reacción
Cdna	1.0 μ L
Regulador para PCR 10x	1.0 μ L
MgCl ₂ 50 Mm	0.3 μ L
Platinum Taq DNA Polymerase (5 u / μ L)	0.2 μ L
Oligo derecho 10 pm	1.5 μ L
Oligo reverso 10 pm	1.5 μ L
DNTP's 10 Mm	0.2 μ L
Agua DEPC	4.3 μ L

Nota: La enzima Platinum Taq DNA Polymerase se agregó al último

Se amplificó cada gen de acuerdo con el siguiente protocolo:

HPRT	IL-6	IL-10	IL-12	TNF- α	TGF- β	IFN- γ	TIEMPO	No DE CICLOS
95.0 °C	95.0 °C	95.0 °C	5 minutos	1				
94.0 °C	94.0 °C	94.0 °C	30 segundos	} 35				
63.7 °C	61.1 °C	60.1 °C	61.1 °C	61.1 °C	61.1 °C	62.6 °C	30 segundos	
72.0 °C	72.0 °C	72.0 °C	30 segundos					
72.0 °C	72.0 °C	72.0 °C	10 minutos	1				
4.0 °C	4.0 °C	4.0 °C	α	α				

La electroforesis del producto generado se corrió sobre un gel de agarosa al 1.8 % mezclando 6 μ L de cada amplificado más 5 μ L de solución de carga, utilizando el marcador de 100 pb como control de peso molecular.

7.7. PCR Tiempo real (PCR-TR).

Se amplificaron a partir del cDNA generado, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β e IFN- γ , utilizando los genes HPRT y β -Actina (como constitutivos), se usó el agente intercalante fluorescente SYBR Green (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) a un volumen final de 10 μ L.

HPRT

Componente	Volumen μ L
Agua grado PCR	5.0
Primer derecho (5 pm)	1.0
Primer reverso (5 pm)	1.0
Master Mix concentración 5x	2.0
cDNA	1.0

β -ACTINA

Componente	Volumen μ L
Agua grado PCR	6.50
Primer derecho (5 pm)	0.25
Primer reverso (5 pm)	0.25
Master Mix concentración 5x	2.0
cDNA	1.0

IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β , IFN- γ (para cada uno)

Componente	Volumen μ L
Agua grado PCR	4.5
Primer derecho (5 pm)	1.0
Primer reverso (5 pm)	1.0
Master Mix concentración 5x	2.0
cDNA	1.5

Para cada uno de los genes amplificados se siguió el siguiente protocolo:

1. PREINCUBACIÓN a 95 °C durante 10 minutos
2. PCR (con modo de análisis de cuantificación)

GEN	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
HPRT	95 °C	10 s	} 40
	62 °C	10 s	
	72 °C	6 s	
β -ACTINA	95 °C	10 s	} 30
	61 °C	7 s	
	72 °C	10 s	
IL-6 } IL-10 }	95 °C	10 s	} 34
	63 °C	10 s	
	72 °C	8 s	
IL-12	95 °C	10 s	} 40
	64 °C	10 s	
	72 °C	6 s	
TNF- α } TGF- β } IFN- γ }	95 °C	10 s	} 40
	63 °C	10 s	
	72 °C	8 s	

3. DISOCIACIÓN

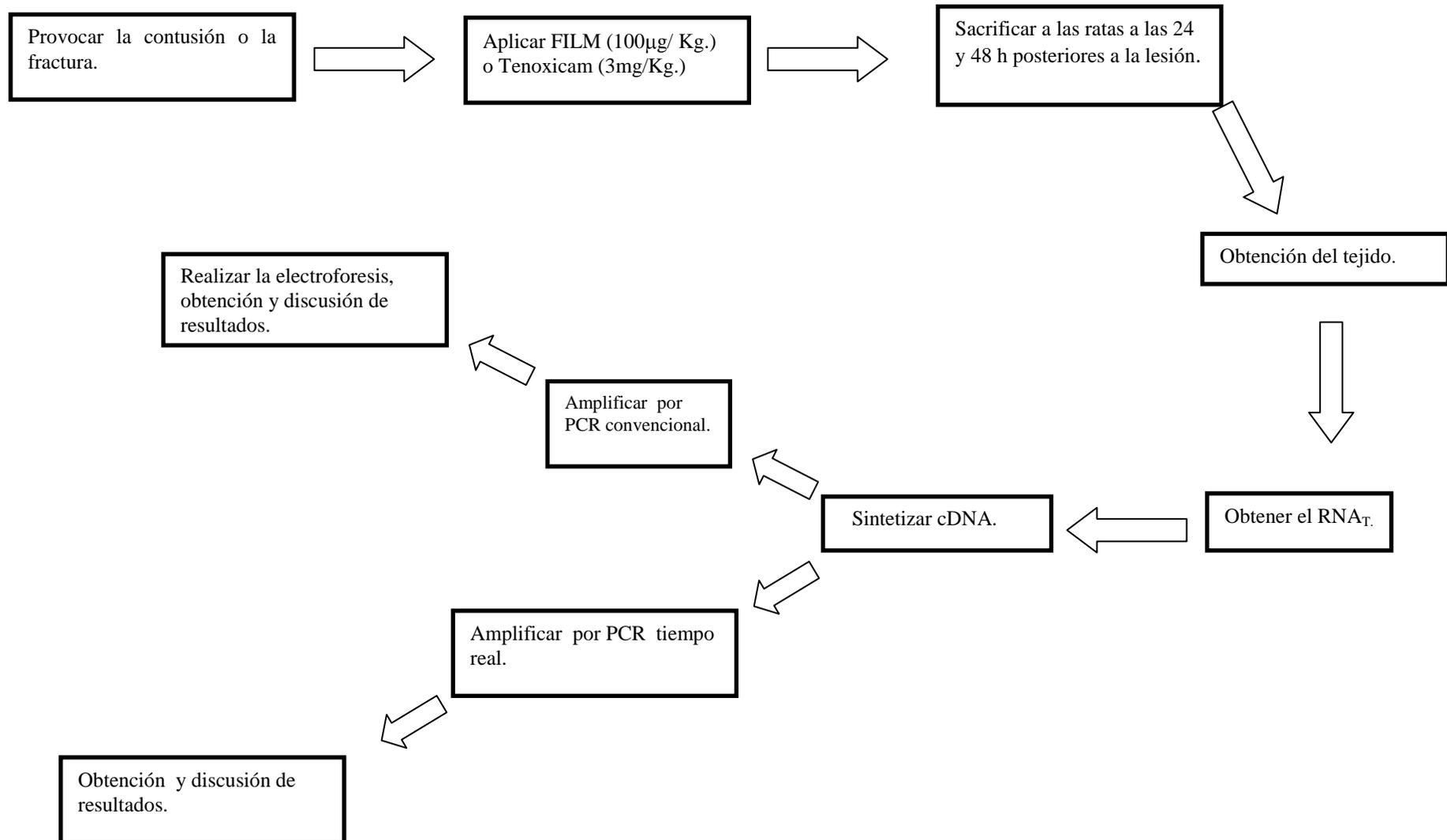
95 °C

65 °C 15-60 s

95 °C

4. ENFRIAMIENTO a 40 °C

8. Diagrama de trabajo



9. Resultados

9.1. Obtención del RNA total

Se confirmó la integridad del RNA total obtenido del tejido lesionado (contusión o fractura) en un gel de agarosa al 1.5%, las bandas características de las fracciones correspondientes al RNA ribosomal 28S y 18S se vieron en cada una de las muestras con los distintos tratamientos (Tenoxicam o FILM) y tiempos diferentes (24 h y 48 h), con una relación 28S/18S de 2:1 (Figuras 9,10).

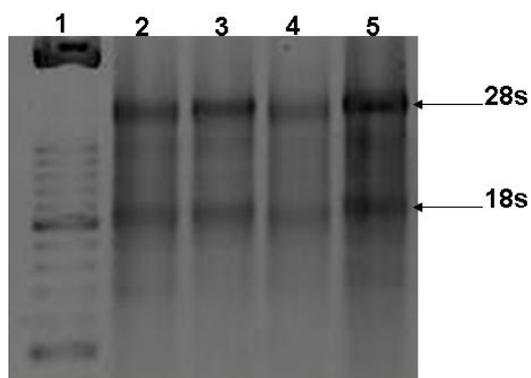


Fig. 9. RNA total de muestras del grupo tratado con Tenoxicam. 1) MK 100 pb; 2) Contusión 24 h; 3) Contusión 48 h; 4) Fractura 24 h; 5) Fractura 48 h.

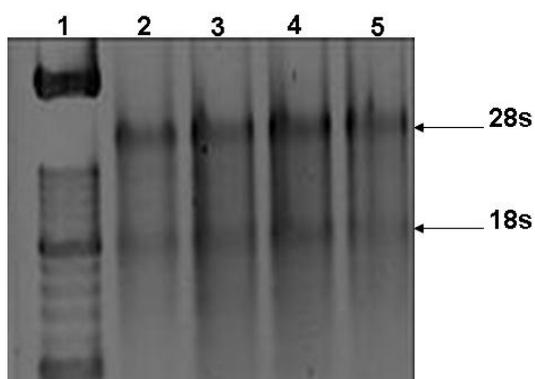


Fig. 10. RNA total de muestras del grupo tratado con con FILM. 1) MK 100 pb; 2) Contusión 24 h; 3) Contusión 48 h; 4) Fractura 24 h; 5) Fractura 48 h.

9.2. PCR convencional

El PCR convencional mostró cada uno de los amplificados que corresponden a los pares de bases esperados de los genes estudiados: IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β , e IFN- γ y HPRT (como gen constitutivo) en cada uno de los animales con contusión o con fractura tratados con FILM o con Tenoxicam. La amplificación se realizó en tejido obtenido 24 y 48 h posteriores a la lesión (Figuras 11-23).

En todos los casos F representa el grupo tratado con FILM o T con tenoxicam y MK el marcador de 100 pb. La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1.8%.

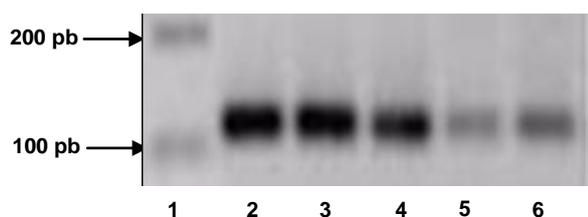


Fig. 11. Amplificado para IL-6 (117 pb) después de una contusión. 1) MK; 2) Control; 3) T-24 h; 4) F-24 h; 5) T-48 h; 6) F-48 h.

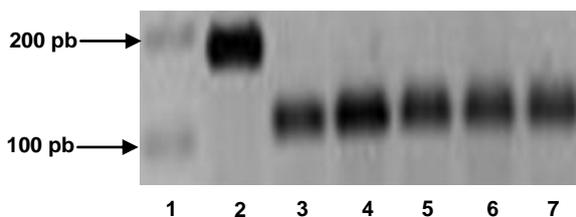


Fig. 12. Amplificado para IL-6 (117 pb) después de una fractura. 1) MK; 2) HPRT; 3) control; 4) T-24 h; 5) F-24 h; 6) T-48 h; 7) F-48 h.

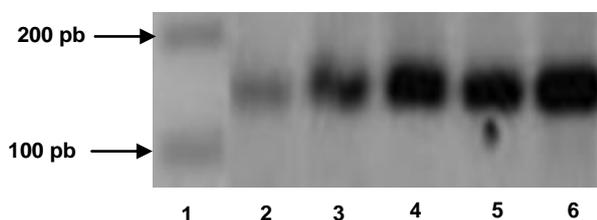


Fig. 13. Amplificado para IL-10 (132 pb) después de una contusión. 1) MK; 2) Control; 3) T-24 h; 4) F-24 h; 5) T-48 h; 6) F-48 h.

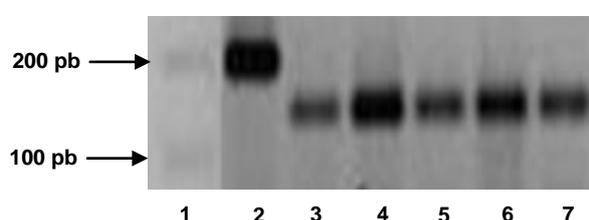


Fig. 14. Amplificado para IL-10 (132 pb) después de una fractura. 1) MK; 2) HPRT; 3) control; 4) T-24 h; 5) F-24 h; 6) T-48 h; 7) F-48 h.

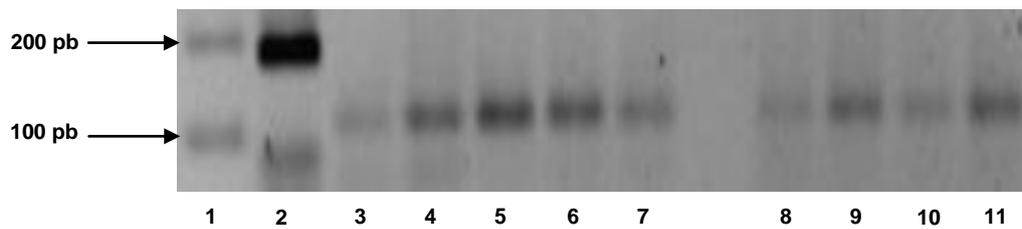


Fig. 15. Amplificado para IL-12 (111 pb) después de una fractura (1-7) o de una contusión (8-11). 1) MK; 2) HPRT; 3) Control; 4) T-24 h; 5) F-24 h; 6) T-48 h; 7) F-48 h; 8) T-24 h; 9) F-24 h; 10) T-48 h; 11) F-48 h.

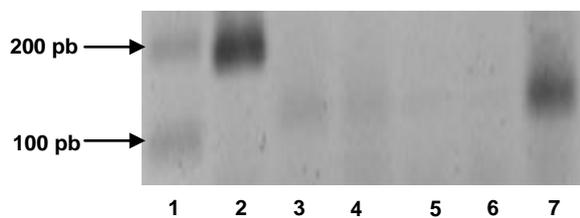


Fig. 16. Amplificado para TNF- α (115 pb) después de una contusión. 1) MK; 2) HPRT; 3) Control; 4) T-24 h; 5) F-24 h; 6) T-48 h; 7) F-48 h.

