



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Efecto del FILM sobre la expresión de los genes:
HEK7-ligando, Angiopoyetina I, BMP-R1A, FLT-3L,
Neurofilina, Folistatina, BDNF y beta Actina en
fibroblastos humanos de la línea MRC-5**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A A :

RIOS OLVERA LUIS JAVIER

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. SILVA GARCÍA RAÚL

ASESOR DE TESIS:

Q.F.B. VIDAL MILLÁN PATRICIA



MÉXICO D.F. 2011



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.

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI; IMSS, bajo la dirección del Dr. Silva García Raúl.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Raúl Silva García, por permitirme participar en su proyecto.

A los sinodales del jurado por sus aportaciones para la realización de este trabajo y en especial por su amistad.

Q.F.B. Ma. De las Mercedes Zamudio Durán

Dr. Raúl Silva García

Q.F.B. Vidal Millán Patricia

Q.F.B. José Oscar González Moreno

Dra. Raquel Retana Ugalde

DEDICATORIA

A todos aquellos que sin querer el tiempo olvido, pero que su sabiduría y su alegría aún viven en mi.

Para Paola y mi sobrina Ela, por recordarme lo hermoso que es vivir.

Para mi hermano que, aunque somos como agua y aceite, siempre fluyeron las risas.

Para Sophia; cada día aprendo más de ti que tu de mi.

A Reyna, por enseñarme que no importa si el piso es firme o no, lo importante es que cada paso lo sea; gracias por tu apoyo y tu cariño.

A mis padres, que me pusieron un lápiz en la mano y me enviaron a la escuela con la esperanza de darme un mejor mañana; gracias por ser la columna de todos mis sueños.

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	<i>i</i>
RESUMEN	<i>iii</i>
1. INTRODUCCIÓN	<i>1</i>
2. MARCO TEÓRICO	
2.1 Inflamación y cicatrización.	<i>3</i>
2.1.1 Hemostasis.	<i>3</i>
2.1.2 Inflamación.	<i>3</i>
2.1.3 Proliferación y migración.	<i>5</i>
2.1.4 Angiogénesis y epitelización.	<i>5</i>
2.1.5 Síntesis de colágena y matriz extracelular.	<i>6</i>
2.1.6 Contracción y remodelación.	<i>6</i>
2.2 Amibiasis.	<i>7</i>
2.3 Amibiasis y el FILM.	<i>7</i>
2.4 Efectos biológicos del FILM.	<i>7</i>
2.5 PCR convencional.	<i>9</i>
2.6 PCR en Tiempo Real.	<i>10</i>
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	<i>11</i>
4. HIPÓTESIS	<i>12</i>
5. OBJETIVOS	
5.1 Objetivo general.	<i>13</i>
5.2 Objetivos particulares.	
5.2.1 Realizar cultivos celulares de la línea MRC-5 de fibroblastos humanos.	<i>13</i>
5.2.2 Obtener material biológico ARN total (ARNt).	<i>13</i>
5.2.3 Realizar la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARNt.	<i>13</i>
5.2.4 Estandarizar la técnica de PCR convencional y de PCR Tiempo Real para la amplificación de los genes: HEK7 ligando, Angiopoyetina I, BMP-RIA, FLT-3L, Neurofilina, Folistatina, BDNF y β -Actina, a partir del ADNc sintetizado del ARNt obtenido de la línea celular MRC-5 de fibroblastos humanos.	<i>13</i>

5.2.5 Amplificación por PCR Tiempo Real de los genes HEK7-ligando, Angiopoyetina I, BMP-RIA, FLT-3L, Neurofilina, Folistatina, BDNF y β -Actina, a partir del ADNc sintetizado del ARNt obtenido de la línea celular MRC-5 de fibroblastos humanos, en los siguientes grupos experimentales: a) MMEE [Medio Mínimo Esencial de Eagle], b) FILM, c) PMA [Forbol 12-miristrato-13-acetato], d) FILM+PMA.	13
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	14
6.1 Técnica	
6.1.1 Realización de cultivos celulares de la línea MRC-5 de fibroblastos humanos.	14
6.1.1.1 Subcultivos (Método de tripsinización).	14
6.1.1.2 FILM.	15
6.1.2 Obtención de material biológico.	
6.1.2.1 Extracción de ARN (método de Trizol [®]).	15
6.1.2.2 Electroforesis de ARNt (integridad del ARNt).	16
6.1.3 Síntesis de ADNc.	16
6.1.4 Estandarización de la técnica de PCR convencional.	17
6.1.4.1 Electroforesis de muestras de PCR convencional.	19
6.1.5 Estandarización de la técnica de PCR Tiempo Real.	19
6.1.6 Amplificación por PCR Tiempo Real.	20
6.1.7 Análisis del perfil de expresión de genes.	20
7. DIAGRAMA DE FLUJO	21
8. RESULTADOS	
8.1 Obtención del ARNt.	25
8.2 Estandarización de la técnica de PCR convencional.	25
8.3 Amplificación por PCR Tiempo Real con SYBR Green I.	26
8.4 Perfil de expresión.	35
9. DISCUSIÓN	36
10. CONCLUSIONES	42
11. PERSPECTIVAS	43
12. ANEXOS	44
13. REFERENCIAS	45

ABREVIATURAS

➤ ADN	Ácido Desoxirribonucleico
➤ ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
➤ ADNdc	Ácido Desoxirribonucleico de doble cadena
➤ AHA	Absceso Hepático Amibiano
➤ ARN	Ácido Ribonucleico
➤ ARNt	Ácido Ribonucleico total
➤ BMP	Proteína Morfogénica de Hueso
➤ BMP-R1A	Receptor de Proteína Morfogénica de Hueso tipo I A
➤ BDNF	Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro
➤ cAMP	Adenosín Monofosfato Cíclico
➤ cGMP	Guanosín Monofosfato Cíclico
➤ Cp	Punto de Cruce
➤ CSF-1	Factor Estimulante de Colonias-1
➤ Ct	Ciclo Umbral
➤ DNCB	Dinitroclorobenceno
➤ E.R.	Expresión Relativa
➤ EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
➤ FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
➤ FGF a/b	Factor de Crecimiento de Fibroblastos ácido/básico
➤ FGF2	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2
➤ FILM	Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos
➤ FLT-3L	Ligando Tirosina Quinasa 3 Relacionado a FMS
➤ FM	Fagocitos Mononucleares
➤ FQF	Factor Quimiotáctico para los Fibroblastos
➤ HEK7-ligando	Efrin A2 ligado a quinasa
➤ IFN- γ	Interferón Gamma
➤ IGF	Factor de Crecimiento Insulinoide
➤ KGF	Factor de Crecimiento de Queratinocitos
➤ LTME	Lesión Traumática de Médula Espinal

➤ MMEE	Medio Mínimo Esencial de Eagle
➤ MMP1	Metalopeptidasa de Matriz
➤ NCBI	Centro Nacional para la Información de Biotecnología
➤ NF-kB	Factor Nuclear kappa β
➤ NK	Células Asesinas Naturales
➤ PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
➤ PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
➤ PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas
➤ PMA	Forbol 12-miristrato-13-acetato
➤ PMN	Polimorfonucleares Humanos
➤ PMNe	Polimorfonucleares Humanos Eosinófilos
➤ PMNn	Polimorfonucleares Humanos Neutrofilos
➤ SNC	Sistema Nervioso Central
➤ Taq polimerasa	<i>Thermus aquaticus</i>
➤ TBE	Solución de Tris borato EDTA
➤ TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante beta
➤ Tm	Temperatura de Disociación
➤ TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
➤ VCAM-1	Molécula de Adhesión Celular Vascular-1
➤ VEGF	Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular
➤ VLA-4	Molécula de activación muy tardía-4

RESUMEN

La inflamación es una respuesta protectora del organismo, cuya función es proteger al organismo de la causa inicial del daño y de las consecuencias de los mismos; este proceso está en relación estrecha con la reparación del tejido, que en caso de ser una reparación por fibrosis, puede conducir a cicatrización que limita la función o movilidad de los órganos afectados. En este sentido, La amiba *Entamoeba histolytica* produce el Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM) que ejerce su acción en forma dosis-dependiente y posee diversos efectos anti-inflamatorios comprobados tanto *in vitro* como *in vivo*; esta multiplicidad de efectos a diversos niveles del fenómeno inflamatorio sugiere que su acción biológica es diversa. Anteriormente se realizaron estudios en células polimorfonucleares y mononucleares, que intervienen en el proceso inflamatorio en etapas tempranas, por lo que este trabajo representa el efecto del FILM en una estirpe celular (fibroblastos humanos de la línea celular MRC-5) que participan en etapas tardías en el proceso inflamatorio, analizando el efecto del factor sobre los cambios en la expresión de genes relacionados con la inflamación y la cicatrización utilizando la técnica de PCR Tiempo Real. Los resultados obtenidos del efecto del FILM sobre la expresión de genes en fibroblastos, sugieren que el factor favorece procesos de angiogénesis y vasculogénesis; promueve diferenciación, proliferación y remodelación celular; inhibe la neurogénesis y la sinaptogénesis para una posterior y correcta regeneración y reestructuración de éstas; inhibe la apoptosis; inhibe la adhesión de leucocitos circulantes hacia el endotelio vascular y tejido; inhibe el arribo de células dendríticas; inhibe la proliferación de células dendríticas y células NK; y regula la permeabilidad vascular. Por lo que se sugiere que el FILM promueve la modificación de genes que intervienen en la respuesta inflamatoria y de cicatrización facilitando un retorno a la normalidad estructural y funcional de él o los órganos afectados. Así mismo los genes alterados presentados en el estudio sugieren el posible comportamiento que estos tendrían en el organismo durante un proceso inflamatorio en donde estos participarían. Finalmente, el conocer de forma más amplia el comportamiento del FILM puede ir sentando las bases de una investigación y así mismo dirigir su aplicación a diferentes patologías en donde la inflamación es un proceso común y el FILM podría atacar dianas importantes convirtiéndolo en blanco potencial para una terapia anti-inflamatoria.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades caracterizadas por inflamación grave son causa importante de mortalidad y morbilidad en los humanos. Comúnmente, la respuesta inflamatoria forma parte de los mecanismos normales de vigilancia y defensa empleados por el hospedero para destruir y eliminar sustancias extrañas procedentes, en su mayoría, de microorganismos. Sin embargo, las respuestas inflamatorias pueden tornarse excesivas o persistentes debido a la acumulación de células activadas y sus productos de secreción (1).

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.

Los macrófagos son uno de los principales tipos celulares involucrados en la inflamación; su capacidad de reconocer, fagocitar y destruir patógenos los hace parte esencial de la denominada inmunidad innata. Ésta es la primera línea de defensa del organismo contra invasores y su principal función es controlar la infección. A pesar de ser esenciales en la iniciación de la respuesta inmune, la función de los macrófagos puede resultar tan benéfica como perjudicial para el organismo. Después de su activación, los macrófagos secretan una variedad amplia de productos biológicamente activos que son mediadores de destrucción tisular, proliferación vascular y fibrosis; sin embargo, también puede causar daño al tejido cuando son activados inapropiadamente, donde la destrucción tisular es característica de la inflamación crónica; como consecuencia, hay intentos de reparar el daño con tejido conectivo, produciendo fibrosis y cicatrización que limita la función o movilidad de los órganos afectados. La presencia y la proliferación excesiva de estas células en los procesos inflamatorios crónicos y, particularmente, su participación en un diverso número de alteraciones como el síndrome inflamatorio sistémico, la meningitis, la fiebre reumática y la diabetes, entre otras, ha sido reportada ampliamente (1,2).