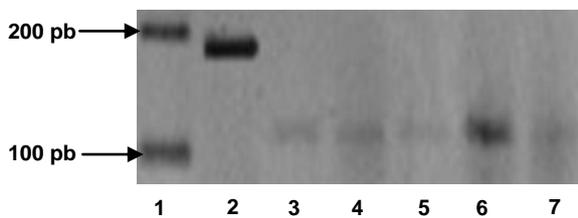


Fig. 17. Amplificado para TNF- α (115 pb) después de una fractura. 1) MK; 2) HPRT; 3) Control; 4) T-24 h; 5) F-24 h; 6) T-48 h; 7) F-48 h.

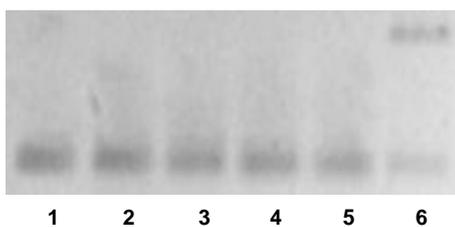


Fig. 18. Amplificado para TGF- β (100 pb) después de una contusión. 1) Control; 2) T-24 h; 3) F-24 h; 4) T-48 h; 5) F-48 h; 6) MK.

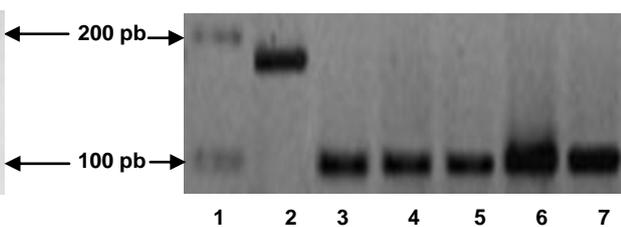


Fig. 19. Amplificado para TGF- β (100 pb) después de una fractura. 1) MK; 2) HPRT; 3) Control; 4) T-24 h; 5) F-24 h; 6) T-48 h; 7) F-48 h.

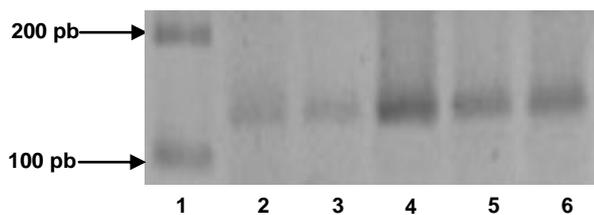


Fig. 20. Amplificado para IFN- γ (128 pb) después de una contusión. 1) MK; 2) Control; 3) T-24 h; 4) F-24 h; 5) T-48 h; 6) F-48 h.

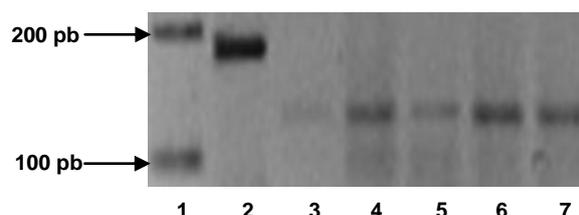


Fig. 21. Amplificado para IFN- γ (128 pb) después de una fractura. 1) MK; 2) HPRT; 3) Control; 4) T-24 h; 5) F-24 h; 6) T-48 h; 7) F-48 h.

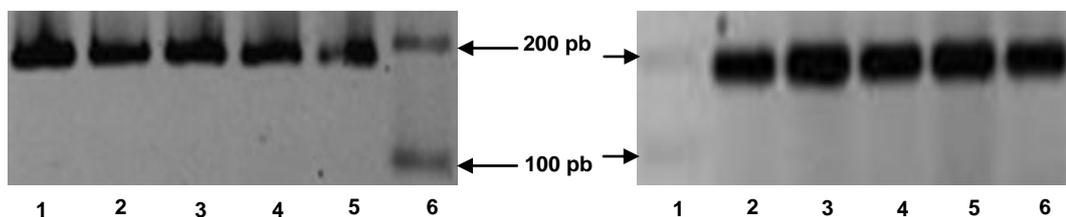


Fig. 22. Amplificado para HPRT (185 pb) después de una contusión. 1) Control; 2) T-24 h; 3) F-24 h; 4) T-48 h; 5) F-48 h; 6) MK.

Fig. 23. Amplificado para HPRT (185 pb) después de una fractura. 1) MK; 2) Control; 3) T-24 h; 4) F-24 h; 5) T-48 h; 6) F-48 h.

9.3. PCR Tiempo Real

Se realizó la estandarización de los genes en estudio: IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β e IFN- γ , y utilizando como gen constitutivo HPRT para encontrar las condiciones óptimas de amplificación en donde podemos observar los valores de los puntos de cruce o ciclo promedio Cps (cross point por sus siglas en inglés) para cada una de las citocinas analizadas, mientras que en los controles negativos no se detectó Cps hasta los 45 ciclos en ninguno de los casos, mostrando la especificidad de los primers (Figuras 24-30).

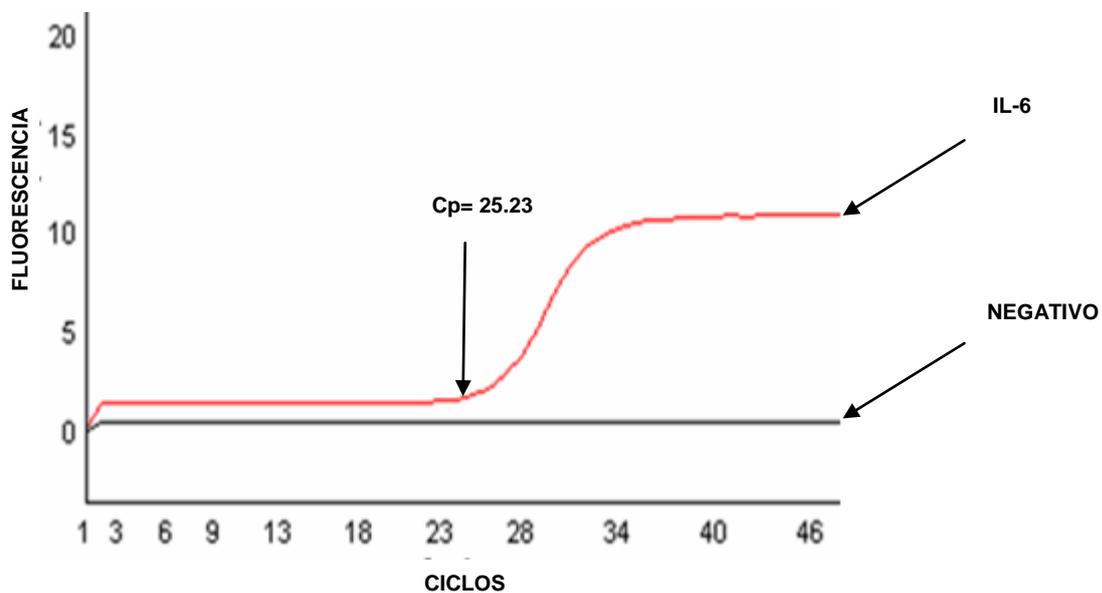


Fig. 24. Curva para IL-6 por PCR Tiempo real.

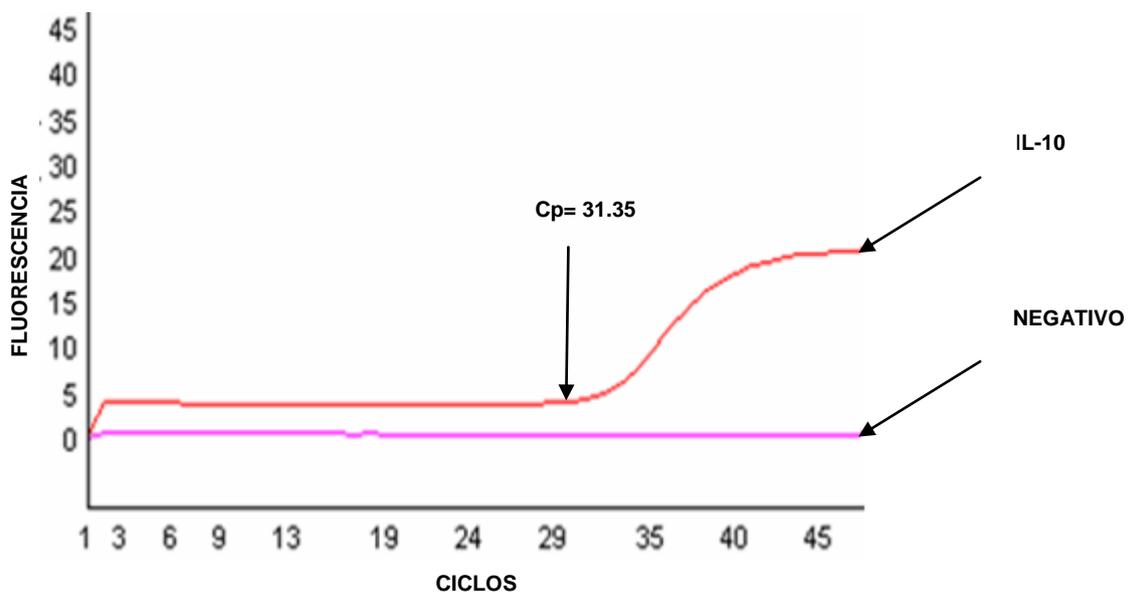


Fig. 25. Curva para IL-10 por PCR tiempo real.

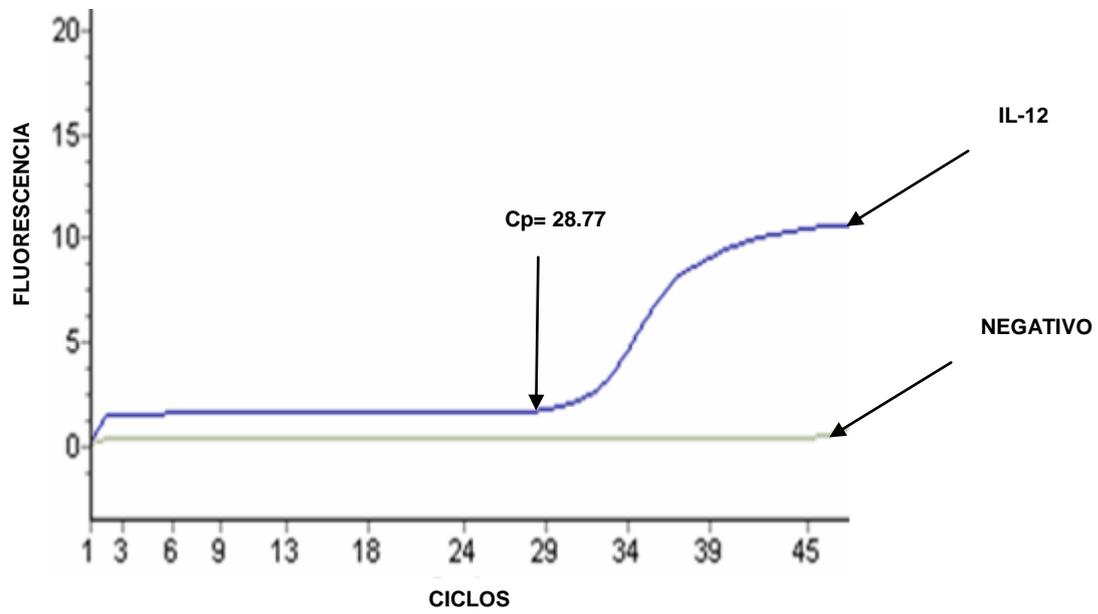


Fig. 26. Curva para IL-12 por PCR tiempo real.

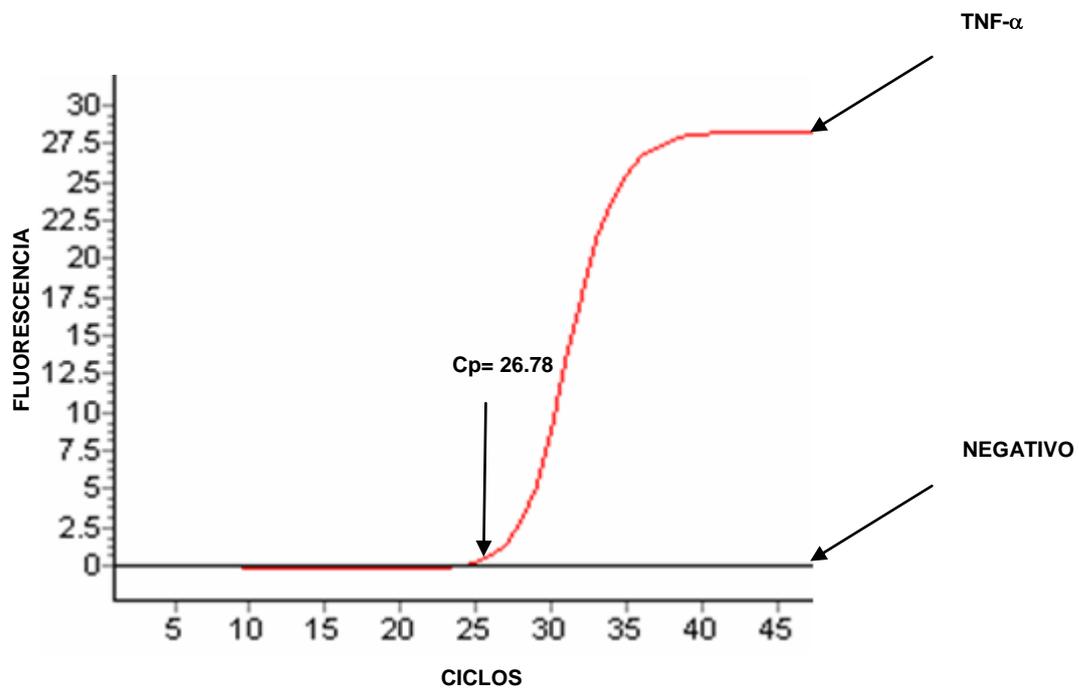


Fig. 27. Curva para TNF- α por PCR tiempo real.

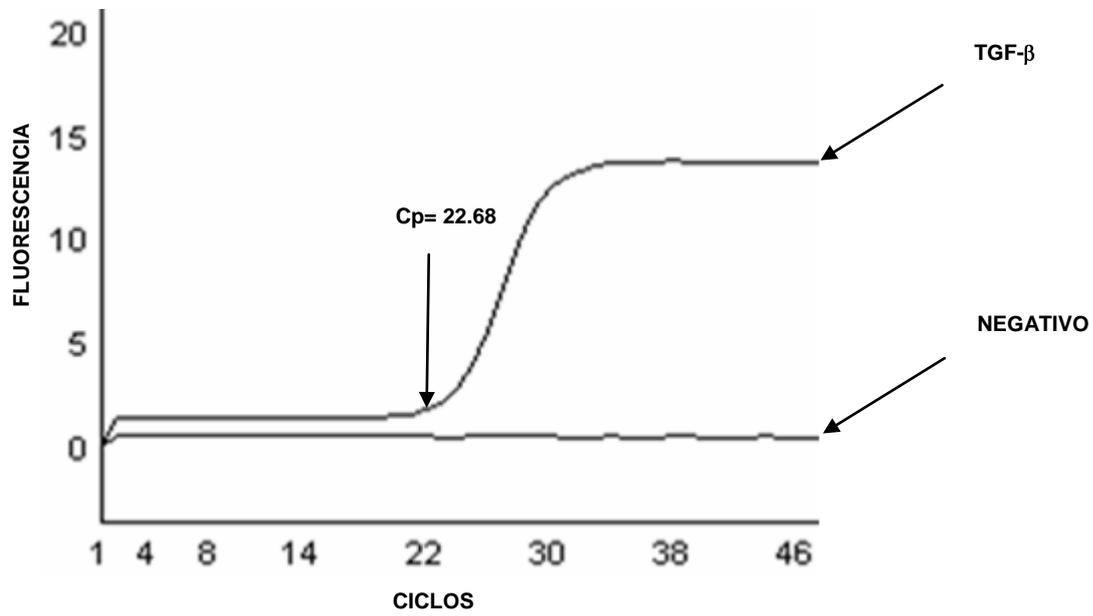


Fig. 28. Curva para TGF-β por PCR tiempo real.

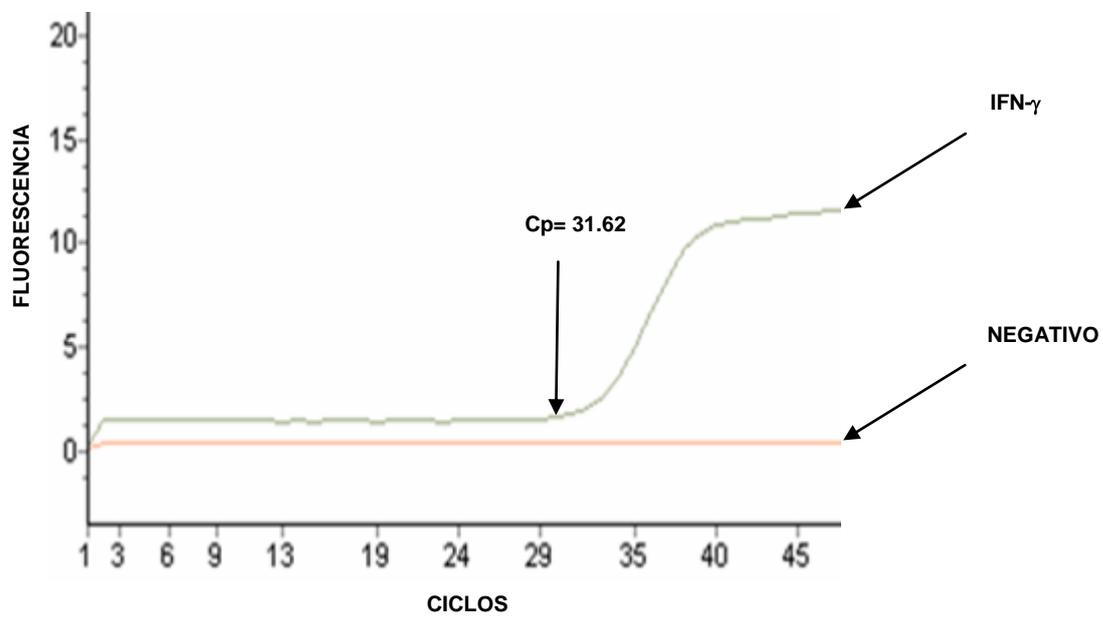


Fig. 29. Curva para IFN-γ por PCR tiempo real.

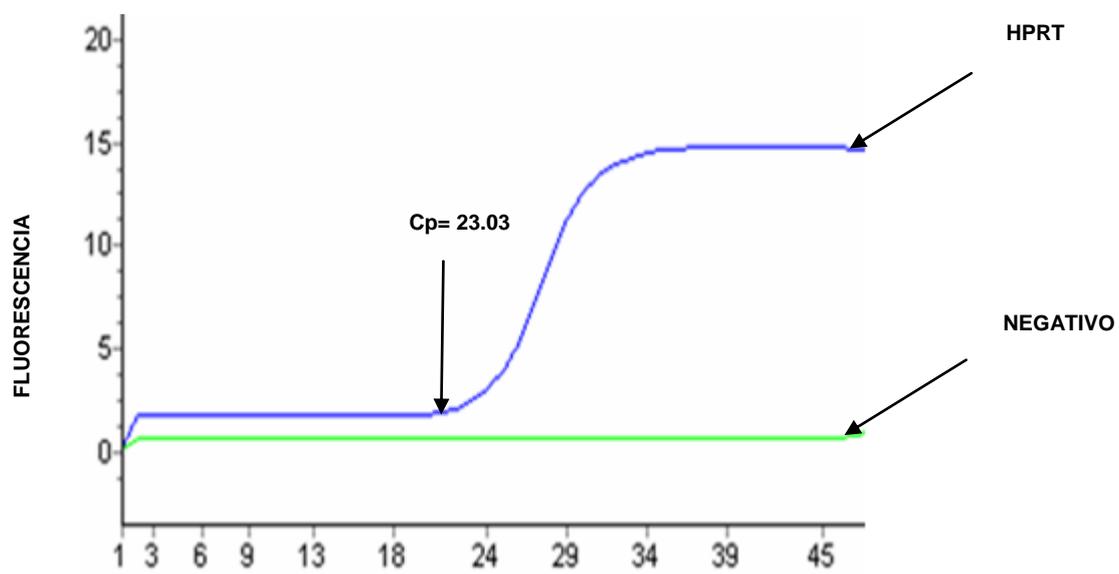


Fig. 30. Curva para HPRT por PCR Tiempo real.

Las gráficas 31-37 muestran las temperaturas de fusión T_m (Melting temperature por sus siglas en inglés) para los genes en estudio: IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β e IFN- γ , y HPRT (como gen constitutivo). En donde los productos de reacción específicos para cada uno de los genes antes mencionados están representados por un pico máximo de fluorescencia. No se observa la formación de dímeros representativo de amplificaciones inespecíficas o artefactos.

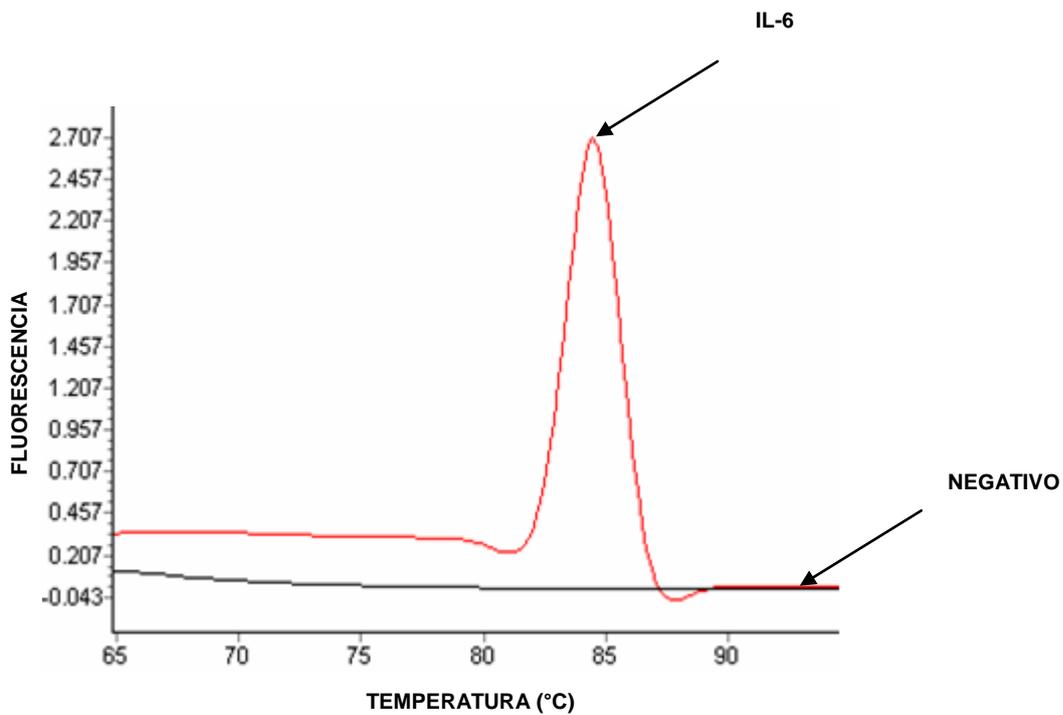


Fig. 31. Curva de fusión para IL-6 por PCR tiempo real.