La amiba *Entamoeba histolytica* produce un factor capaz de inhibir la locomoción de los fagocitos mononucleares humanos, y no la de los polimorfonucleares humanos; por esta razón al factor se le dio el nombre de Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM) que ejerce su acción en forma dosis-dependiente sin lesionar a los leucocitos y modifica los rasgos morfológicos asociados a la locomoción celular así como los de orientación celular; favorece la producción de citocinas antiinflamatorias entre otros aspectos tanto *in vitro* como *in vivo* haciendo evidente la modulación de la respuesta inflamatoria.

Lo anterior abre la posibilidad de estudiar genes que, efectivamente, estén afectados por el efecto de este factor, por lo que el objetivo del siguiente protocolo es estudiar el efecto del FILM sobre la expresión de genes en fibroblastos humanos de la línea MRC-5. Para llevar a cabo el objetivo se cultivaron células de la línea MRC-5 de fibroblastos, realizando a partir de ésta la extracción de ARNt y una transcripción inversa para la síntesis de ADN complementario (ADNc); seguido de ello se estandarizaron las técnicas de PCR convencional y PCR Tiempo Real para la amplificación de los genes HEK7 ligando, Angiopoyetina I, BMP-R1A, FLT-3L, Neurofilina, Folistatina, BDNF y beta Actina como

gen constitutivo; para esto se diseñaron *cebadores* para la amplificación respectiva de cada gen y también se utilizaron curvas de temperatura para encontrar la óptima respectiva a los anteriores mencionados; con esta temperatura obtenida se amplificó los genes en cuestión a partir del ADNc sintetizado a partir del ARN de la línea celular MRC-5 de fibroblastos humanos por PCR Tiempo Real y su posterior análisis de expresión con la finalidad de conocer de forma más amplia el comportamiento del FILM para ir sentando las bases de una investigación y así mismo dirigir su aplicación a diferentes patologías en donde la inflamación es un proceso común y el FILM podría atacar dianas importantes convirtiéndolo en blanco potencial para una terapia anti-inflamatoria.

La investigación y el estudio continuo de los mecanismos normales y patológicos que generan y regulan las respuestas inflamatorias son cruciales en la prevención, el control y la curación de enfermedades en humanos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Inflamación y cicatrización.*

La curación de una herida, independientemente del tipo de lesión y del tamaño de la pérdida de tejido, ocurre en fases que se superponen en el tiempo y no pueden ser excluyentes. Las lesiones demandan energía y síntesis proteica por las necesidades locales de la misma, *persé*, la herida produce un estado de hipermetabolismo sistémico y catabólico. El proceso de curación se divide en tres fases: 1) Fase inicial: hemostasis e inflamación, 2) Fase intermedia: proliferación, migración, epitelización y angiogénesis, 3) Fase final: síntesis de colágeno, contracción y remodelación (3,4).

2.1.1 *Hemostasis.*

Tras una herida lo primero que ocurre es la hemorragia, y la curación de la misma se da por hemostasia. En primer lugar se forma un coágulo de fibrina y plaquetas que cierran los vasos dañados. La formación de la fibrina es la consecuencia de la activación de la cascada de coagulación por sus dos vías, la intrínseca y la extrínseca.

Se establece una red formada por fibrina, vitronectina y fibronectina, procedentes del suero y de las plaquetas, esta última proteína facilita la unión de células y la migración de éstas. Su origen se encuentra en los fibroblastos y en las células endoteliales, además se producen diferentes citocinas que tienen actividad sobre otras fases, como en el caso de la trombina, que estimula la permeabilidad vascular que se observa tras la lesión y favorece la migración hacia el intersticio de células inflamatorias. El resultado es la formación de fibrina que estimulará la migración celular y la angiogénesis (3,5).

2.1.2 *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 (microorganismos, toxinas, 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 que limita la función o movilidad de los órganos afectados (6).

En la respuesta inflamatoria participan el plasma, las células circulantes (neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y plaquetas), las células del tejido conectivo (cebas, fibroblastos, macrófagos y linfocitos), los vasos sanguíneos y los componentes extracelulares. La respuesta inflamatoria se divide en fase aguda y fase crónica. La fase aguda 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 a la zona de lesión, determinada por la unión de moléculas de adhesión y por mediadores químicos (7,8).

Una vez extravasados, los leucocitos migran hacia el sitio de 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 (6).

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 (9).

La fase crónica, por otro lado es de mayor duración e histológicamente se asocia con la presencia de linfocitos, macrófagos, células plasmáticas, proliferación de vasos sanguíneos y del tejido conectivo además de estar relacionada con la destrucción del tejido por las células inflamatorias y el intento de reparación por sustitución de tejido conectivo (angiogénesis y fibrosis).

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 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 microorganismos 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 variedad amplia de productos biológicamente activos que son mediadores de destrucción tisular, proliferación vascular y fibrosis (10).

Los macrófagos son un componente central en la inflamación crónica y 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 factor de crecimiento transformante alfa y beta (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, quimiocinas (producidas por macrófagos y linfocitos activos) y PDGF (11).

La importancia del macrófago radica en la producción de sustancias biológicamente activas, y algunas son tóxicas a las células (metabolitos del oxígeno) o a la matriz extracelular (proteasas), la producción de citocinas, de factores quimiotácticos, y otras que causan proliferación celular. Lo anterior hace al macrófago una célula eficiente en la defensa del huésped; sin embargo, también puede causar daño al tejido, cuando son activados inapropiadamente, donde la destrucción tisular es característica de la inflamación crónica. La destrucción tisular persistente daña la estructura del estroma y a las células del parénquima, como consecuencia, hay intentos de reparar el daño con tejido conectivo, produciendo fibrosis y cicatrización (5,6).

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.

2.1.3 Proliferación y migración.

Cuando la lesión tiene 4 días, los fibroblastos son las células fundamentales del proceso. Estos se encuentran en el tejido sano perilesional y, atraídos por citocinas de la fase temprana, migran hacia la herida. Los fibroblastos son fuente de otras moléculas que reclutan más fibroblastos y células musculares lisas entre otras. Para conseguir la migración de las células hacia la herida, es necesario que se adhieran a la fibronectina, a la fibrina y a la vitronectina. Las citocinas y los factores de crecimiento regulan la migración de las células encargadas de la reconstitución de tejidos y vasos.

Entre las citocinas que regulan la función de los fibroblastos encontramos: Factor Quimiotáctico para los Fibroblastos (FQF), Factor de Crecimiento Insulinoide (IGF), TGF- β , Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), péptidos de colágena y fibronectina (3,5,6).

2.1.4 Angiogénesis y epitelización.

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos y se inicia gracias a la liberación del factor angiogénico por parte de los macrófagos, hay formación de cúmulos de células endoteliales que junto con células mesoteliales forman nuevos capilares generando una red que madura mediante la agregación de capilares que al unirse constituyen vasos de mayor calibre.

La migración de células endoteliales y la formación de vasos se produce gracias a los cambios que ocurren en la matriz y en las paredes de los vasos, facilitado todo ello por los factores que secretan las propias células vasculares. Entre estos factores se encuentran el Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2 (FGF2) que es un potente estimulante angiogénico, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos ácido/básico (FGF a/b), y el Factor de Crecimiento de Queratinocitos (KGF).

La epitelización adquiere un papel importante en la cicatrización. Al existir pérdida de la epidermis, las células basales empiezan su diferenciación y migración formando una sola

capa, una vez que ésta se forma, el resto de las células se divide, y de este modo cicatriza la lesión. Los factores de crecimiento epidérmico liberados por los macrófagos y plaquetas inician este proceso.

La epitelización provoca el engrosamiento y liberación de la membrana basal, la elongación de las células, la migración en monocapa, la proliferación y la diferenciación, procesos controlados mediante citocinas del tipo: EGF, FGF, IGF, KGF, TGF α y TGF- β (2,3).

2.1.5 Síntesis de colágena y matriz extracelular.

Esta fase se caracteriza por la síntesis proteínas de matriz y colágena, en donde los fibroblastos activados producen factores de crecimiento como el FGF y sintetizan colágena, en forma de precolágena.

En la síntesis de la colágena participan: FGF, EGF, TGF- β (estimulante potente de su síntesis e inhibidor de la actividad de las proteasas), PDGF que influencia la expresión de TGF- β y la síntesis de tejido de granulación.

La matriz intersticial está formada por los fibroblastos y otras células. Los proteoglicanos, como el ácido hialurónico es el principal componente de la matriz que la hace más rígida en los estadios iniciales de la cicatrización y disminuye su concentración con la maduración de la misma. La fibronectina tiene un papel fundamental en el proceso de cicatrización; es un componente primario de la matriz provisional, mientras que la elastina marca la diferencia entre la piel normal y la cicatrizada (4).

2.1.6 Contracción y remodelación.

La contracción es el proceso de cierre por movimiento de los bordes de la lesión hacia el centro. El mecanismo es por generación de fuerzas de elementos contráctiles de los fibroblastos. Con la contracción se liberan colágena y proteoglicanos, asegurando un nuevo tejido en el lugar afectado. Las citocinas que participan son: TGF- β que facilita la contracción y la diferenciación hacia miofibroblasto, el PDGF que estimula la contracción por un mecanismo TGF- β dependiente, FGF que estimula la contracción e IFN- γ que inhibe el proceso.

Después de 21 días de cicatrización, la acumulación de colágena es estable, hay acción de las colagenasas para eliminar el exceso de colágena, y una regresión de capilares en la superficie con disminución de proteoglicanos.

Para conseguir el remodelado de la cicatriz entran en juego numerosas enzimas del grupo de las metaloproteasas con actividad colagenolítica. Entre ellas encontramos: Metalopeptidasa de Matriz (MMP1) o colagenasa intersticial, MMP2 o gelatinasa, MMP3 o estromelisina y la hialuronidasa (3,4,6).

2.2 Amibiasis.

La amibiasis, es una de las enfermedades parasitarias que afecta predominantemente a individuos de bajo nivel socioeconómico de países en desarrollo. La infección causada por *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) se presenta en todo el mundo, principalmente en África, América del Sur y la India (12-14).

Las principales manifestaciones clínicas de la infección amibiana son la colitis y el Absceso Hepático Amibiano (AHA). Los factores que permiten la aparición y subsiguiente resolución de la amibiasis invasora son múltiples y probablemente se relacionen con el balance entre los mecanismos patogénicos del parásito y los mecanismos de defensa del huésped, tanto inmunológicos como no inmunológicos (15).

La reacción inflamatoria que acompaña a la amibiasis invasora por *E. histolytica* es atípica en varios aspectos (16). A pesar de que en las fases tempranas se observa una inflamación aguda muy intensa, que contiene algunos eosinófilos, en los estadios avanzados, sobre todo en el AHA, llama la atención la escasez de reacción inflamatoria tardía; ésta podría contribuir a la igualmente inusitada regeneración hepática que ocurre, sin traza de tejido cicatricial, en los individuos que se recuperan gracias al tratamiento médico de AHA.

2.3 Amibiasis y el FILM.

En el AHA existe una escasez de elementos inflamatorios en los estadios avanzados. 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. 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. La falta de estos elementos inflamatorios tardíos puede, a su vez, estar relacionado 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, quimiotaxis y quimiotaxis) de los Fagocitos Mononucleares (FM) humanos, y no la de los Polimorfonucleares Humanos (PMN) por esta razón al factor se le dio el nombre de Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM) (16-18).

2.4 Efectos biológicos del FILM.

El FILM ejerce su acción en forma dosis-dependiente y sin lesionar a los leucocitos, afecta la locomoción de los FM *in vivo*, como lo revelaron los estudios con cámaras de Rebeck en voluntarios humanos.