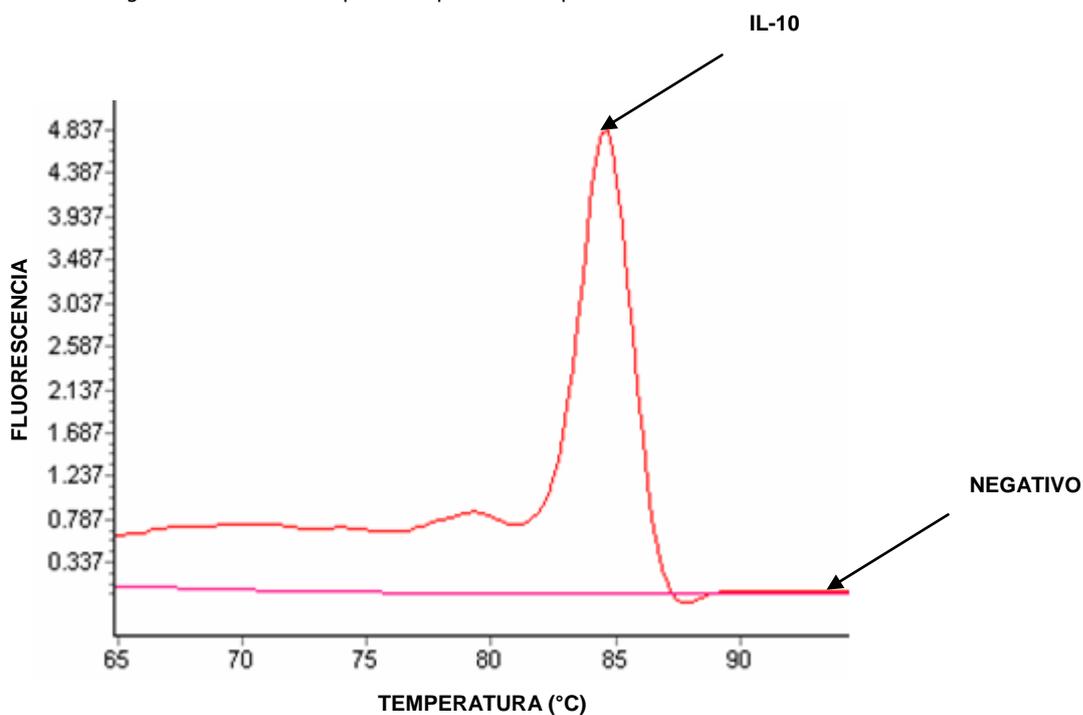
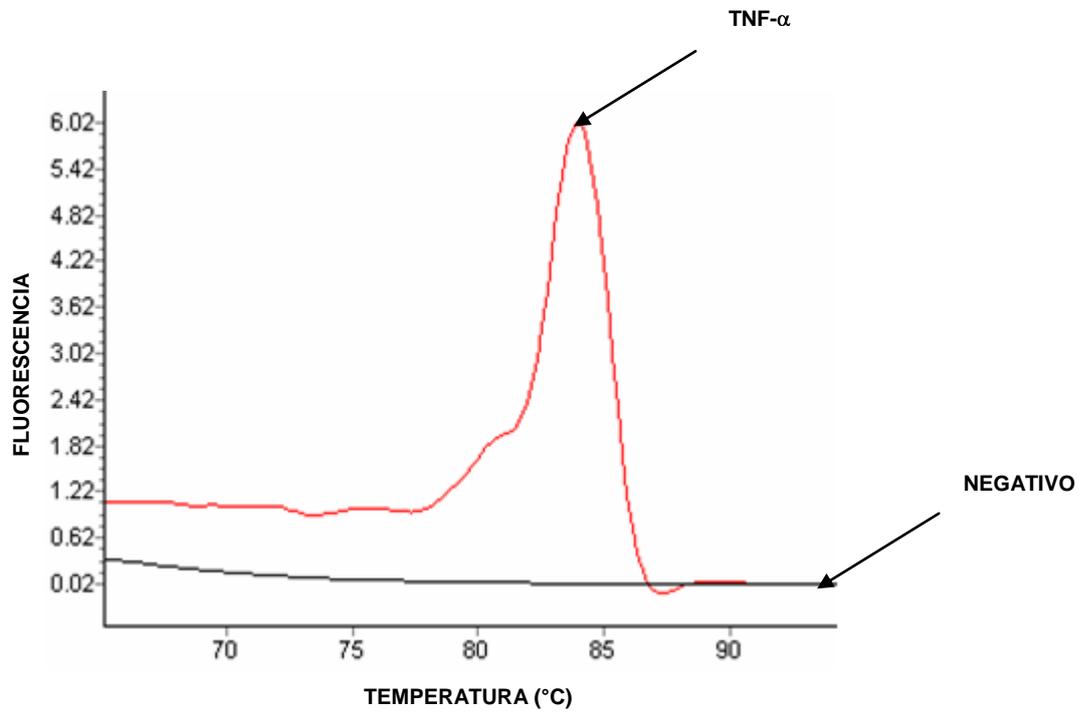
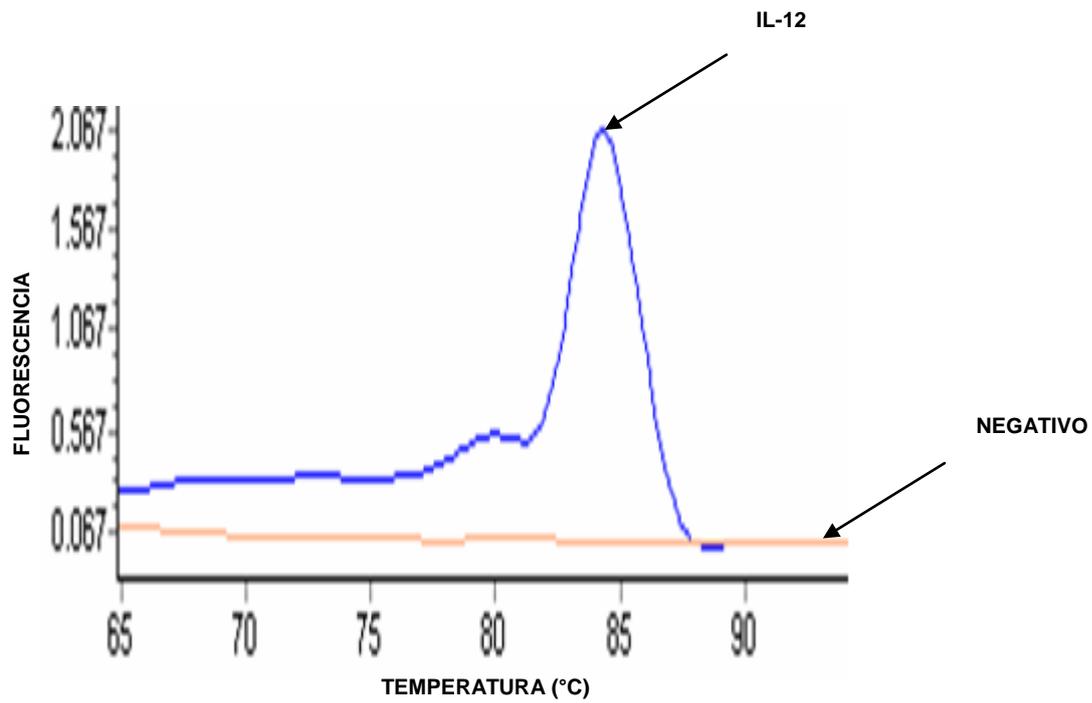
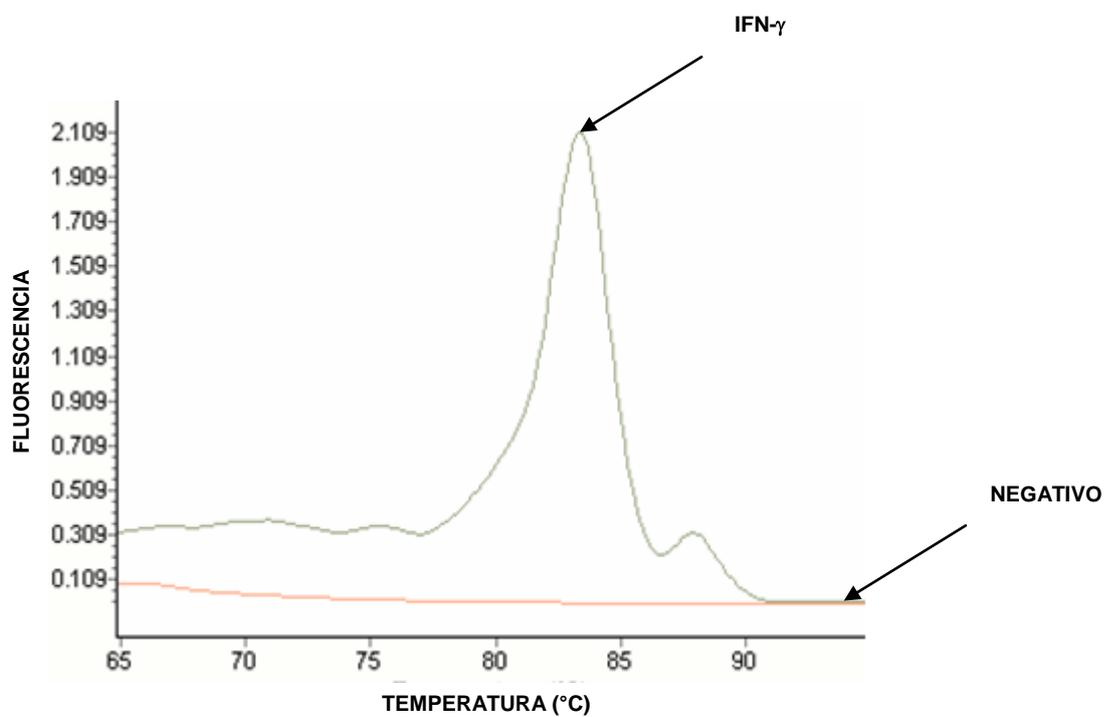
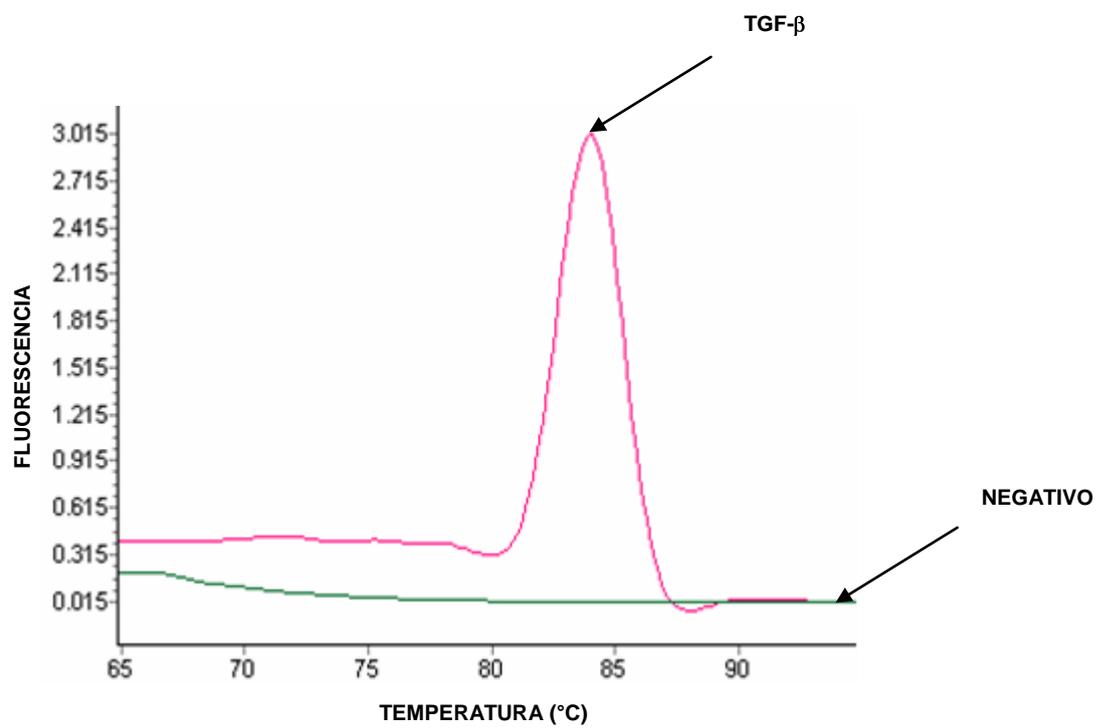


Fig. 32. Curva de fusión para IL-10 por PCR tiempo real.





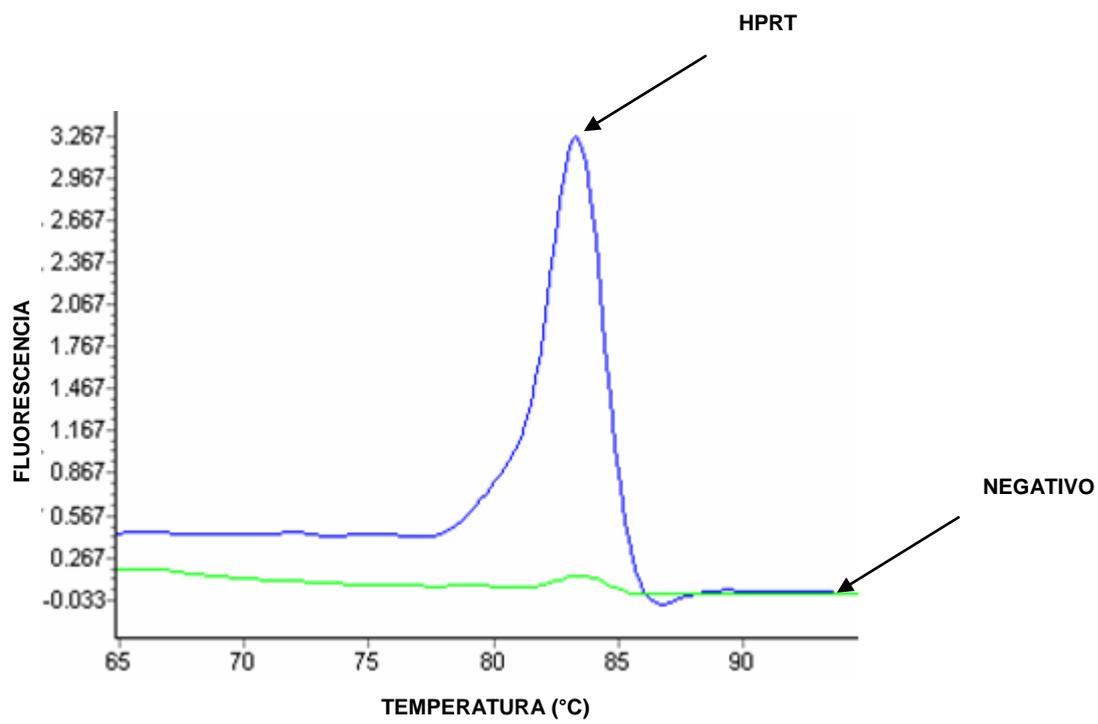
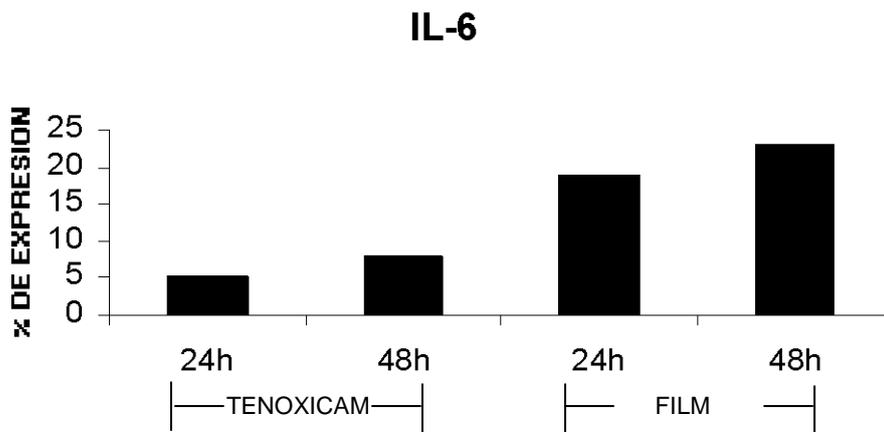


Fig. 37. Curva de fusión para HPRT por PCR tiempo real.

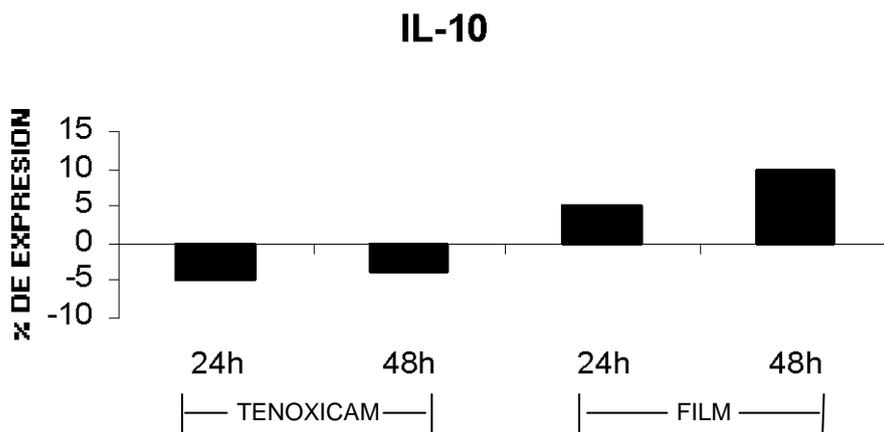
Datos obtenidos para cada uno de los genes amplificados (IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β e IFN- γ) por PCR tiempo real, medidos de muestras de tejido obtenido a 24 y 48 h después de una contusión o fractura (la inflamación que se produjo se trató inmediatamente con FILM o Tenoxicam) en tibias derechas de ratas Wistar.

El % de expresión se obtuvo de la razón: $\frac{\text{Fármaco (FILM o Tenox.)}}{\text{HPRT (house Keeping)}}$
 $\frac{\text{Control/HPRT (house Keeping)}}$

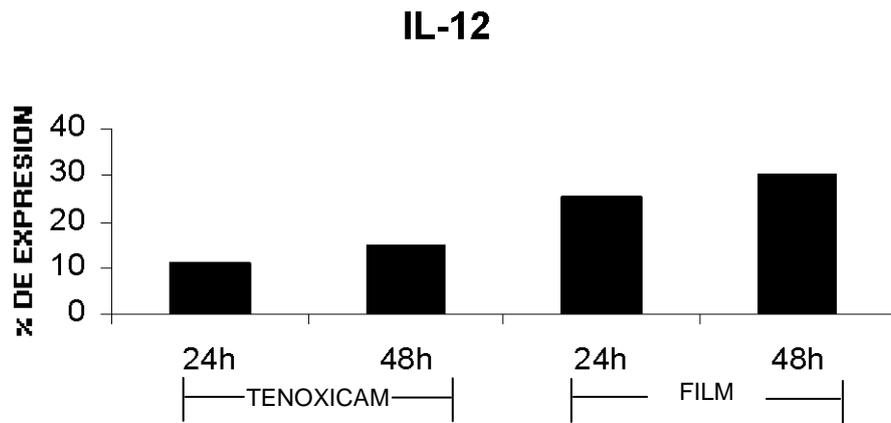
Contusión (gráficas 1-6)



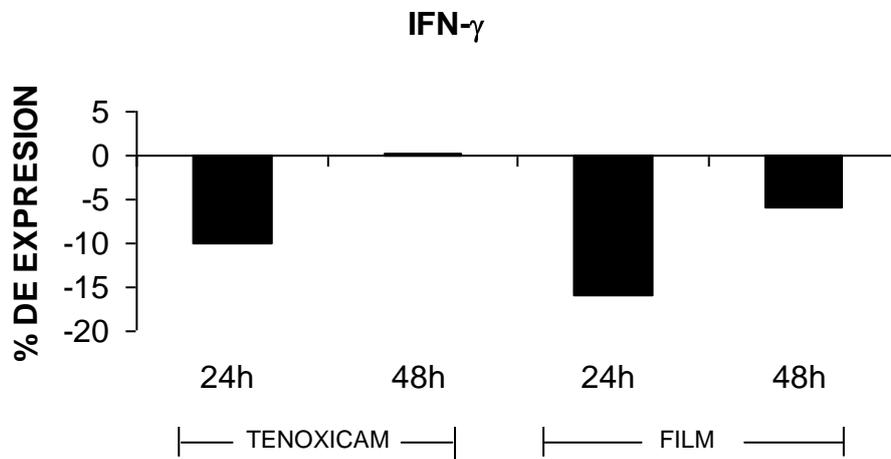
Gráfica 1. Expresión de IL-6 a 24 y 48 h de la contusión post-tratamiento con FILM y Tenoxicam.



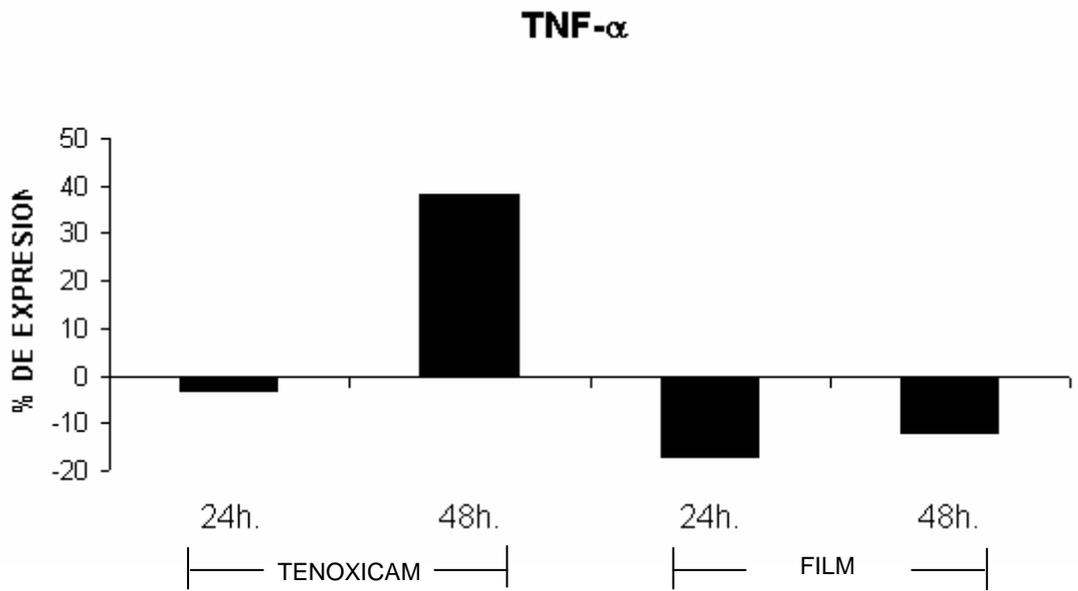
Gráfica 2. Expresión de IL-10 a 24 y 48 h de la contusión post-tratamiento con FILM y Tenoxicam.



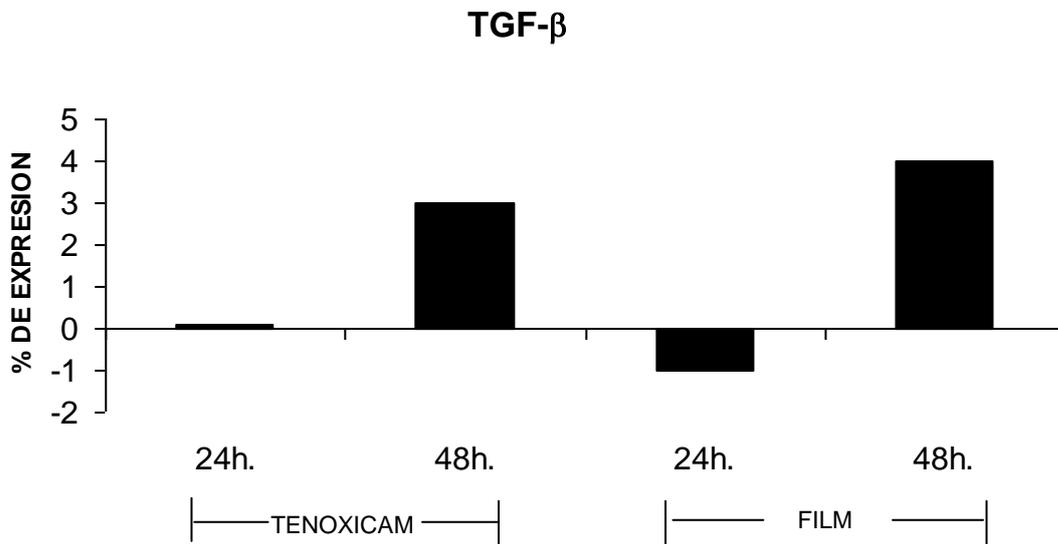
Gráfica 3. Expresión de IL-12 a 24 y 48 h de la contusión post-tratamiento con FILM y Tenoxicam.



Gráfica 4. Expresión de IFN- γ a 24 y 48 h de la contusión post-tratamiento con FILM y Tenoxicam.

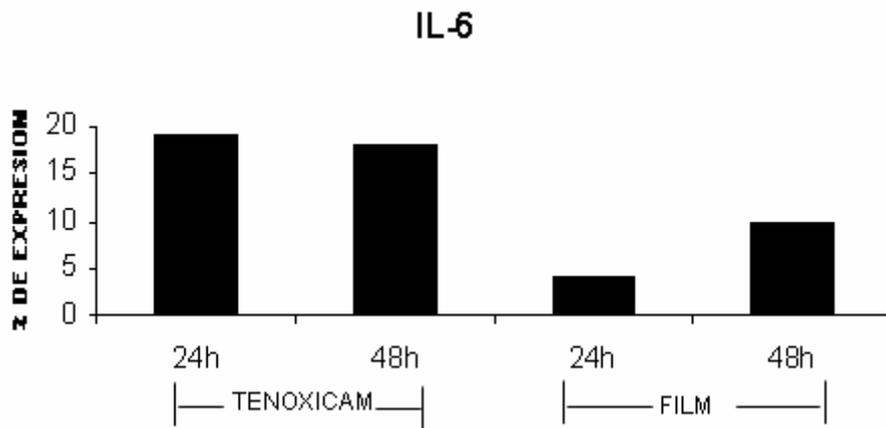


Gráfica 5. Expresión de TNF- α a 24 y 48 h de la contusión post-tratamiento con FILM y Tenoxicam.

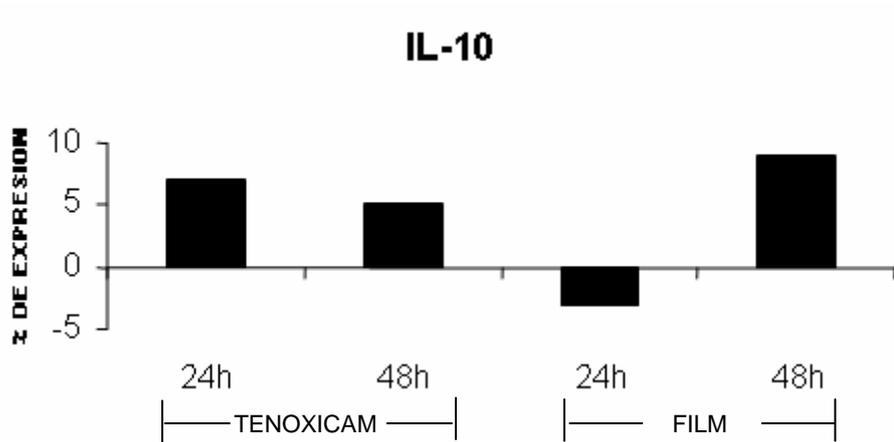


Gráfica 6. Expresión de TGF- β a 24 y 48 h de la contusión post-tratamiento con FILM y Tenoxicam.

Fractura (gráficas 7-12)

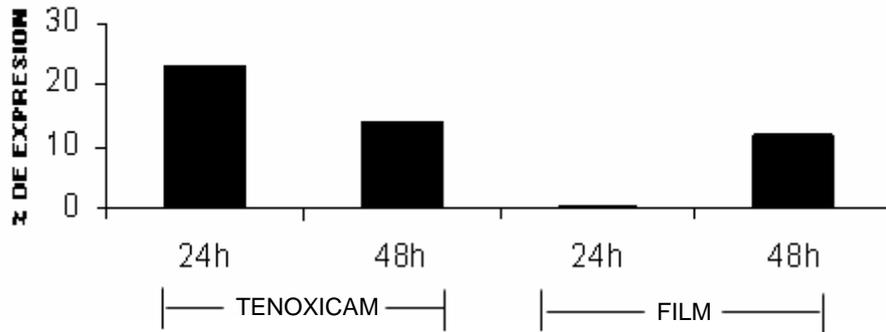


Gráfica. 7 Expresión de IL-6 a 24 y 48 h de la fractura post-tratamiento con FILM y Tenoxicam.



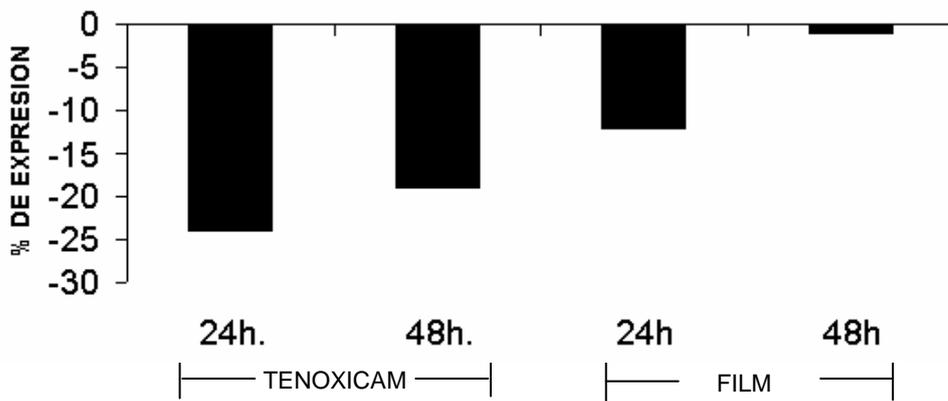
Gráfica. 8 Expresión de IL-10 a 24 y 48 h de la fractura post-tratamiento con FILM y Tenoxicam.

IL-12

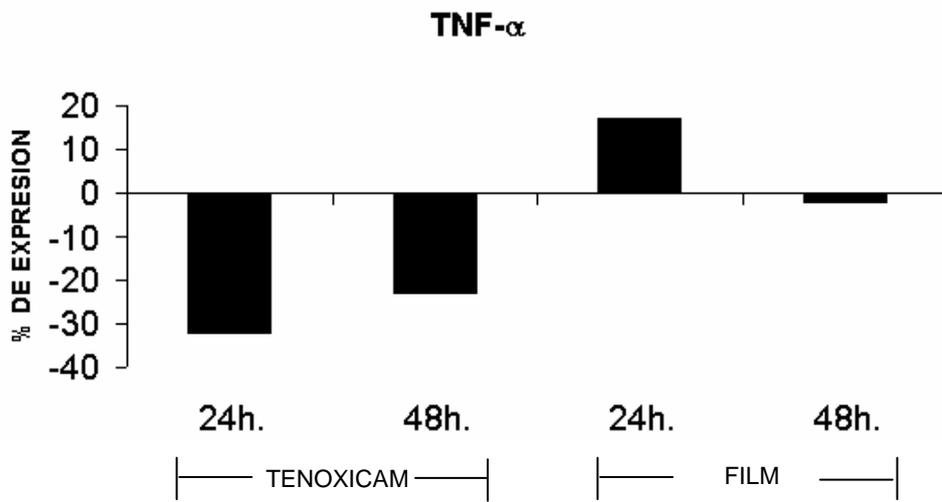


Gráfica. 9 Expresión de IL-12 a 24 y 48 h de la fractura post-tratamiento con FILM y Tenoxicam.

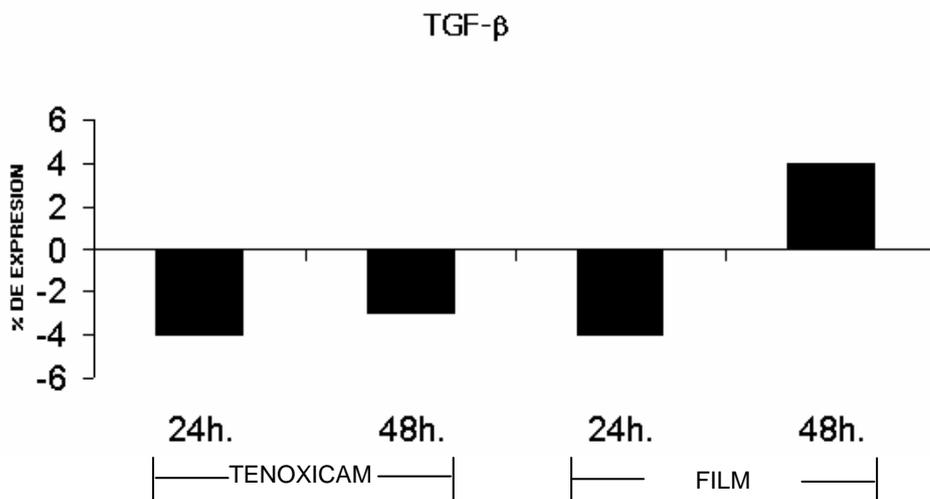
IFN- γ



Gráfica. 10 Expresión de IFN- γ a 24 y 48 h de la fractura post-tratamiento con FILM y Tenoxicam.