El FILM es una molécula de 735-478 Da, termoestable y que almacenada a -70°C no pierde su actividad biológica (18).

El FILM modifica los rasgos morfológicos asociados a la locomoción celular (aplanamiento celular y número de pseudópodos) así como los de orientación celular (desplazamiento caudal del núcleo y disposición cefálica de los organelos), pero sobre todo, induce un aumento importante de microtúbulos asociados al centríolo (19).

El factor inhibidor puede absorberse con FM y recuperarse subsecuentemente por elusión ácida, 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 (20).

Estudios subsecuentes revelaron que el FILM utilizado a concentraciones equivalentes a las empleadas en los estudios leucotácticos no sólo inhibe la locomoción de los FM, sino también es capaz de cancelar su estallido respiratorio (medido por quimioluminiscencia), aunque este efecto también lo ejerce sobre los PMN neutrófilos (PMNn). Esto puede o no ser relevante en la interacción de *E. histolytica* y los FM activados, ya que estas células son capaces de destruir amibas virulentas por mecanismos oxidativos y no oxidativos. En el caso de los PMNn esta acción del FILM podría contribuir en la notoria incapacidad para interactuar *in vitro* con *E. histolytica* virulenta, sobre todo porque la lisis que los PMN logran sobre *E. histolytica* no virulenta, o aquellas atenuadas con emetina o calor, ocurre exclusivamente por mecanismos oxidativos (21-24).

El mecanismo de acción del FILM sobre las células blanco no se conoce, pero la multiplicidad de acciones selectivas como adhesión, locomoción efectos sobre metabolitos, producción de radicales oxidantes etc., (18,25-27) sobre una variedad de células como son endoteliales, PMNn, FM entre otras, desorganizando la propia red pro y antiinflamatoria, indica que el FILM puede actuar en una vía común a estos mecanismos.

La multiplicidad de los efectos del FILM en las diversas células llevó a considerar una acción sobre la red de citocinas inflamatorias del huésped, estudios preliminares sugieren que el FILM incide en la cascada de señalización del NF- κ B (Factor Nuclear kappa β) en monocitos humanos aumentando la translocación del homodímero p50/p50, alterando la dinámica del heterodímero p65/p50 e inhibiendo la síntesis de la proteína adaptadora MyD88, alterando su translocación membranal (28,29).

El FILM *in vivo* retarda el arribo de leucocitos mononucleares en ventanas de Rebeck en humanos e inhibe la hipersensibilidad por contacto al 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno en cobayos y gerbos. Además, disminuye la expresión de moléculas de adhesión VLA-4 (Very late antigen) y VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) sobre fagocitos mononucleares y el endotelio postcapilar. Tiene un efecto positivo en la recuperación motriz de ratas Sprague Dawley después de una Lesión Traumática de Médula Espinal (LTME) moderada, inhibe la producción de óxido nítrico en animales con una LTME moderada después de dicha lesión y afecta la peroxidación lipídica en una LTME después de la lesión (18,26,30-31).

In vitro el FILM Inhibe la locomoción de FM, sin afectar la locomoción de PMNn y eosinófilos (PMNe), cancela virtualmente la producción de intermediarios reactivos del oxígeno [ROI (H_2O_2 , O_2^- , OH^-)] y la síntesis inducida de óxido nítrico [RNI (NO)] en FM

y PMNn sin afectar a PMNe, induce un aumento importante de microtúbulos asociados al centríolo y en concentración del cAMP (Adenosín Monofosfato Cíclico) mientras que disminuye el cGMP (Guanosín Monofosfato Cíclico); (19,32).

Un péptido sintético con la misma secuencia del FILM (American Peptide Company, INC.) reprodujo el efecto biológico del FILM nativo (FILMn).

No se sabe si el FILM es usado o sintetizado *in vivo* por el parásito cuando éste invade a su huésped; sin embargo, gerbos inmunizados con FILM tetramerizado alrededor de dos moléculas de lisina [péptido antigénico múltiple (FILM-MAPS)] induce inmunidad mediada por células contra el FILM y previene el establecimiento del AHA experimental (33).

Estudios de análisis de microarreglos, citometría de flujo, PCR Tiempo Real y determinación de proteínas por el método inmuno-enzimático (ELISA), han mostrado que el FILM tiene un importante papel en el equilibrio celular Th1-Th2 favoreciendo el balance hacia éste último ya que inhibe la producción de interleucinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12, INF- γ y favorece la producción de citocinas antiinflamatorias como la IL-10 y IL-1r (en la línea celular U-937) haciendo evidente que el balance homeostático entre estas citocinas sea crítico en la modulación de la respuesta inflamatoria (29,34-36).

Resultados preliminares del efecto del pentapéptido sobre la expresión de genes en fibroblastos, sugieren que el FILM participa en procesos de angiogénesis, factores de crecimiento, síntesis/degradación de matriz extracelular, vasculogénesis, guía axonal ya que modifica la expresión de genes que intervienen con estos procesos (34,29,37).

2.5 PCR convencional.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue creada por Kary B. Mullis en 1983. En sus casi 30 años de evolución ha contribuido de manera significativa en los procesos de investigación básica y de diagnóstico en gran cantidad de patologías (38).

Las aplicaciones de la PCR son múltiples, entre ellas la amplificación de fragmentos de genes, modificación de fragmentos de Ácido Desoxirribonucleico (ADN), la detección de mutaciones importantes en enfermedades hereditarias, el análisis de marcadores genéticos para aplicaciones forenses y estudio de expresión de genes entre otras (39-41).

La técnica de PCR permite amplificar más de mil millones de veces un ADN obtenido a partir de una región seleccionada de un genoma. Esta técnica permite la clonación de un fragmento de ADN en un “sistema libre de células” (42).

El principio de la PCR consiste en determinar la secuencia de interés y seleccionar pequeños segmentos de nucleótidos llamados iniciadores o cebadores, complementarios con la secuencia de nucleótidos de los extremos opuestos de las cadenas que flanquean a dicha secuencia, a partir de los cuales mediante la acción de la Taq polimerasa (*Thermus*

aquaticus), se inicia la elongación o síntesis de nuevas cadenas en el extremo 3' de cada iniciador, para obtener múltiples copias de dicho segmento (43,44).

La técnica depende de la utilización de un ADN polimerasa especial, aislada de una bacteria termófila, que es mucho más estable a temperaturas elevadas que la polimerasa común, de modo que no se desnaturaliza por calentamientos repetidos. Con cada ciclo de síntesis de ADN, los nuevos fragmentos generados actúan, a su vez, de molde y en pocos ciclos el producto predominante es un único tipo de fragmento de ADN cuya longitud corresponde a la distancia entre los dos cebadores originales. Cada ciclo duplica la cantidad de ADN sintetizado en el ciclo anterior; la amplificación efectiva del ADN requiere en la práctica unos 20-30 ciclos de reacción (42).

El método de PCR es extremadamente sensible; en una muestra puede detectar una sola molécula de ADN. De una forma similar se pueden analizar cantidades traza de Ácido Ribonucleico (ARN), transformando este ARN en secuencias de ADN mediante la acción de la transcriptasa inversa (42).

2.6 PCR en Tiempo Real.

El PCR convencional tiene limitaciones para cuantificar la secuencia amplificada, pero en el PCR en Tiempo Real, la cantidad del producto formado es detectado durante todo el curso de la reacción mediante el monitoreo de la fluorescencia de colorantes o de sondas introducidas en la reacción. La señal es proporcional a la cantidad del producto formado y al número de ciclos de la amplificación requeridos para tener una cantidad de moléculas de ADN, y una eficiencia de amplificación la cual es el doble del número de moléculas por ciclo, esto hace posible calcular el número de moléculas de ADN de la secuencia amplificada que estuvieron inicialmente presentes en la muestra (45-52).

El uso típico del PCR en Tiempo Real incluye la detección de patógenos, análisis de expresión de genes, polimorfismo de nucleótidos y aberraciones cromosómicas entre otras. El SYBR Green I es un colorante que se incorpora dentro de los surcos de ADN de doble cadena (ADNdc); su fluorescencia es indetectable cuando se encuentra en su forma libre, pero una vez que se une al ADNdc puede ser detectada. La ventaja más importante es que se pueden usar un par de iniciadores comunes a un blanco, por lo que resulta menos costoso que utilizar sondas. Sin embargo, su especificidad disminuye debido al riesgo de unirse a productos de PCR no específicos. La detección de la fluorescencia del SYBR Green I nos permite analizar la Temperatura de Disociación T_m (melting temperature por sus siglas en inglés) determinada por la curva del mismo nombre y se detectan productos amplificados basados en su porcentaje de guanina + citocina (G+C) (47,48).

3. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

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 y de las consecuencias de los mismos; este proceso está en relación estrecha con la reparación del tejido, que en caso de ser una reparación por fibrosis, puede conducir a cicatrización que limita la función o movilidad de los órganos afectados. El FILM ejerce su acción en forma dosis-dependiente y posee diversos efectos anti-inflamatorios comprobados tanto *in vitro* como *in vivo*; esta multiplicidad de efectos a diversos niveles del fenómeno inflamatorio sugiere que su acción biológica es diversa.

Los fibroblastos también pueden iniciar, amplificar y sobre todo modular algunos eventos relacionados con la respuesta inflamatoria y cicatrización de la herida. Resultados preliminares del efecto del factor sobre la expresión de genes en fibroblastos humanos de la línea celular MRC-5, sugieren que el FILM participa en procesos de angiogénesis, factores de crecimiento, síntesis/degradación de matriz extracelular, vasculogénesis, guía axonal ya que modifica la expresión de genes que intervienen con estos procesos. En este contexto se planteo la siguiente pregunta de investigación:

¿Podrá el FILM afectar la expresión de los genes HEK7-ligando, Angiopoyetina I, BMP-R1A, FLT-3L, Neurofilina, Folistatina y BDNF en fibroblastos humanos de la línea celular MRC-5 de tal modo que favorezcan una respuesta antiinflamatoria?

Anteriormente se realizaron estudios en células polimorfonucleares y mononucleares, que intervienen en el proceso inflamatorio en etapas tempranas, por lo que este trabajo representa el efecto del FILM en una estirpe celular (fibroblastos humanos de la línea celular MRC-5) que participan en etapas tardías en el proceso inflamatorio, analizando el efecto del factor sobre los cambios en la expresión de genes relacionados con la inflamación y la cicatrización utilizando la técnica de PCR Tiempo Real.

4. HIPÓTESIS

El FILM será capaz de alterar positiva o negativamente la expresión de los genes HEK7 ligando, Angiopoyetina I, BMP-R1A, FLT-3L, Neurofilina, Folistatina y BDNF, de la línea celular MRC-5 de fibroblastos humanos.

5. OBJETIVOS

5.1 *Objetivo general.*

Evaluar la manera en qué el FILM altera la expresión de los genes Efrin A2 ligado a quinasa (HEK7-ligando); Angiopoyetina I; Receptor de Proteína Morfogénica de Hueso tipo I A (BMP-R1A); Ligando Tirosina Quinasa 3 Relacionado a FMS (FLT-3L); Neurofilina; Folistatina; Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF) y β -Actina (gen constitutivo) en la línea celular MRC-5 de fibroblastos humanos.