Gráfica. 11 Expresión de TNF- α a 24 y 48 h de la fractura post-tratamiento con FILM y Tenoxicam.



Gráfica. 12 Expresión de TGF- β a 24 y 48 h de la fractura post-tratamiento con FILM y Tenoxicam.

10. Discusión

El FILM posee diversos efectos anti-inflamatorios comprobados, *in vivo*, retrasa el arribo de leucocitos mononucleares en cámaras de Rebeck en la piel humana (66); en cobayos y gerbos, inhibe la hipersensibilidad retardada cutánea por contacto al DNCB (75), abate la expresión de moléculas de adhesión VLA-4 en monocitos y VCAM en el endotelio vascular (76).

Mientras que *in vitro* cancela la explosión respiratoria medida por quimioluminiscencia (ROI: H_2O_2 , O_2^- , OH^-) y la producción de óxido nítrico (RNI:NO) en monocitos y neutrófilos humanos, todo ello sin afectar la viabilidad celular entre otros efectos comprobados (77, 78), todo de una manera selectiva celular.

Este trabajo contribuye a conocer mejor el mecanismo de acción biológico del factor *in vivo*, mediante el análisis del efecto del FILM sobre la expresión de citocinas pro y anti-inflamatorias en un modelo de lesión (contusión o fractura) controlada.

Los resultados arrojaron que en los aspectos microscópicos, la lesión al tejido que se produce después de una contusión o de una fractura ocasiona ruptura de los vasos sanguíneos así como extravasación de los constituyentes de la sangre. El coágulo sanguíneo reestablece la homeostasis y proporciona una matriz extracelular provisional para la migración celular. Entre los constituyentes de la sangre liberados después de la lesión se encuentran las plaquetas que no solo facilitan la formación del tapón homeostático sino que también secretan varios mediadores para la curación de la herida tales como el PDGF, que atrae y activa macrófagos y fibroblastos (células que se ven generosamente afectadas por el FILM en procesos *in vitro*) (87-89). Las plaquetas liberan TGF- β al ambiente local. TGF- β se sintetiza y libera por los monocitos/macrófagos activados, linfocitos, neutrófilos, y fibroblastos; además se autoinduce, reclutando células adicionales y amplificando la cascada de citocinas (39), es una molécula inmunoreguladora que surge de manera natural, promueve el proceso inflamatorio manteniendo, la adhesión, reclutamiento y activación de las células no activadas, pero además

contribuye en la fase de resolución de la respuesta inflamatoria. Esto indica que TGF- β es una molécula pleiotrópica que actúa sobre distintas células desencadenando una respuesta inflamatoria o inhibiéndola como en el caso de la contusión tratada con FILM y Tenoxicam en donde TGF- β está disminuida a 24h y aumentada a 48h comportándose al inicio como una citocina pro-inflamatoria, y a las 48h como anti-inflamatoria creando un balance en el organismo, para que no se produzca un proceso inflamatorio descontrolado. No dudamos que otras moléculas pertenecientes a la familia de TGF- β se encuentren disminuidas, ya que en estudios de expresión *in vitro*, una gran variedad de genes para moléculas pertenecientes a la familia de TGF- β están subexpresados (TGF- β RII, BMPR-R1A, BMP-7, TrfGF β -RIII) (89). Posiblemente TGF- β está involucrada en distintos momentos durante el proceso inflamatorio, y es producida por varios tipos de células incluso se autorregula y así la podemos encontrar aumentada en nuestro sistema.

El traumatismo ya sea una contusión o una fractura además de lesionar los vasos sanguíneos produce más de 200 mediadores que pueden clasificarse en: a) hormonales (catecolaminas, glucocorticoides, etc.), b) peptídicos (interleucinas IL-1, IL-13, TNF, interferones, etc.) y c) lipídicos (leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanos, entre otros) (90-93). Algunos investigadores plantean que se activa primero el TNF, otros consideran que el detonador es la IL-1. A pesar de la importancia de TNF- α , se ha observado que su liberación es pulsátil, con picos de amplitud variable separados por varias horas, se ha encontrado que en algunos pacientes es detectado durante cuatro-seis días y en otros resulta indetectable (94). En algunos estudios realizados en la Universidad de Pensilvania se encontró que TNF- α no sólo es crítico para la iniciación de la respuesta inflamatoria (quizás esto suceda en la contusión tratada con FILM, en donde el TNF α , se encuentra disminuido), sino también para su disminución y resolución tanto *in vitro* como *in vivo*, además de que este comportamiento puede ser vía IL-10 dependiente o independiente en donde TNF- α provoca disminución de IFN- γ , el que a su vez no induce la producción de las proteínas inflamatorias de macrófagos MIP-1 α y MIP-1 β pero si potencializa la producción de IL-12 y se presenta un efecto de tipo anti-inflamatorio (95). Este mismo comportamiento se presenta después de la fractura tratada con FILM en donde

disminuye IFN- γ y aumenta TNF- α e IL-12. En estudios previos *in vitro* se ha observado que el FILM disminuye el transcrito de MIP-1 α y MIP-1 β y disminuye la expresión del gen para IL-12, MIP-1 α y MIP-1 β entre otras citocinas (96,88, 89).

Otra citocina detectada al inicio de la respuesta inflamatoria es IL-6, que en conjunto con IL-1 y TNF- α pueden ser liberadas coordinadamente a partir de monocitos activados. IL-6, IL-1 y TNF- α están más relacionados en el sentido de que uno puede inducir la producción del otro: IL-1 ó TNF- α inducen a IL-6, TNF- α puede inducir a IL-1, e IL-1 puede autoinducirse. Sin embargo IL-6 no induce a IL-1 ó TNF- α por el contrario suprime su producción por los macrófagos (97), hecho, que quizás suceda en la contusión tratada con FILM en donde TNF- α se encuentra disminuida e IL-6 aumentada, lo que podría provocar una respuesta anti-inflamatoria. IL-6 es el principal estimulador de la producción de muchas proteínas de fase aguda (19), pero también posee propiedades anti-inflamatorias como lo demostraron Xing y colaboradores (20) quienes al utilizar un ratón knockout para IL-6, identificaron un componente anti-inflamatorio en relación a la acción de IL-6 en respuestas inflamatorias agudas provocadas por exposición del pulmón a toxinas de manera local o sistémica. Con esto se demostró que IL-6 es relevante en el control de la extensión de las respuestas inflamatorias agudas, particularmente del nivel de citocinas pro-inflamatorias en compartimentos locales y sistémicos. *in vitro* la IL-6 induce por sí sola la síntesis hepática en reactantes de fase aguda, pero *in vivo* necesita la participación de los glucocorticoides (98). Lo cual nos llevaría a investigar que cantidad de glucocorticoides se producen en las lesiones provocadas en nuestro sistema y de esta manera determinar si el papel que desempeñó IL-6 en este trabajo fue pro-inflamatorio o anti-inflamatorio.

IL-12 es otra citocina con propiedades proinflamatorias, entre las funciones que realiza esta citocina están el aumento de las células T citotóxicas, la generación y la activación celular de LAK, el aumento en la citotoxicidad natural de las células NK, la inducción de células T activadas, la proliferación de células NK, además induce la producción de IFN- γ por medio de células NK y de células T (23-25). Esta citocina tiene la propiedad de estimular la respuesta Th1, sin embargo en la piel atópica (con producción excesiva de IL-4 e IL-10) a pesar de existir

una producción normal de la misma es incapaz de incrementar la actividad Th1 (99). Tanto en la fractura a 48h como en la contusión a 24 y 48h tratada con FILM y Tenoxicam en este trabajo IL-12 está aumentada y probablemente tampoco este aumentando la actividad Th1.

Como ya se mencionó entre los múltiples mediadores que se producen después de un traumatismo se encuentran los interferones, en el presente trabajo se midió el nivel de expresión de IFN- γ porque su detección es constante en los cuadros inflamatorios crónicos. El IFN- γ muestra un pico fugaz en el SIRS de origen séptico, fácilmente detectado en los sujetos previamente sensibilizados a una endotoxina. En estos sujetos se detectan los interferones α , β y γ , la tasa de IFN- γ es la más confiable (44). En nuestro sistema encontramos que tanto en la contusión como en la fractura tratada con FILM ó Tenoxicam el porcentaje de expresión de IFN- γ está disminuido, lo cual es muy alentador conociendo que IFN- γ aumenta la expresión de TNF- α y de IL-1 β . IL-1 β aumenta el flujo sanguíneo, probablemente vía PGE₂ y óxido nítrico. El aumento del flujo sanguíneo, la inducción de quimioattractantes, el aumento en las moléculas de adhesión entre ellas y E selectina, llevan a la acumulación de células inflamatorias como los macrófagos y los neutrófilos al sitio de inflamación. Entre los inhibidores de IL-1 se encuentran los corticosteroides, IL-4 e IL-10 (100-102).

IFN- γ es liberado por las células Th1, las cuales son pro-inflamatorias y la producción de IFN- γ puede ser modulada por IL-12 y las células presentadoras de antígenos (103). IFN- γ actúa de manera sinérgica con TNF- α el cual ejerce efectos sobre las células endoteliales y fagocitos mononucleares que llevan a la inflamación.

El organismo se defiende de las agresiones, creando una respuesta protectora, suprimiendo la actividad de las citocinas pro-inflamatorias mediante la liberación de citocinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-10 y TGF- β , y la aplicación del anti-inflamatorio (FILM) potencializa esta respuesta de manera favorable para evitar daño al tejido. La IL-10 suprime la producción de la IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, MIP-1 α , e IFN- γ , sobre regula la activación de RANTES, LIF y sobre ella misma; además disminuye la síntesis de NO de los macrófagos. En este trabajo IL-10 se encontró elevada en la contusión tratada con

FILM, no así en la fractura tratada con FILM a las 24 h, probablemente por que la lesión es mayor, pero a las 48 h si debido a la regulación que genera el organismo para evitar ser lesionado, en los contextos anteriormente mencionados, cabe resaltar, que el FILM tiene diversos efectos demostrados *in vitro* sobre la expresión o producción de moléculas de la familia de TNF, moléculas de adhesión, quimiocinas, ON, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 IFN- γ , entre otras (88,89).

Los resultados obtenidos en trabajos previos realizados *in vitro* han sido en ambientes controlados. Los resultados del presente trabajo se han obtenido *in vivo* por lo que se encuentran involucrados múltiples factores en la respuesta de las citocinas para comportarse como pro o anti-inflamatorias, además de que *in vivo* se da una situación enormemente compleja y dinámica.

Aunque los efectos de varias citocinas han sido bien caracterizados, cada vez se hace más evidente que la mezcla de citocinas encontradas en la matriz extracelular proporciona señales combinatorias importantes que influyen sobre el comportamiento celular. En un estudio realizado se examinó como los leucocitos integran señales de diferentes combinaciones de citocinas que se encuentran ya sea simultáneamente o secuencialmente dentro de la ECM, para alterar dinámicamente sus actividades migratorias, donde el TNF- α puede inducir la producción de metaloproteinasas de la matriz (MMPs) (89), enzimas degradativas mayormente reguladas por los leucocitos, que facilitan la extravasación y penetración de los leucocitos dentro de los tejidos durante los episodios de inflamación (en estudios anteriores se ha observado que el FILM modifica la expresión de algunas metaloproteinasas), mientras que en conjunto con TGF- β inhibe su inducción, estos hallazgos indicaron como una citocina como TNF α puede transmitir diversas señales a diferentes grupos de leucocitos dependiendo de su combinación con otras citocinas y su concentración (104). De acuerdo con esto último en este trabajo se tendría que determinar de que manera se combinaron las citocinas así como su concentración para determinar si aquellas que son pleiotrópicas se inclinan más hacia un comportamiento de tipo inflamatorio o anti-inflamatorio.

11. Conclusiones

- ✓ El FILM aumenta la expresión de las citocinas anti-inflamatorias y disminuye la expresión de las pro-inflamatorias.

- ✓ El tratamiento con FILM que se administró para tratar la inflamación que se produjo después de una contusión proporcionó el perfil de citocinas esperado (aumento en la expresión de IL-6, IL-10, e IL-12 y disminución de la expresión de IFN- γ , TNF- α , y TGF- β), lo cual hasta este momento representa un comportamiento anti-inflamatorio.

- ✓ En la inflamación tratada con FILM después de una fractura se obtuvo aumento en la expresión de IL-6, IL-12 y TNF- α y disminución en la expresión de IFN- γ , TGF- β , e IL-10, en donde la disminución de IL-10 podría deberse a que la dosis administrada no fue suficiente ya que la fractura es un traumatismo de mayor grado.

- ✓ El FILM comparado con el tenoxicam en el modelo de contusión aumenta la expresión de IL-10 principal citocina anti-inflamatoria; y en el modelo de fractura se comportan de manera similar.

12. Glosario

Ácido hialurónico. Es un polisacárido del tipo de glucosaminoglucanos con enlaces β , que presenta función estructural, como los sulfatos de condroitina. De textura viscosa, existe en la sinovia, humor vítreo y tejido conjuntivo colágeno de numerosos organismos y es una importante glucoproteína en la homeostasis articular. En seres humanos destaca su concentración en las articulaciones, los cartílagos y la piel.

Anti-inflamatorio. Medicamentos que reducen los síntomas y los signos de la inflamación como enrojecimiento, calor, aumento del flujo sanguíneo y dolor.

Basófilo. Granulocito caracterizado por gránulos específicos metacromáticos que contienen heparina e histamina; posee receptores Fc de alta afinidad para IgE y al activarse libera el contenido de sus gránulos mediante la unión al antígeno y la unión cruzada a IgE.

Célula cebada. Participa en la inflamación y en reacciones alérgicas. Su principal función es producir y almacenar mediadores químicos del proceso inflamatorio como la histamina.

CD4. Glicoproteína de superficie celular, usualmente en las células T cooperadoras, que reconocen moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (CMH II) en células presentadoras de antígenos.

Células endoteliales. Es un tipo de célula aplanada que recubre el interior de los vasos sanguíneos y sobre todo de los capilares, formando parte de su pared.

Cininas. Son proteínas en la sangre que afectan ciertas contracciones musculares y la presión arterial. Incrementan el flujo sanguíneo en todo el cuerpo, facilitan el paso de los líquidos a través de pequeños capilares, además estimulan los receptores del dolor.

Citocinas. Son proteínas de bajo peso molecular (generalmente $<20,000$ kDa) que son producidas por los leucocitos y otros tipos celulares.

Colágeno (a). Es una molécula proteica que forma fibras, las fibras colágenas. Estas se encuentran en todos los organismos pluricelulares. Son secretadas por las células del tejido conjuntivo como los fibroblastos, así como por otros tipos celulares. Es el componente más abundante de la piel y de los huesos, cubriendo un 25% de la masa total de proteínas en los mamíferos.

Complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH II). Una región genética de las especies de vertebrados que codifica para moléculas de superficie celular necesarias para la presentación a los linfocitos T; y responsable para el rechazo inmediato a injertos entre individuos. Las moléculas del CMH son reconocidas por las células T CD8⁺; las moléculas del CMH clase II las reconocen las células T CD4⁺.

Contusión. Es un tipo de lesión generalmente causado por un fuerte impacto, en el cual los capilares son lesionados, permitiendo a la sangre infiltrarse dentro de los tejidos.

Cultivo axénico. Cultivo de una sola especie no contaminado ni asociado con algún otro organismo viviente.

Elastina. Es una proteína estructural que forma parte de la matriz celular, como la piel. Son fibras delgadas, largas y ramificadas, que se agrupan formando haces. El principal componente de esta fibra es elastina, la cual es una proteína rica en prolina y glicina, y a diferencia del colágeno posee muy poca hidroxiprolina y nada de hidroxilisina. La gran elasticidad que presentan es que poseen aminoácidos poco comunes como desmosina e isodesmosina, la cual forma los enlaces cruzados, y le otorgan un grado de elasticidad, pudiendo estirarse hasta el 150% antes de romperse.

Eosinofilo. Una clase de granulocito, cuyos gránulos contienen proteínas catiónicas tóxicas. Pertenece a un grupo de leucocitos polimorfonucleares de distinta morfología y función; los gránulos secundarios se tiñen de naranja brillante con eosina debido a copiosas cantidades de la proteína básica mayor.

Exudado. Fluido extravascular (que contiene proteínas y detritos celulares) el cual se acumula durante la inflamación.

Factor inhibidor de Leucemia (LIF). Es un mediador de comunicación celular con amplio rango de actividades biológicas que incluyen diferenciación celular, crecimiento y proliferación celular, trofismo celular y efecto anti-apoptótico protección celular de diferentes tipos de células y tejidos, regulación del metabolismo energético y óseo, desarrollo neural, embriogénesis, reparación y remodelación tisular, modulación de la inflamación. Debido a sus actividades pleiotrópicas, es central en los eventos patológicos, relacionados a muchos desordenes.

Factor inhibidor de la locomoción de los monolitos (FILM). Pentapéptido constituido por los aminoácidos Met-Gln-Cis-Asn-Ser, de 581 Da que posee diversos efectos anti-inflamatorios comprobados, *in vivo*, retrasa el arribo de leucocitos mononucleares en cámaras de Rebeck en la piel humana; en cobayos y gerbos, inhibe la hipersensibilidad retardada cutánea por contacto al DNCB, abate la expresión de moléculas de adhesión VLA-4 en monocitos y VCAM en el endotelio vascular. *In vitro* cancela la explosión respiratoria medida por quimioluminiscencia (ROI: H_2O_2 , O_2^- , OH^-) y la producción de óxido nítrico (RNI:NO) en monocitos y neutrófilos humanos, todo ello sin afectar la viabilidad celular entre otros efectos comprobados, todo de una manera selectiva celular.

Factor Nuclear κB (NF- κB). Es un complejo de proteínico que es un factor de transcripción. NF- κB se encuentra en casi todos los tipos de células animales y está involucrado en respuestas celulares a estímulos tales como estrés, citocinas, radicales libres, radiación ultravioleta, lípidos de alta densidad oxidados, y antígenos virales o bacterianos. NF- κB tiene un papel clave en la regulación de la respuesta inmune a la infección. Conforme a esta acción la regulación incorrecta de NF- κB se ha relacionado a cáncer, enfermedades autoinmunes e inflamatorias, shock séptico, infección viral, y desarrollo inmune inadecuado.

Fibroblasto. Es la célula más común del tejido conjuntivo y la responsable de la formación de fibras y de la matriz extracelular.

Fibronectina. Glicoproteína presente en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos celulares animales compuesta por dos subunidades muy largas. La fibronectina plasmática parece incrementar la coagulación de la sangre, la cicatrización y la fagocitosis. Otros tipos de fibronectina se organizan en la superficie celular depositándose en la matriz extracelular como fibrillas de fibronectina muy insolubles.

Fractura. Es la interrupción de la continuidad estructural del hueso. Si la piel que la cubre se encuentra intacta, se trata de una fractura cerrada (o simple); si por el contrario, la piel o una cavidad corporal tienen una solución de continuidad, se denomina fractura abierta (o complicada), expuesta a contaminación e infección.

Inmunidad natural (innata). Son las barreras que no permiten la entrada de materiales nocivos al cuerpo formando así la primera línea de defensa de la respuesta inmune. Participa

una gran variedad de células que actúan de una manera rápida, pues no necesitan aprendizaje previo, son los macrófagos, polimorfonucleares y células asesinas naturales principalmente.

Leucocitos. Son un conjunto heterogéneo de células sanguíneas que son los efectores celulares de la respuesta inmune, así intervienen en la defensa del organismo contra sustancias extrañas o agentes infecciosos (antígenos). Se originan en la médula ósea y en el tejido linfático.

Linfocito. Célula que regula las respuestas inmunes antígeno-específicas; posee núcleo en forma de riñón que se tiñe de azul con los colorantes Giemsa y Wright; el núcleo se encuentra rodeado por el citoplasma; se encuentran dentro de este grupo las células B,T, y las células asesinas naturales.

Macrófago. Célula mielóide derivada del monocito, que se encuentra dentro de los tejidos; activo en la fagocitosis, en la presentación y procesamiento del antígeno, liberación de citocinas inflamatorias y en la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos.

Microtúbulos. Son estructuras tubulares de 25 nm de diámetro exterior y 12 nm de diámetro interior, con longitudes que varían entre unos pocos nanómetros a micrómetros. Intervienen en diversos procesos celulares que involucran desplazamiento de vesículas de secreción, movimiento de orgánulos, transporte intracelular de sustancias, así como en la división celular (mitosis y meiosis) y junto con los microfilamentos y filamentos intermedios, forman el citoesqueleto.

Molécula de adhesión. Miembro de una de muchas familias de proteínas que se encuentra en la superficie celular que promueve la unión intercelular o la agregación.

Monocito. Fagocito mononuclear que se encuentra en la sangre, es el precursor de los macrófagos de tejido.

Proteínas de fase aguda. Proteínas de suero, producidas en su mayoría en el hígado, las cuales cambian rápidamente en concentración (algunas aumentan, algunas disminuyen) durante el inicio de la respuesta inflamatoria.

Proteínas Plasmáticas. Se encuentran disueltas dentro del plasma sanguíneo, mantienen el volumen plasmático, funcionan regulando el pH sanguíneo, contribuyen mínimamente con la

resistencia vascular periférica y la presión arterial; además de intervenir en el equilibrio electroquímico de concentración de iones.

Se encuentran distribuidas de la siguiente manera: Fibrinógeno 7%, inmunoglobulinas 38% y 54% albúminas.

Pro-inflamatorio. Medicamentos o sustancias involucradas en incrementar el proceso inflamatorio mediante la liberación de ciertas citocinas, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, etc.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es una técnica de biología molecular utilizada para aislar y amplificar exponencialmente un fragmento o secuencia de interés del DNA, vía replicación enzimática sin usar un organismo vivo (como *Escherichia coli*. o una levadura). Debido a que la PCR es una técnica *in vitro*, puede modificarse para realizar una amplia variedad de manipulaciones genéticas. Un ciclo de PCR consta de tres etapas: 1) Desnaturalización (separación de la hebra), 2) Alineación (hibridación de los cebadores) y 3) Extensión (síntesis de DNA).

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). Es una técnica de biología molecular, mediante la cual se pueden amplificar en un proceso cíclico las secuencias específicas de ácidos nucleicos presentes en una muestra compleja y generar una gran cantidad de copias idénticas que pueden ser analizadas. A diferencia del PCR, el RT-PCR la cantidad del producto formado es detectado durante todo el curso de la reacción mediante el monitoreo de la fluorescencia de colorantes (SYBR Green I dye) o de sondas (Minor groove binder DNA probes, Taq Man probes, Molecular beacons probes, Scorpions probes).

Trombina. Es una enzima glucoproteínica. No es parte de la sangre, si no que se forma como parte del proceso de coagulación sanguínea. Ayuda a la degradación del fibrinógeno a monómeros de fibrina.

ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidónico

AHA: Absceso hepático amibiano

CLMF: Factor de maduración de linfocitos citotóxicos

COX: Cicloxigenasa

CSF-1: Factor estimulante de colonias-1

DNCB: 1-cloro-2-4-dinitrobenceno

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

FILM: Factor inhibidor de la locomoción de los monocitos

FM: Fagocitos mononucleares

G-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos

GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos

HLA: Complejo mayor de histocompatibilidad (human leukocyte antigen)

IFN- γ : Interferón gama

IL: Interleucina

iNOS: Sintasa inductora de óxido nítrico

LAK: Asesino activado de linfocinas

LIF: Factor inhibidor de leucemia

MAF: Factor activador de macrófagos

M-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos

MIP-1 α : Proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos

NF- κ B: Factor nuclear κ B

NK: Células asesinas naturales

ON: Óxido nítrico

PAF: Factor activador de plaquetas

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PG: Prostaglandina

PMN: Polimorfonucleares

RANTES: Células T expresadas y secretadas

SIRS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

T_H: Células T cooperadoras

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa

TX: Tromboxano

VCAM: Molécula de adhesión celular vascular

VLA-4: Antígeno de integrina tardío 4

PERSPECTIVAS

La inflamación es un importante sector en el campo de la investigación farmacológica, por lo que el desarrollo de fármacos (en el presente trabajo el FILM) basados en la regulación de mediadores endógenos como lo son las citocinas podría representar una nueva estrategia en la terapia anti-inflamatoria.

Debido a que ha sido difícil administrar citocinas de manera directa debido a las reacciones poderosas que evocan estas moléculas cuando se administran sistémicamente.

Entre los medicamentos utilizados como anti-inflamatorios se encuentra el tenoxicam, cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de la producción de prostaglandinas vía COX-1 y COX-2, ya que la COX-1 preserva el mucus gástrico para proteger al estómago al ser inhibida por el Tenoxicam provoca lesiones como las úlceras.

El FILM al ser una molécula pequeña y con peso molecular bajo (que son las características del anti-inflamatorio ideal) es una buena opción para el desarrollo de nuevos fármacos anti-inflamatorios con menos reacciones adversas.

13. BIBLIOGRAFIA

1. Robbins S, Cotran R, Kumar V. Pathologic basis of disease. USA. 5th edition. WB: Saunders Company; 1994:51-92.
2. Brodt Pnina. Cell adhesion and invasion in cancer metastasis. USA. R.G. Landes Company; 1996:1-10.
3. Wilkinson PC. Assays of leukocyte locomotion and chemotaxis. J Immunol Methods. 1998;216:139-53.
4. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol. 1999;17:593-23.
5. Luscinskas FW, Gimbrone MA. Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leucocyte recruitment. Annu Rev Med. 1996;47:413-21.
6. Adams DH, Lloyd AR. Chemokines: leucocytes recruitment and activation cytokines. Lancet. 1997;349:490-95.
7. Carol A, Feghali Ph D, Timoty M, Wright MD. Cytokines in acute and chronic inflammation. Frontiers in Bioscience. 1997;2:12-26.
8. Goldsby Richard A. Kuby Immunology. 4THed. USA: W.H. Freeman and Company; 2000: 303, 306 y 308.
9. Shimada T, Terano A. Chemokine expression in *helicobacter pylori* infected gastric mucosa. J Gastroenterol. 1998;33:613 –17.
10. Ishihara S, Fukuda R, Fukumoto S. Cytokine gene expression in the gastric mucosa. J Gastroenterol. 1996;31:485–90.
11. Balkwill F R, F Burke. The cytokine network. Immunol Today. 1989;10:299-304.
12. Whiteside Theresa. Cytokines and Cytokine Measurements in a Clinical Laboratory Minireview. Clinical and Diagnostic Laboratory. 1994;1(3):257-60.
13. Wang PP, Wu MI, Siegel RW, Egan R, Billah MM. Interleukin (IL-10) inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. J Biol Chem. 1995;270:9558-63.

14. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med.* 2002;30:S58-63.
15. Marchand A, Deviere J, Byl B, De Groote D, Vincent JL, Goldman. Interleukin-10 production during septicemia. *Lancet.* 1994;343:707-08
16. Zhi Hong M, Kevin Dyer, Timothy R. Billiar, and David J. Tweardy. Essential role for IL-6 in postresuscitation inflammation in hemorrhagic shock. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280:C343-51.
17. Wand P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol.* 1994;153:822-26.
18. Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CGM, Cohen Tervaert JW. Leucocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Int Care Med.* 2000;26:883-92.
19. Hirano T, Akira S, Taga T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today.* 1990;11:443-49.
20. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest.* 1998;101:311-20.
21. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.* 2003;24:25-29.
22. Kenneth L Mattox, MD David V Feliciano, MD Ernest, E Moore. *Trauma. USA.* 4TH ed. Mc Graw-Hill; 2000:1372.
23. Gately MK, Wolitzky AG, Quinn PM, Chizzonite R. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunol.* 1992;143:127-42.
24. Kuniwa M, Gately M, Gubler U, Chizzonite R, Fargeas C, Delespesse G. Recombinant interleukin-12 suppresses the synthesis of immunoglobulin E by interleukin-4 stimulated human lymphocytes. *J Clin Invest.* 1992;90:262-66.