5.2 *Objetivos particulares.*

- 5.2.1 Realizar cultivos celulares de la línea MRC-5 de fibroblastos humanos.
- 5.2.2 Obtener material biológico ARN total (ARNt).
- 5.2.3 Realizar la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARNt.
- 5.2.4 Estandarizar la técnica de PCR convencional y de PCR Tiempo Real para la amplificación de los genes: HEK7 ligando, Angiopoyetina I, BMP-R1A, FLT-3L, Neurofilina, Folistatina, BDNF y β -Actina, a partir del ADNc sintetizado del ARNt obtenido de la línea celular MRC-5 de fibroblastos humanos.
- 5.2.5 Amplificación por PCR Tiempo Real de los genes HEK7-ligando, Angiopoyetina I, BMP-R1A, FLT-3L, Neurofilina, Folistatina, BDNF y β -Actina, a partir del ADNc sintetizado del ARNt obtenido de la línea celular MRC-5 de fibroblastos humanos, en los siguientes grupos experimentales: a) MMEE [Medio Mínimo Esencial de Eagle], b) FILM, c) PMA [Forbol 12-miristrato-13-acetato], d) FILM+PMA.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio: Experimental.

Población objetivo: Fibroblastos humanos de la línea celular MRC-5.

Variables independientes: Cultivos celulares de la línea celular MRC-5 de fibroblastos humanos en MMEE.

Variables dependientes: Expresión de genes con respecto a la acción del FILM, PMA, FILM+PMA.

6.1 Técnica

6.1.1 Realización de cultivos celulares de la línea MRC-5 de fibroblastos humanos.

El procedimiento para el manejo de los cultivos celulares se realizó en condiciones de esterilidad y en campana de flujo laminar. Se descongeló un vial de la línea celular MRC-5 (American Type Culture Collection, ATCC No. CCL-171) conservada en nitrógeno líquido colocándola en baño de agua a 37°C, evitando el paso de ésta al interior del contenedor de las células y eliminando los residuos del líquido al descongelarse, limpiando completamente la superficie del vial con etanol al 70%. Las células se extrajeron y se depositaron en botellas para cultivo de 75cm³ de poliestireno que contenían 8mL de MMEE (*In Vitro*®, Life Technologies, Eggenstein, Germany) suplementado con: L-glutamina 2mM, bicarbonato de sodio 1.5g/L, glucosa 4.5g/L, HEPES 10mM, piruvato de sodio 1.0mM y suero fetal bovino al 10% libre de endotoxinas (FBS, Gibco BRL Life Technologies, Gran Island, NY) para su propagación y se incubaron por un lapso de 3hrs/37°C en atmosfera de CO₂ al 5%, después de las cuales se eliminó el medio y se prosiguió a los lavados con 3mL de Solución Amortiguadora (Buffer) de Fosfatos (PBS) 1X en donde la botella de cultivo se inclinó en un ángulo de 70° aproximadamente y con una pipeta Pasteur se virió repetidamente (7 veces) por la pared, con la finalidad de eliminar residuos celulares. Se eliminó la solución y se adicionó MMEE enriquecido (10mL) para después ser llevado a incubación a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5%.

Se realizó la observación diaria de las células, cambiando medio cuando este se acidificó, realizando lavados con solución PBS 1X y adicionando el medio nuevo enriquecido (10mL). Cuando las células ocuparon más del 80% de la superficie de la botella, fue necesario un subcultivo por medio del *Método de Tripsinización de Fibroblastos* y se dividieron en dos partes para ser depositadas las células en nuevas botellas para cultivo con las condiciones anteriormente señaladas para su incubación.

6.1.1.1 Subcultivos (*Método de tripsinización*).

Se realizaron subcultivos cuando el cultivo presentó confluencia (80% de crecimiento celular). Se extrajo el medio de cultivo de las cajas con los residuos celulares resuspendidos y se eliminó. Se lavaron las cajas de cultivo con 3mL de PBS por 15 segundos y se enjuagó de 5 a 7 veces con pipeta Pasteur. Se eliminó el amortiguador; se agregó Tripsina-Verseno

(0.005% - 0.05% v/v) (*In Vitro*®) suficiente para cubrir la capa de células (aprox. 2mL para cajas de 75cm³) y se incubó a 37°C con agitación constante y moderada durante 7 minutos. Se extrajeron las células junto con la Tripsina-Verseno y se depositaron en tubos de ensayo esteriles. Se centrifugó a 800rpm/3min; se eliminó la Tripsina-Verseno y las células se resuspendieron en MMEE sin suero. Se lavaron repetidamente las cajas con 1mL de MMEE y se colectaron los lavados con la suspensión anterior. Se obtuvieron las células y el medio. Se homogenizaron ligeramente con pipetas pasteur y los cúmulos celulares se dejaron sedimentar para ser retirados cuidadosamente. Se verificó viabilidad con azul de tripano (dilución 1:2) (*sigma*®) en la cámara de Neubauer (20µL totales) y se realizaron los subcultivos (5x10⁶ células / 5mL de MMEE) en los grupos experimentales: a)MMEE, b)PMA [10ng / 10⁶ células], c)FILM [50µg / 10⁶ células], d) PMA-FILM [10ng / 10⁶ células - 50µg / 10⁶ células].

Para comparar el perfil de expresión de los genes sin estímulo e inducidas en estudio se realizaron subcultivos con 5X10⁶ células en placas de seis pozos con 5mL de MMEE en los grupos experimentales: a)MMEE, b)PMA, c)FILM, d) PMA-FILM; las células se incubaron a 37°C/24h/5% de CO₂ antes de la extracción de ARNt.

6.1.1.2 FILM.

El FILM se obtuvo de American Peptide Company Co.® (Sunnyvale, CA, USA) (>95% de pureza) se disolvió una concentración de 2µg/µL en PBS con un pH de 7.4. De esta mezcla se realizaron alícuotas y se almacenaron a -70°C, hasta su posterior uso en los cultivos celulares.

6.1.2 Obtención de material biológico.

6.1.2.1 Extracción de ARN (método de Trizol®).

Se extrajo el sobrenadante de las células de los grupos experimentales y se depositó en tubos de ensayo estériles. Se centrifugó a 1500rpm/3min/4°C y se desechó el sobrenadante conservando el botón celular. Se adicionó 500µL de Trizol (*Invitrogen*®, *Life Technologies, Carlsbad, California, USA*) en los pozos para extraer el material nuclear (ARNt) de las células y se depositó en los tubos de ensayo que contenían el botón y se llevó a 1000µL de Trizol. Se vertió en tubos eppendorf de 2000µL y se les adicionó 12.5µL (20mg/mL) de glicógeno (*Roche Diagnostics*® *Mannheim, Germany*). Se mezcló en vortex de 2 a 5seg y se colocó en hielo por 5min. Se adicionó 220µL de cloroformo a -20°C y se mezcló en vortex por 10seg. Se dejó en baño de hielo por 5min. Se centrifugó a 10000rpm/15min/4°C. Se obtuvo con cuidado por la pared del tubo eppendorf la fase superior y se vertió a otro tubo nuevo. Se agregó 550µL de isopropanol a -20°C y se mezcló ligeramente con vortex. Se dejó en baño de hielo por 15min. Centrifugación a 10000rpm/15min/4°C. Se eliminó el isopropanol y se adicionó 1000µL de etanol al 80%. Se homogenizó ligeramente con vortex. Se centrifugó a 6000rpm/5min/4°C y se eliminó el etanol. El exceso de etanol se eliminó con baño de agua a 45°C/3min y se dejó secar a temperatura ambiente por 5-10min. Se agregó 22µL de agua inyectable y se calentó a 45°C/3min; se resuspendió suavemente por la pared del tubo eppendorf de 10 a 15 veces en baño de hielo. Se cuantificó el ARN obtenido en un espectrofotómetro (Gen Quant Proespectrophotometer,

Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) y se realizaron alícuotas con 2000ng de ARN en tubos eppendorf, los cuales se almacenaron a -70°C.

6.1.2.2 Electroforesis de ARNt (integridad del ARNt).

Se realizó un gel de agarosa al 1.8% con Solución de Tris borato EDTA (TBE) 1X en la bandeja de preparación. La bandeja con el gel se colocó en el equipo de electroforesis y se llenó la cámara con solución de TBE 1X y el ARNt obtenido se aplicó en los pozos (1µg de ARNt) que previamente fue mezclado con amortiguador de cargada (*Pel-Freez, Clinical Systems*[®]); se utilizó como referencia 2µL de un marcador de peso molecular de 100pb (DNA Molecular XIII Weight Marker; *Roche*[®]) mezclado con el amortiguador de cargada. Los pozos estuvieron ubicados en dirección al cátodo y se hizo pasar una corriente de 60volts durante una hora y treinta minutos aproximadamente. Después de la electroforesis el gel fue expuesto a una solución (20µL en 200mL de agua destilada) de bromuro de etidio (*Sigma*[®]) durante cinco minutos, se enjuago con agua des ionizada y después se analizó con un equipo de luz ultravioleta (fotodocumentador; *Bio Rad*[®]) la integridad del ARNt.

6.1.3 Síntesis de ADNc.

El ARNt obtenido con anterioridad fue utilizado para sintetizar ADNc (kit Thermo Script[™] RT-PCR System; Invitrogen[®],USA). Se programaron las temperaturas a utilizarse (tabla 1) en el equipo de PCR Convencional *PTC-100 Programable Thermal Controller* (Invitrogen[®], Corporation Foster City, California; Peltier-effect cycling, MJ Research, Inc. Waltham, MA, USA).

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	65	5
2	4	1
3	55	55
4	85	5
5	37	20

Tabla 1.

Se preparó la primera mezcla de reacción de acuerdo a la tabla 2.

Reactivo	Volumen
Oligo dt	1Ml
ARN ¹	2µg
dNTP mix 10mM	2µL
Agua tratada-DPC ²	Aforo a 12µL

Tabla 2.

¹ARN obtenido de cultivos celulares de la línea MRC-5 de fibroblastos humanos.

²DPC: Dipirocarbonato.

Se corrió el programa en el equipo de PCR convencional bajo las condiciones indicadas con la mezcla de reacción anteriormente mencionada.

Se adicionó en el segundo paso la Mezcla Maestra de Reacción de acuerdo a la tabla 3.

Reactivo	Volumen (μL)
5X ADNc amortiguador de síntesis	4
0.1M DTT	1
RNasa Out (40U/ μL)	1
Agua tratada-DPC	1
Thermo Scrip RT (15 units/ μL)	1

Tabla 3.

Se adicionó en el quinto paso 1 μL de RNasa H.

Al final del quinto paso se almacenó la síntesis de ADNc a -20°C .

6.1.4 Estandarización de la técnica de PCR convencional.

Las secuencias específicas de ADNc se obtuvieron de la base de datos del GenBank del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI), los cebadores utilizados para la amplificación (Tabla 4) se diseñaron a partir de secuencias específicas de ADNc con el programa *Custom Primers - OligoPerfect™ Designer* y el software *Oligo™*, y se utilizaron a una concentración de 10pm.

Cebadores utilizados:

Gen	Cebador derecho	Cebador reverso	Pares de bases amplificado	GeneBank
HEK7-ligando	gAg ACC CTg TAC gAg gCT C	Cgg gCT gCT ACA CgA gTT A	60	NM_001405
Angiopoyetina I	CTC gCT gCC ATT CTg ACT CAC	gAC AgT TgC CAT CgT gTT CTg	136	NM_001146
BMP-R1A	TCA gAC TCC gAC CAg AAA AAg T	Tgg CAA AgC AAT gTC CAT TAg TT	145	NM_004329
FLT-3L	AgC CCA ACA ACC TAT CTC CTC	ACg gAT TTT gAC AgC gAA gTC	114	NM_001459
Neurofilina	CCA gCA gCC AAA gCT gTT C	ggT CAA ACC TTC ggA TgT CAg	65	AFO22859
Folistatina	TCT gTg CCA ATg TgT TTT gTg g	TgA ggT Agg TCT TgC CAT TAC Tg	135	NM_007085
BDNF	gCg ggA ggA ATT TCT gAg Tg	TAA AgC ACg Agg TCC AAg CA	147	NM_170732.4
β -Actina	CCA ACC gCg AgA AgA TgA	CCA gAg gCg TAC Agg gAT Ag	97	NM_001101.3

Tabla 4.