25. Scott P. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science*. 1993;260:496-97.
26. Trinchieri G. Interleukin-12: A Proinflammatory Cytokine with Immunoregulatory Functions that Bridge Innate Resistance and Antigen-Specific Adaptive Immunity. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:251-76.
27. Hodge-Dufour J, Noble PW, Horton MR, Bao C, Wisocka M, Burdick MD, Striter RM, Trinchieri G. Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion dependent priming of resident but not elicited macrophages. *Eur J Immunol*. 1997;159:2492-500.
28. D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, Paganin C, Trinchieri G. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med*. 1995;181:537-46.
29. Kubin M, Chow JM, Trinchieri G. Differential regulation of interleukin-12, tumor necrosis factor- α , and IL-1 β production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells. *Blood*. 1994;83:1847-55.
30. Cassatella MA, Meda L, Gasperini S, D'Andrea A, Ma X, Trinchieri G. Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol*. 1995;25:1-5.
31. Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing Th cells. *J Exp Med*. 1993;177:1199-204.
32. Ma X, Chow JM, Gri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF, Dizialo R, Trinchieri G. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med*. 1996;183:147-57.
33. Hayes MP, Wang J, Norcross. Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *MA Blood*. 1995;86:646-50.

34. Frazier-Jessen M, McCartney-Francis N, Wahl SM. Transforming growth factor- β : a cytokine paradigm. In: Handbook of Immune Modulating Agents. edited by Kresina T, Marcel Dekker. 1997;121-43.
35. Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF- β . Miner Electrolyte Metab. 1998;24:111-19.
36. Letterio JJ. Regulation of immune responses by TGF- β . Annu Rev Immunol. 1998;16:137-61
37. McCartney Francis NL, Wahl SM. Transforming growth factor β : a matter of life and death. J Leukoc Biol. 1994;55:401-09.
38. Wahl SM, Hunt DA, Wakefield L, McCartney Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor beta (TGF- β) induces monocyte chemotaxis and growth factor production. Proc Natl Acad Sci. 1987;84:5788-92.
39. Brandes ME, Wakefield LM, Wahl SM. Modulation of monocyte type I TGF- β receptors by inflammatory stimuli. J Biol Chem. 1991;266:19697-703.
40. M Henson Peter. Dampening inflammation. Nature Immunol. 2005;6(12):1179-81.
41. Jiahuai Han, Richard J Ulevitch. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. Nature Immunol. 2005;6(12):1198-205.
42. Billiau A. Interferon- γ : biology and role in patogénesis. Advances in Immunology. Dixon FJ. 1996;62:61-130.
43. Billiau A. Interferon- γ in autoimmunity. Cytokine and Growth Factor Reviews. 1996;7:25-34.
44. Van Deventer SJH. Tolerance and susceptibility to bacterial endotoxins. En: Kinney JM, Tucker HN eds. Organ Metabolism and Nutrition: Ideas for future Critical Care. USA: Raven Press; 1994:149-63.
45. Carroll MC, Katzman P, Alicot EM, Koller BH, Gerathy DE, Orr HT, Strominger JL, Spies T. Linkage map of human histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. Proc Natl Acad Sci. 1987;84:8535-39

46. Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goeddel DV, Harkins RN. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol Chem.* 1985;260:2345-54.
47. Smith RA, Baglioni C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem.* 1987;262:6951-55.
48. Hohmann HP, Remy R, Brockhaus M, van Loon APGM. Two different cell types have different major receptors for human necrosis factor (TNF alpha). *J Biol Chem.* 1989;264:14927-34.
49. Brockhaus M, Schoenfeld HJ, Schlaeger EJ, Hunziker W, Lesslauer W, Loetscher H. Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87:3127-31.
50. Pennica D, Kohr WJ, Fendly BM, Shire SJ, Raab HE, Borchardt PE. Characterization of a recombinant extracellular domain of the type I tumor necrosis factor receptor: evidence for tumor necrosis factor- α induced receptor aggregation. *Biochem.* 1992;31:1134-41.
51. Flier JS, Underhill LH. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med.* 1996;334:1717-25.
52. Lantz M, Gullberg U, Nilson E, Olsson I. Characterization *in vitro* of a human tumor necrosis factor-binding protein. A soluble binding form of tumor necrosis factor receptor. *J Clin Invest.* 1990;86:1396-402.
53. Kohno T, Brewer MT, Baker SL. A second tumor necrosis factor inhibitor. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87:8331-35.
54. Olsson I, Gatanaga T, Gullberg U, Lantz M, Granger GA. Tumor necrosis factor (TNF) binding proteins (soluble TNF receptor forms) with possible in inflammation and malignancy. *Eur Cytokine Netw.* 1993;4:169-80.
55. Van Deventer SJH. Tumor necrosis factor and Crohn's disease. *Gut.* 1997;40:443-48.
56. Eigler A, Sinha B, Hartman G, Endres S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today.* 1997;18:487-92.

57. Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. USA. 11th edition. McGraw Hill; 2006:673-74.
58. Velázquez PL, A Moreno, JC Leza. Farmacología Básica y Clínica. España. 17^a. edición. Médica Panamericana; 2005:514.
59. Andrew R Mckinney, Craig J Suann, Allen M Stenhouse. The detection of piroxicam, tenoxicam and their metabolites in equine urine by electrospray ionisation ion trap mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2004;18:2338-42.
60. Rodríguez Palomares Consuelo, Rodríguez Palomares Arturo, Servín Hernández David. Farmacología Clínica. México: McGraw Hill; 2005:284 y 285.
61. Uriarte Bonilla Victor, Trejo Flores Caso. Farmacología clínica. México: Trillas; 2003:85.
62. Romero Cabello, Raúl. Microbiología y Parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. México. México: Médica Panamericana; 2007: 1309,1324.
63. Pérez-Tamayo R, Becker Y, Montfort Y, Pérez-Montfort R. Pathobiology of amebiasis. En: Kretschmer RR, editor. Amebiasis: Infection and Disease by *Entamoeba histolytica*. Boca Raton, FL: CRC Press. 1988:124-57.
64. Pérez Tamayo R, Brandt H. Amebiasis En: Marcial Rojas (ed) Pathology of protozoan and helminthic disease. Baltimore. Williams and Wilkins; 1971:145-88.
65. Jervis HR, Takeuchi A. Amebic dysentery. Animal model: experimental *Entamoeba histolytica* infection in the germfree guinea pig. Am J Pathol. 1979;94:197-200.
66. Kretschmer R, Collado ML, Pacheco MG, Salinas MC, López-Osuna M, Leucona M, Castro EM, Arellano J. Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. Parasite Immunol. 1985;7:527-43.
67. Silva García R, Rico Rosillo G, Espinosa Cantellano M, Castañon G, Giménez Scherer J, Kretschmer R. *Entamoeba dispar* does not produce monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica*. Parasite Immunol. 2003;25:99-101.
68. Kretschmer RR, Rico RG, Giménez-Scherer J. A novel anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol. 2001;112:201-09.

69. Williams K, Semander S, Stone K, Saylor M, Rush J. Matrix assisted laser desorption mass spectrometry as a complement to internal protein sequencing. En: Walker J, editor. Protein Protocols Handbook. New York: Humana Press; 1996:541-51.
70. Giménez-Scherer JA, Pacheco Cano MG, Cruz de Lavin E, Hernández-Jauregui P, Merchant MT, Kretschmer RR. Ultrastructural changes associated with the inhibition of monocyte chemotaxis caused by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. Lab Invest. 1987;57:45-51
71. Aley SB, Scott WA, Cohn ZA. Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. J Exp Med. 1980;152:391-404.
72. Rico G, Ximenez C, Ramos F and Kretschmer RR. Production of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) by axenically grown *Entamoeba histolytica*: Synthesis or degradation? Arch Med Res. 1997;28:235-36.
73. Kretschmer RR, Castro E, Arellano J, Pacheco M. *In vitro* studies on the interaction of human monocytes and the monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica*. Arch Invest Med. 1986;11[Suppl]:243-46.
74. Kretschmer RR, Castro EM, Pacheco G, Rico G, Diaz Guerra, Arellano J. The role of mannose in the receptor of the monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica*. Parasitol Res. 1991;77:374-78.
75. Giménez-Scherer JA, Rico-Rosillo G, Fernández- Díez J, Kretschmer R. Inhibition of contact cutaneous delayed hypersensitivity reaction to DNBC in Guinea Pigs by the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by axenically grown *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res. 1997;28[Suppl]:237-38.
76. Giménez-Scherer JA, Arenas E, Díaz L, Rico-Rosillo G, Fernández- Díez J, Kretschmer R. Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* on the expression of cell adhesion molecules (CAMs) in the skin of guinea pigs. Arch Med Res. 2003;1[Suppl]:92-93.
77. Rico G, Díaz-Guerra, Giménez-Scherer JA, Kretschmer RR. Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leukocytes. Arch Med Res. 1992;23:157-59.

78. Rico G, Leandro E, Rojas S, Giménez-Scherer JA, Kretschmer RR. The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. *Parasitol Res.* 2002;1-7.
79. Rico-Rosillo G, Arellano J, Kretschmer R. The human monocyte locomotion inhibitory-factor produced by *Entamoeba histolytica* does not inhibit the locomotion of human eosinophils. *Parasitol Res.* 1998;84(4):522-23.
80. Rojas S, Rico G, Pérez J, Velázquez J, Silva R, Morales E, Kretschmer R. Cytokine expression in CD4⁺ cells exposed to the monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res.* 2005;98:493-495
81. Soriano Correa C, Sánchez-Ruiz JF, Rico-Rosillo G, Giménez-Scherer JA, Velásquez RJ, Kretschmer RR. Electronic structure and physicochemical properties of the anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica*: A theoretical study. *J Mol Structure: THEOCHEM.* 2006;769:91-95.
82. [http:// www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)
83. [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
84. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
85. An Y, Friedman RJ, Parent T, Draughn RA. "Production of standard closed fracture in the rat tibiae". *J Orthop Trauma.* 1994;8(2):111-15.
86. Díez M, Chávez D, Mercado R, Domínguez V, Torres M, Lomelí P, Méndez J. Modelo experimental de fracturas y consolidación ósea en ratas. *Rev Mex Ortop Traum.* 2002;16(3): 113-117.
87. Heldin CH, Westermark B. Role of platelet-derived growth factor *in vivo*. In: Clark RAF. *The molecular and cellular biology of wound repair.* USA. 2nd edition: Plenum Press; 1996:249-73.
88. Silva GR, Estrada GI, Ramos PR, Torres SA, Morales MM, Arenas AD, Jiménez SJ, Blanco FF, Rico RM. The effect of an anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica* on gene expression in the U-937 monocytic cell line. *Inflamm Res.* 2008;57:145-50.

89. Silva García Raúl Tesis de Doctorado "Efecto del pentapéptido (FILM) producido por *Entamoeba histolytica* sobre la expresión de genes relacionados con la inflamación/cicatrización", Instituto Politécnico Nacional –Instituto del Seguro Social, México D.F. Octubre 2007.
90. Villazón SA, Galindo NA. Nutrición y Traumatismo. En: Villazón Sahún A y Arenas Márquez H. Nutrición enteral y parenteral. México:Interamericana; 1994:194-203.
91. Schonfeld W, Knoller J, Joka T, Obertacke U, Koing W. Leukotriene generation in patients with multiple injuries. J Traum. 1992;33(6):799-806.
92. Tan LR, Waxman K, Scannell G, Loli G, Granger GA. Trauma causes early release of soluble receptors for tumor necrosis factor. J Trauma. 1993;34(5):634-38.
93. Kim C, Schinkel C, Fuchs D, Stadler J, Walz A, Zedler S et al. Interleukin-13 effectively down-regulates the monocyte inflammatory potential during traumatic stress. Arch Surg. 1995;130(12):1330-36.
94. Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumor necrosis factor-alfa in disease states and inflammation. Crit Care Med. 1993;21:447-63.
95. Hodge J, Marino MW, Horton MR, Jungbluth A, Burdick MD, Strieter RM, Noble PW, Hunter CA, Pure E. Inhibition of interferon γ induced interleukin 12 production: A potential mechanism for the anti-inflammatory activities of tumor necrosis factor. Proc Natl Acad Sci. 1998;95:13806-11.
96. Utrera-Barillas D, Vélazquez JR, Enciso A, Cruz SM, Rico RG, Curiel Quesada E, Teran LM, Kretschmer RR. An anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica* down-regulates the expression of pro-inflammatory chemokines. Parasite Immunol. 2003; 25:475-82
97. Rich RR. Clinical Immunology. Principles and practice. USA: Mosby; 1996:355.
98. García de LA, López MJ, Sánchez CM. Respuesta inflamatoria sistémica: definiciones, marcadores inflamatorios y posibilidades terapéuticas. Med Int. 2000;24(8):361-70.
99. Lester MR, Hofer MF, Gately M, Trumble A, Leung DY. Down regulating effects of IL-4 and IL-10 on IFN gamma response in atopic dermatitis. J Immunol. 1995;154:6174-81.

100. Amano Y, Lee SW, Allison AC. Inhibition by glucocorticoids of the formation of Interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6: mediation by decreased mRNA stability. *Mol Pharmacol.* 1993;43:176.
101. Vannier E, Miller LC, Dinarello CA. Coordinated anti-inflammatory effects of interleukin 4: interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci.* 1992;89:4076.
102. de Waal MR, Abrams J, Bennet B et al. Interleukin 10 (IL 10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 1991;174:1209.
103. Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon γ production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90:10188-92.
104. Vaday GG, Franitza S, Schor H, Hecht I, Brill A, Cahalon L, Hershkoviz R, Lider O. combinatorial signals by inflammatory cytokines and chemokines mediate leukocyte interactions with extracellular matrix. *J Leukoc Biol.* 2001;69:885-92.