Se programaron las temperaturas y ciclos a utilizarse en el equipo de PCR convencional (Tabla 5).

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	5min
2	94	30seg
	X	30seg
	72	30seg
30 ciclos		
3	72	10min

Tabla 5.

X= Se realizó una curva de temperaturas que comprendieron como inicio la temperatura teórica de amplificación (Tabla 6) de acuerdo al previo diseño de los cebadores correspondientes a cada gen.

Cebador derecho e izquierdo	Temperatura Teórica (°C)
Ephirn A2 ligado a quinasa	55.2
Angiopoyetina I	58.4
BMP-R1A	59.0
FLT-3L	55.0
Neuropilina I	58.0
Follistatina	54.5
B-Actina	53.0
BNDF	58.0

Tabla 6.

Se preparó la mezcla de reacción de acuerdo a la tabla 7.

Reactivo	Volumen (µL)
Agua tratada-DPC	6.75
10X PCR Gold buffer	1.0
ADNc	1.0
MgCl ₂ 25mM	0.3
Cebador derecho	0.3
Cebador izquierdo	0.3
dNTPS 10mM	0.2
AMLI TAQ Gold	0.15

Tabla 7.

Se corrió el programa en el equipo de PCR convencional bajo las condiciones indicadas con la mezcla de reacción anteriormente mencionada y se realizó electroforesis de la síntesis para observar la temperatura óptima de amplificación.

6.1.4.1 Electroforesis de muestras de PCR convencional.

Se realizó un gel de agarosa al 1.8% con solución de TBE 1X en la bandeja de preparación. La bandeja con el gel se colocó en el aparato de electroforesis y se llenó la cámara con solución de TBE 1X; se aplicó en los pozos los amplificadores del PCR convencional (5 a 10µL de la reacción) que previamente fueron mezclados con amortiguador de cargada (*Pel-Freez, Clinical Systems*®), y se utilizó como referencia 2µL de un marcador de peso molecular de 50pb (DNA Molecular XIII Weight Marker; *Roche*®) también mezclado con el amortiguador de cargada. Los pozos estuvieron ubicados en dirección al cátodo y se hizo pasar una corriente de 60volts durante una hora y treinta minutos aproximadamente. Después de la electroforesis el gel fue expuesto a una solución (20µL en 200mL de agua destilada) de bromuro de etidio (*Sigma*®) durante cinco minutos, se enjuagó con agua desionizada y después se analizó con un equipo de luz ultravioleta (fotodocumentador; *Bio Rad*®) que el amplificado correspondiera con el tamaño del amplicón del gen en cuestión.

6.1.5 Estandarización de la técnica de PCR Tiempo Real.

Se programaron las temperaturas y ciclos a utilizarse en el equipo de PCR Tiempo Real (*LighCycler*® Software 4.1, Roche) de acuerdo a la tabla 8.

Modo de Análisis	Ciclos	Segmento	Temperatura °C	Tiempo	Modo de adquisición
Preincubación					
Ninguno	1	-	95	10min	Ninguno
Amplificación					
Cuantificación	45	Desnaturalización	95	10seg	Ninguno
		Alineación	X	8seg	Ninguno
		Extensión	72	Yseg	Simple
Curvas de fusión					
Curvas de fusión	1	Desnaturalización	95	0seg	Ninguno
		Alineación	65	1min	Ninguno
		Fusión	95 ¹	0seg	Continuo
Enfriamiento					
Ninguno	1	-	40	30seg	Ninguno

Tabla 8.

X= Esta dependió de las temperaturas óptimas de amplificación obtenidas por PCR convencional a partir de los cebadores diseñados para éste; las cuales se tomaron como punto de partida para realizar curvas de temperaturas.

Y= Se obtiene dividiendo el tamaño del amplicón entre 25.

¹ = Rampe rate de 0.1°C/seg

Se preparará la mezcla de reacción de acuerdo a la tabla 9.

Reactivo	Volumen (µL)
Agua tratada-DPC	5.9
Mix de reacción ²	2.0
ADNc	1.5
Cebador derecho	0.3
Cebador izquierdo	0.3

Tabla 9.

²= Sybr® Green (*Invitrogen*®).

Se corrió el programa en el equipo de PCR Tiempo Real bajo las condiciones indicadas con la mezcla de reacción anteriormente mencionada.

6.1.6 Amplificación por PCR Tiempo Real.

Se amplificaron los genes HEK7-ligando, Angiopoietina I, BMP-R1A, FLT-3L, Neurofilina, Folistatina, BDNF y β -Actina de la línea celular MRC-5 de fibroblastos humanos en los siguientes grupos experimentales: a) MMEE, b) FILM, c) PMA, d) FILM+PMA; de acuerdo a la temperatura óptima correspondiente a cada gen obtenida en la estandarización de la técnica por PCR Tiempo Real.

6.1.7 Análisis del perfil de expresión de genes.

Se determinó el perfil de expresión de los genes HEK7-ligando, Angiopoietina I, BMP-R1A, FLT-3L, Neurofilina, Folistatina, BDNF y beta Actina como gen constitutivo en la línea celular MRC-5 de fibroblastos humanos en los siguientes grupos experimentales: a) MMEE, b) FILM, c) PMA, d) FILM+PMA.

El análisis se realiza por la doble derivada, donde Delta 1 (D1) es la razón de la expresión del gen problema sobre el gen constitutivo de las células sin tratar o tratadas, y Delta 2 (D2) es la relación de D1 de las células tratadas sobre D1 de las células no tratadas.

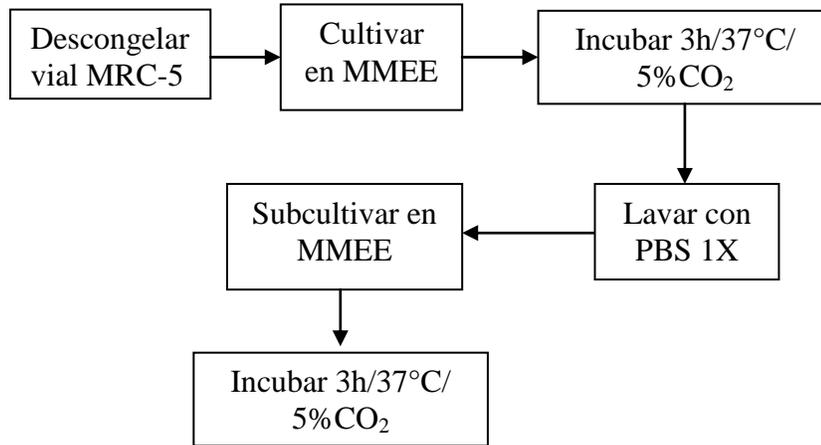
El % de expresión se obtuvo de la razón:
$$\frac{\text{Gen problema} / \beta\text{-Actina (tratado)}^3}{\text{Gen problema} / \beta\text{-Actina (no tratado)}^4}$$

³= FILM, PMA-FILM.

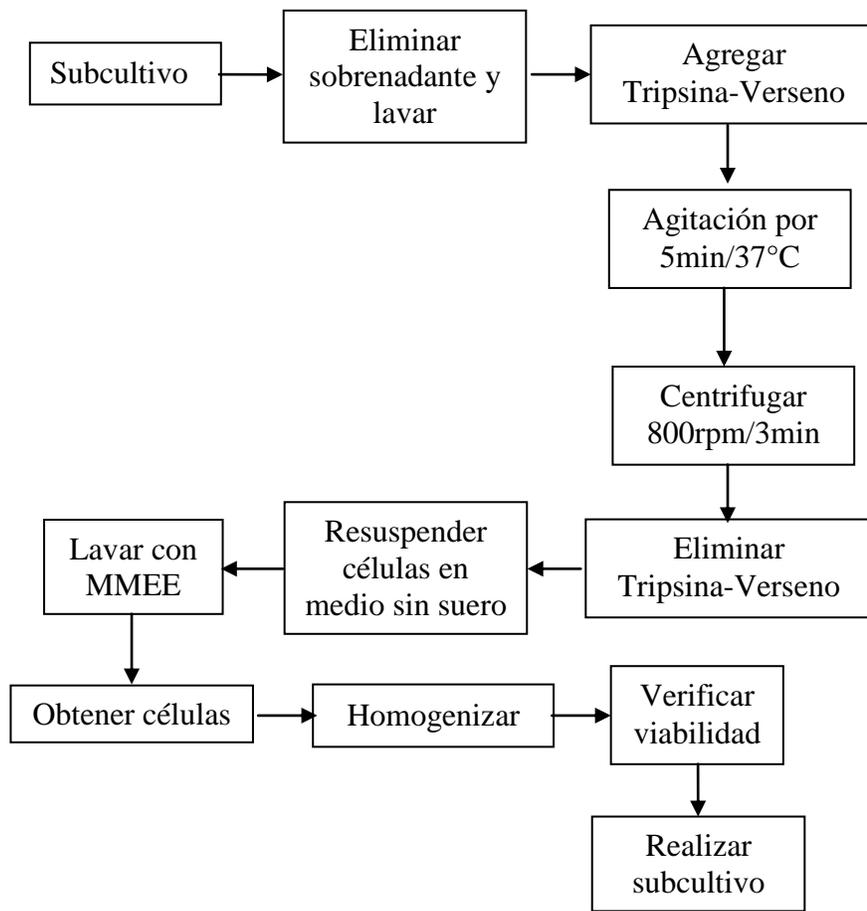
⁴= MMEE.

7. DIAGRAMA DE FLUJO

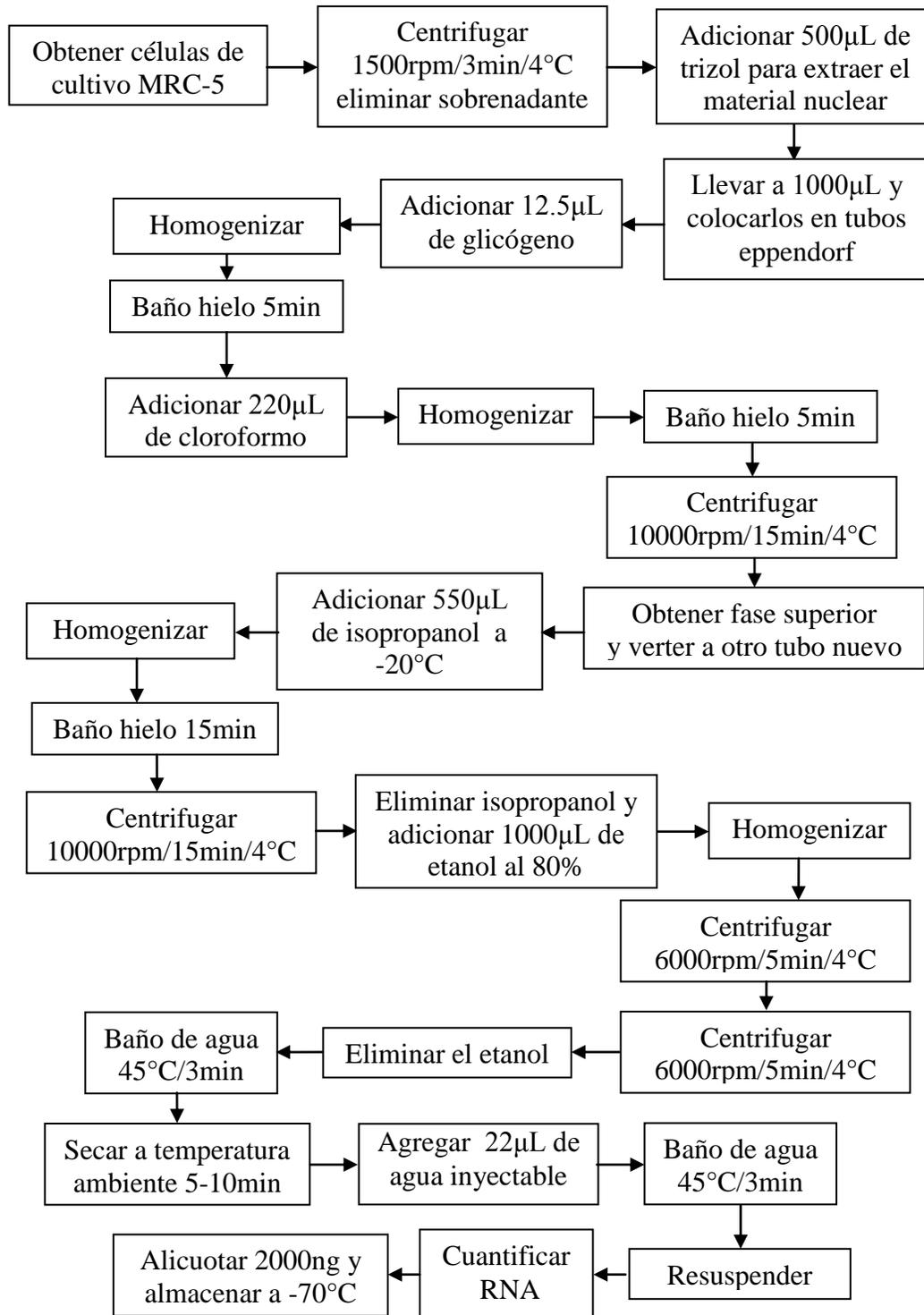
❖ Realización de cultivos celulares de la línea MRC-5 de fibroblastos humanos.



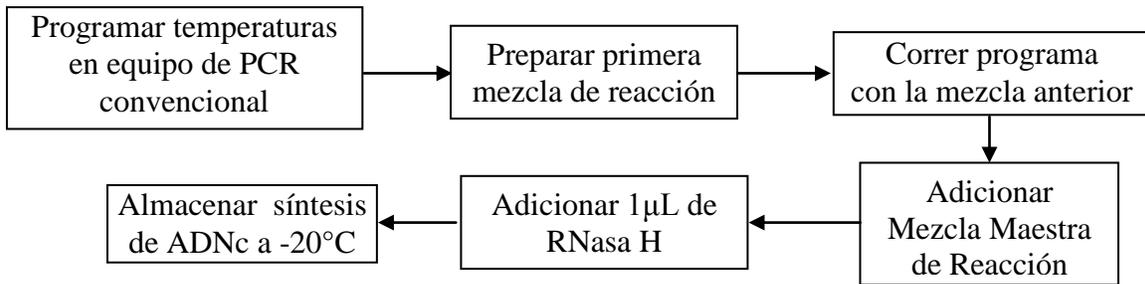
❖ Método de tripsinización de fibroblastos.



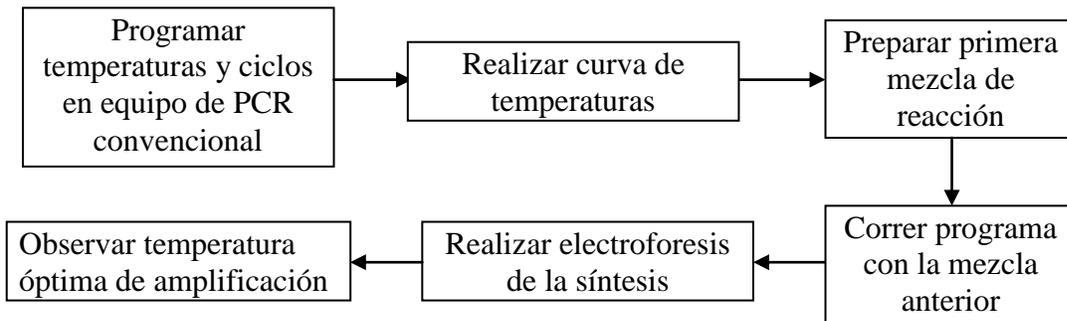
❖ *Extracción de ARN (método de Trizol®).*



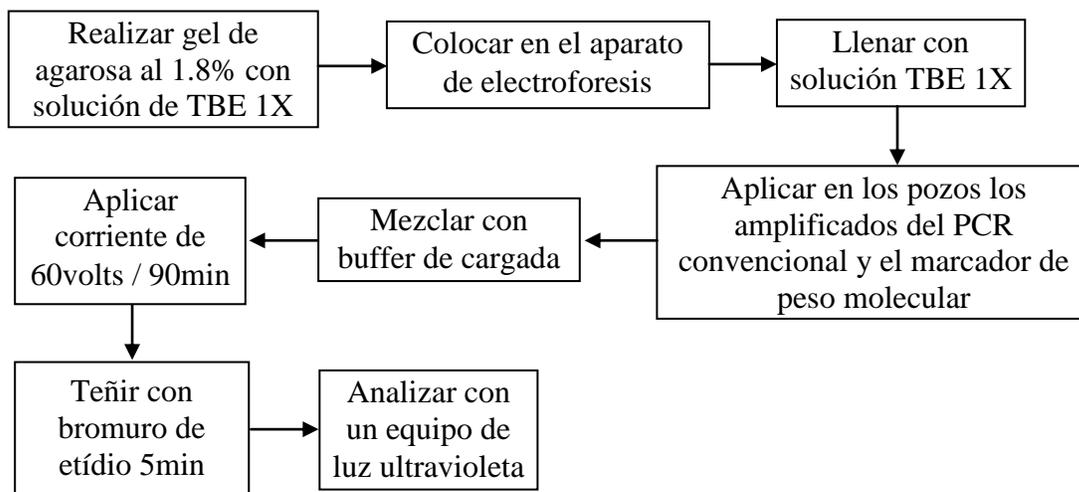
❖ *Síntesis de ADNc a partir de ARN de la línea celular MRC-5 de fibroblastos humanos.*



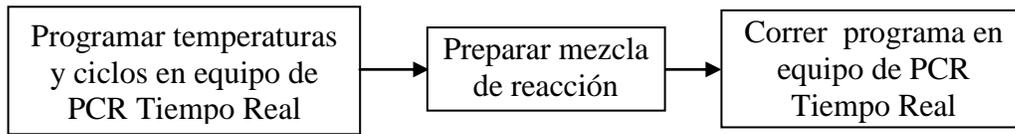
❖ *Estandarización de la técnica de PCR convencional.*



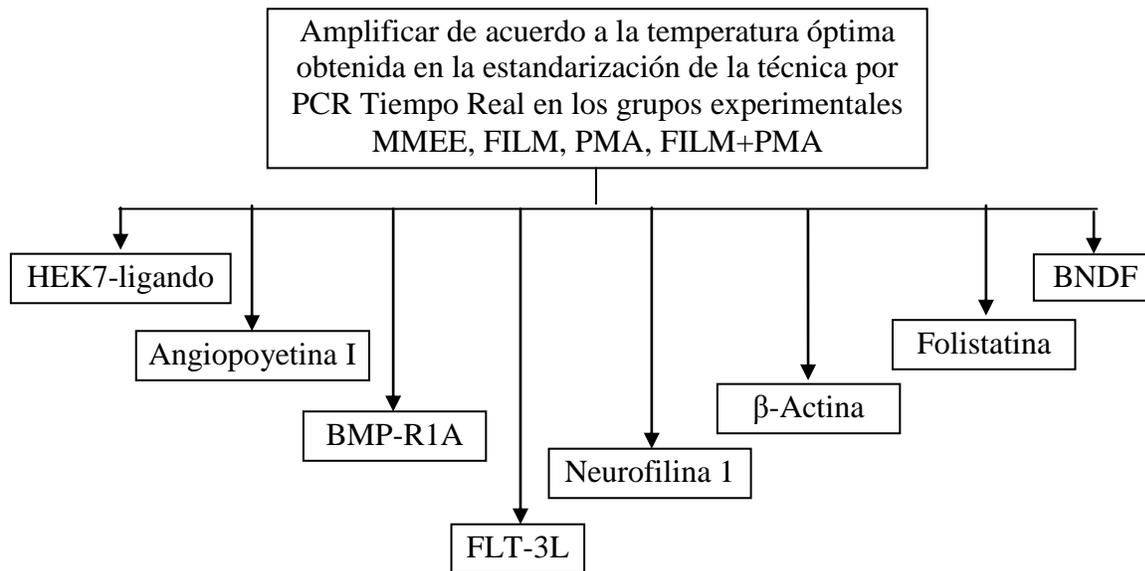
❖ *Electroforesis de muestras de PCR convencional.*



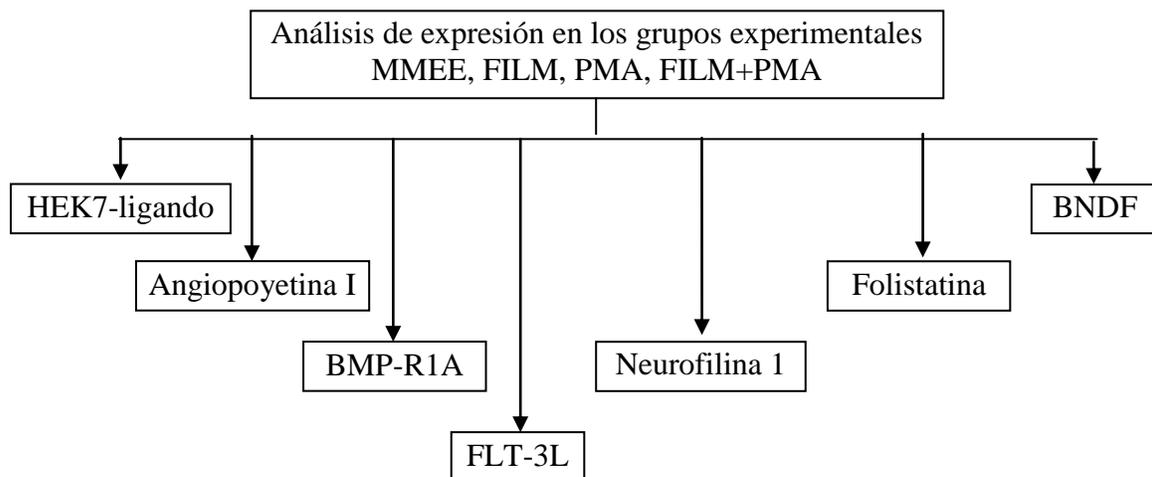
❖ *Estandarización de la técnica de PCR Tiempo Real.*



❖ *Amplificación por PCR Tiempo Real.*



❖ *Análisis de expresión.*



8. RESULTADOS

8.1 Obtención del ARNt.

Se confirmó la integridad del ARNt (figura 1) obtenido de los cultivos de la línea celular MRC-5 de fibroblastos humanos, en un gel de agarosa al 1.8%, las bandas características de las fracciones correspondientes al ARN ribosomal 28S y 18S son observables en cada uno de los grupos experimentales (MMEE, FILM, PMA, FILM+PMA).



Figura 1. Se muestra la integridad de ARNt de los grupos experimentales obtenidos de los cultivos de la línea celular MRC-5 de fibroblastos humanos en un gel de agarosa al 1.8% y un marcador de peso molecular (Mk) de 100pb.

8.2 Estandarización de la técnica de PCR convencional.

Se realizaron curvas temperaturas que comprendieron como inicio la temperatura teórica de amplificación de acuerdo al previo diseño de cebadores correspondientes a cada gen determinando la temperatura correspondiente de alineación de éstos (Tabla 10).

Gen amplificado	Temperatura Teórica (°C)	Temperatura óptima (°C)	Tamaño del Amplificado (pb)
HEK7-ligando	55.2	57	60
Angiopoyetina I	58.4	63	136
BMP-R1A	59.0	63	145
FLT-3L	55.0	57	114
Neurofilina 1	58.0	63	65
Folistatina	54.5	57	135
β -Actina	53.0	55	97
BDNF	58.0	63	147

Tabla 10.

Se muestran las temperaturas de amplificación teóricas y óptimas de cada gen problema de acuerdo a lo obtenido en los diseños de los cebadores y en la parte experimental observándose los amplificados esperados en cada caso.

Los cebadores generados para los genes en cuestión (figura 2) mostraron especificidad generando una sola banda de amplificación del tamaño esperado para los genes HEK7-

ligando, Angiopoyetina I, BMP-R1A, FLT-3L, Neurofilina 1, Folistatina, BDNF y β -Actina.

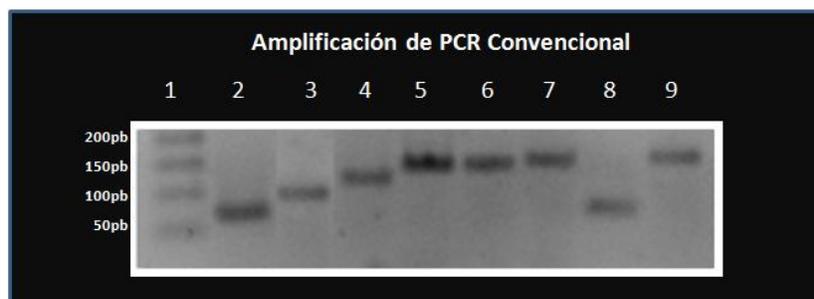


Figura 2. Se muestran los genes amplificados por PCR Convencional. 1) Marcador 50pb; amplificado de los genes: 2) HEK7-ligando (60pb), 3) β -Actina (97pb), 4) FLT-3L (114pb), 5) Folistatina (135pb), 6) Angiopoyetina I (136pb), 7) BMP-R1A (145pb), 8) Neurofilina 1 (65pb) y 9) BDNF (147pb).

8.3 Amplificación por PCR Tiempo Real con SYBR Green I.

Se programaron las temperaturas a utilizarse en el equipo de PCR convencional las cuales incluyeron una temperatura de preincubación, amplificación (desnaturalización, alineación y extensión), curvas de fusión (desnaturalización, alineación y fusión) y enfriamiento para la amplificación del gen en cuestión de acuerdo a los resultados obtenidos de la estandarización (Tabla 11).

Gen amplificado	Temperatura óptima (°C)	Alineación (seg)	Extensión (seg)
Ephirn A2 ligado a quinasa	59	8	5
Angiopoyetina I	65	8	5
BMP-R1A	65	8	5
FLT-3L	59	8	5
Neuropilina	64	8	5
Follistatina	60	5	4
B-Actina	59	8	5
BDNF	65	8	5

Tabla 11.

Se observan los valores obtenidos por PCR Tiempo Real en donde la temperatura, la alineación y la extensión son las óptimas para cada gen problema.

Se realizó la amplificación de los genes en estudio HEK7-ligando, Angiopoyetina I, BMP-R1A, FLT-3L, Neurofilina, Folistatina, BDNF y β -Actina, en donde se puede observar los valores de los Puntos de Cruce o Ciclo Promedio Cps (Cross point por sus siglas en inglés) para cada uno de los genes analizados, mientras que en los controles negativos no se detectó Cps hasta los 35 ciclos en ninguno de los casos, mostrando la especificidad de los cebadores; las reacciones de cada muestra se realizaron por duplicado (Figuras 3-18).

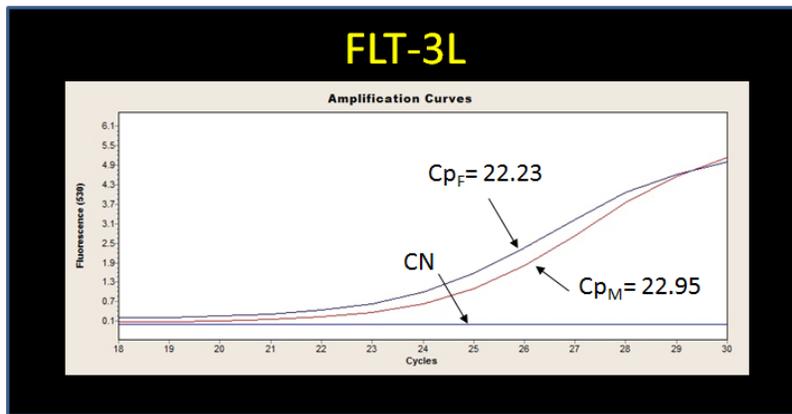


Figura 3. Curva para FLT-3L por PCR Tiempo Real utilizando un control negativo (CN). Se observa el punto de cruce para el ensayo no estimulado (C_{pM}) y con la adición de FILM (C_{pF}).

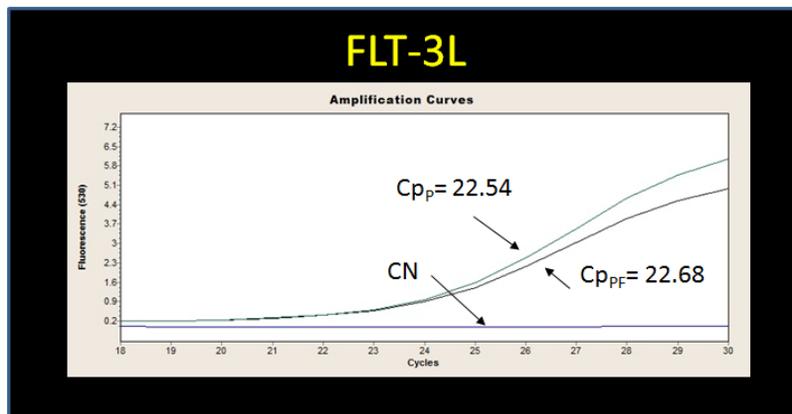


Figura 4. Curva para FLT-3L por PCR Tiempo Real utilizando un control negativo (CN). Se observa el punto de cruce para el ensayo estimulado con PMA (C_{pP}) y con la adición de PMA más FILM (C_{pPF}).

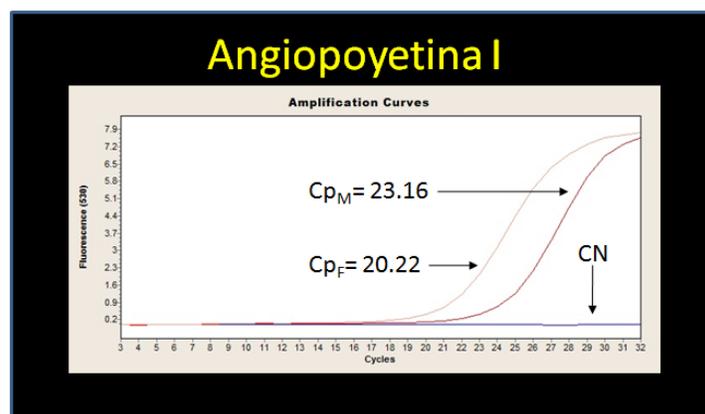


Figura 5. Curva para Angiopoietina I por PCR Tiempo Real utilizando un control negativo (CN). Se observa el punto de cruce para el ensayo no estimulado (C_{pM}) y con la adición de FILM (C_{pF}).

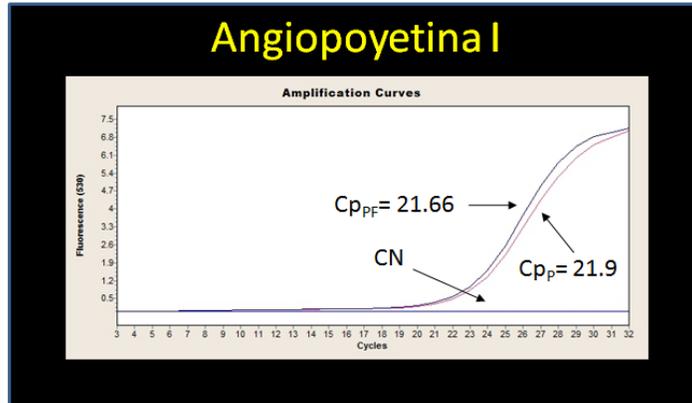


Figura 6. Curva para Angiopoyetina I por PCR Tiempo Real utilizando un control negativo (CN). Se observa el punto de cruce para el ensayo estimulado con PMA (Cp_P) y con la adición de PMA más FILM (Cp_{PF}).

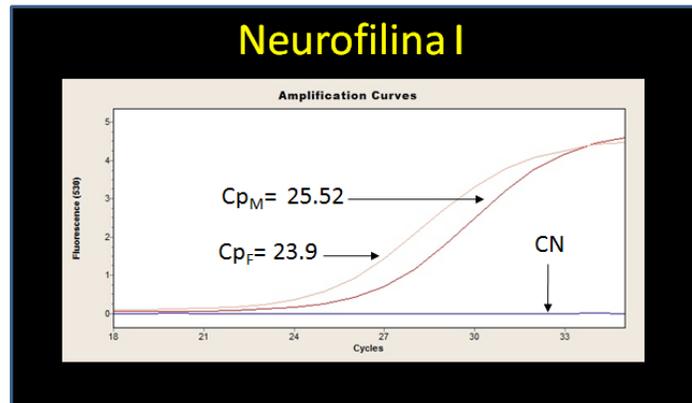


Figura 7. Curva para Neurofilina I por PCR Tiempo Real utilizando un control negativo (CN). Se observa el punto de cruce para el ensayo no estimulado (Cp_M) y con la adición de FILM (Cp_F).

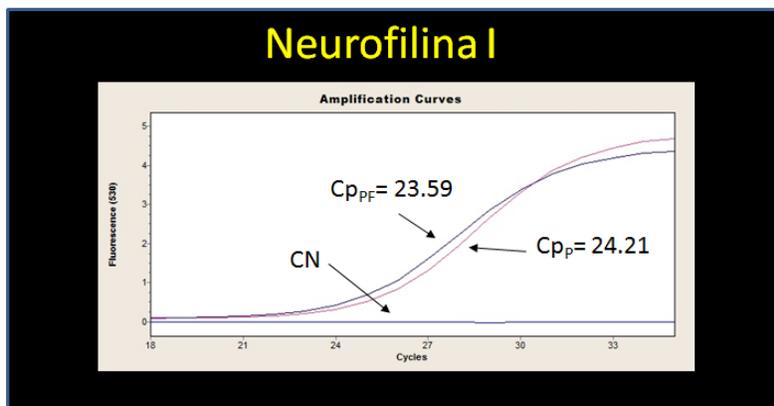


Figura 8. Curva para Neurofilina I por PCR Tiempo Real utilizando un control negativo (CN). Se observa el punto de cruce para el ensayo estimulado con PMA (Cp_P) y con la adición de PMA más FILM (Cp_{PF}).

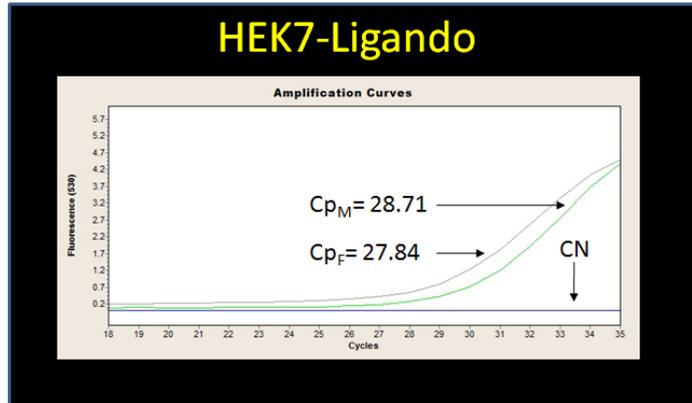


Figura 9. Curva para HEK7-Ligando por PCR Tiempo Real utilizando un control negativo (CN). Se observa el punto de cruce para el ensayo no estimulado (Cp_M) y con la adición de FILM (Cp_F).

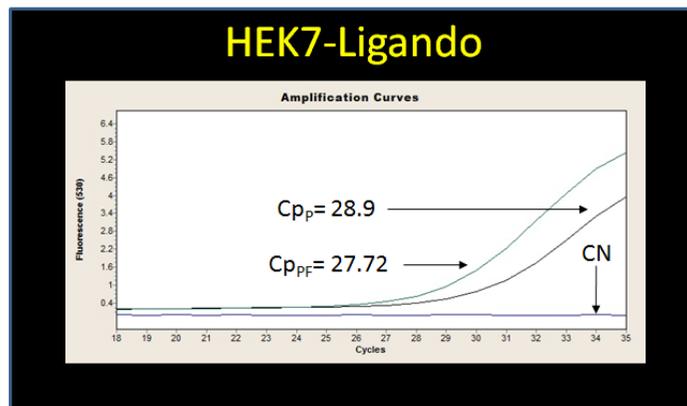


Figura 10. Curva para HEK7-Ligando por PCR Tiempo Real utilizando un control negativo (CN). Se observa el punto de cruce para el ensayo estimulado con PMA (Cp_P) y con la adición de PMA más FILM (Cp_{PF}).

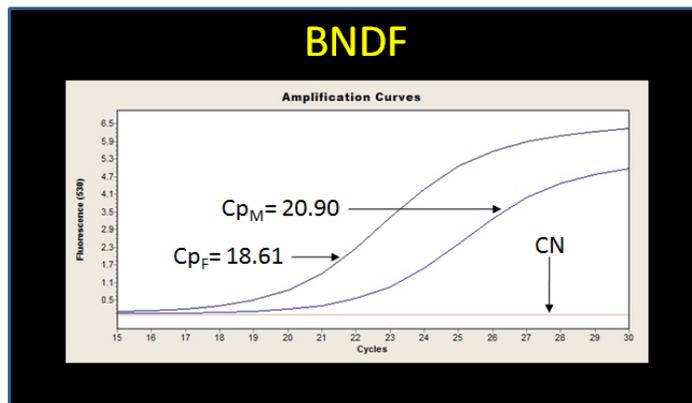


Figura 11. Curva para BDNF por PCR Tiempo Real utilizando un control negativo (CN). Se observa el punto de cruce para el ensayo no estimulado (Cp_M) y con la adición de FILM (Cp_F).

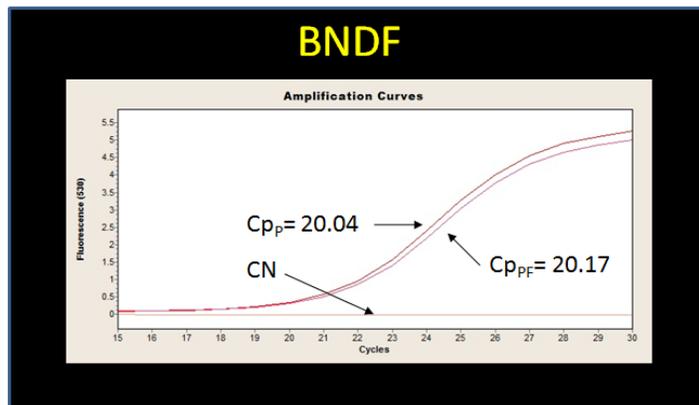


Figura 12. Curva para BDNF por PCR Tiempo Real utilizando un control negativo (CN). Se observa el punto de cruce para el ensayo estimulado con PMA (C_P) y con la adición de PMA más FILM (C_{D_{PF}}).

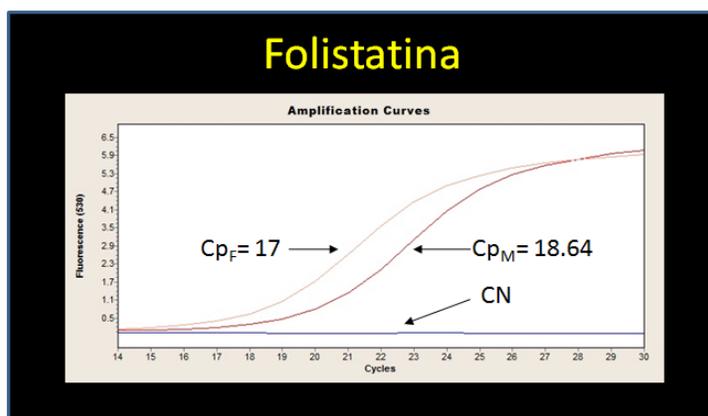


Figura 13. Curva para Folistatina por PCR Tiempo Real utilizando un control negativo. Se observa el punto de cruce para el ensayo no estimulado (C_M) y con la adición de FILM (C_F).

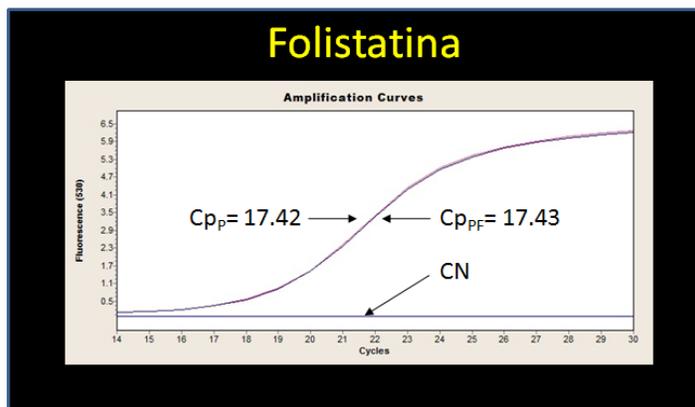


Figura 14. Curva para Folistatina por PCR Tiempo Real utilizando un control negativo. Se observa el punto de cruce para el ensayo estimulado con PMA (C_P) y con la adición de PMA más FILM (C_{D_{PF}}).

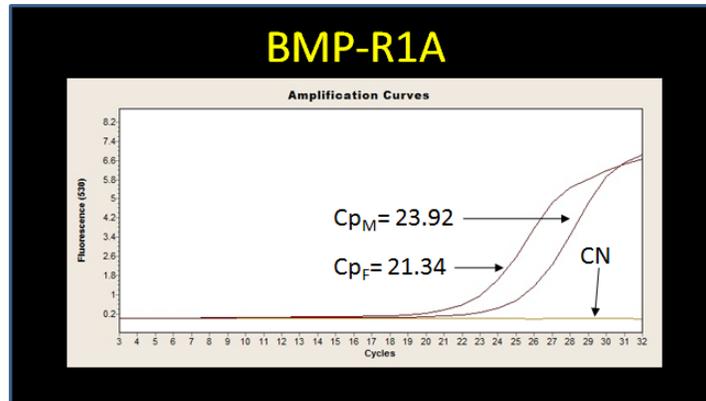


Figura 15. Curva para BMP-R1A por PCR Tiempo Real utilizando un control negativo (CN). Se observa el punto de cruce para el ensayo no estimulado (C_{pM}) y con la adición de FILM (C_{pF}).

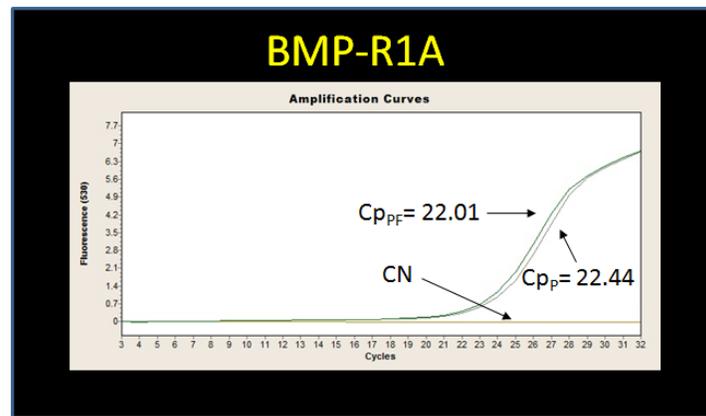


Figura 16. Curva para BMP-R1A por PCR Tiempo Real utilizando un control negativo (CN). Se observa el punto de cruce para el ensayo estimulado con PMA (C_{pP}) y con la adición de PMA más FILM (C_{pPF}).

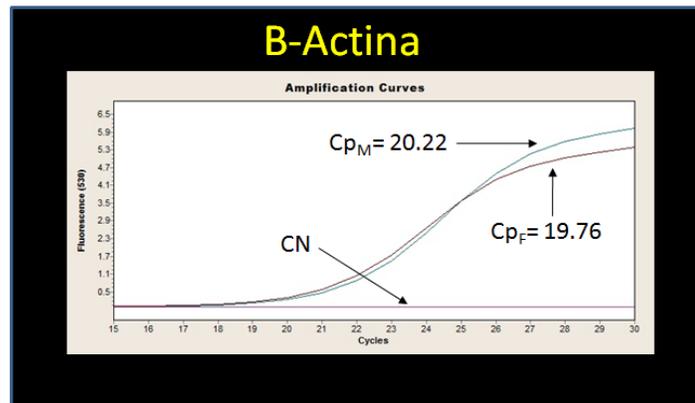


Figura 17. Curva para B-Actina por PCR Tiempo Real utilizando un control negativo (CN). Se observa el punto de cruce para el ensayo no estimulado (C_{pM}) y con la adición de FILM (C_{pF}).

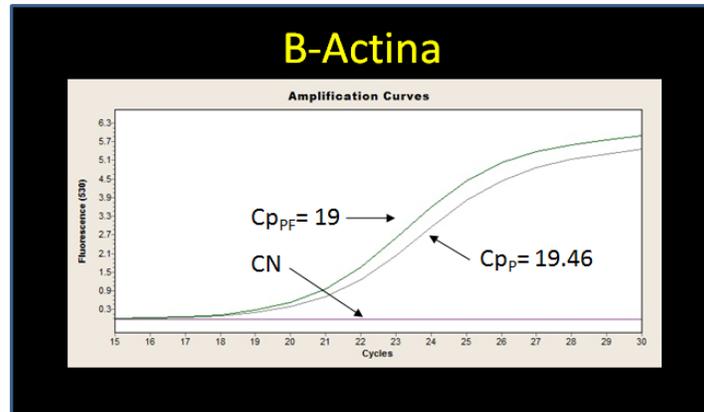


Figura 18. Curva para B-Actina por PCR Tiempo Real utilizando un control negativo (CN). Se observa el punto de cruce para el ensayo estimulado con PMA (C_{pP}) y con la adición de PMA más FILM ($C_{pP+FILM}$).

La identificación de los productos de PCR se confirmó por el análisis de las curvas de disociación (T_m) al término de las amplificaciones (Figuras 19-26). Las gráficas muestran las temperaturas de fusión T_m para los amplificadores en estudio, en donde los productos de reacción específicos para cada uno de los genes antes mencionados están representados por un pico máximo de fluorescencia.

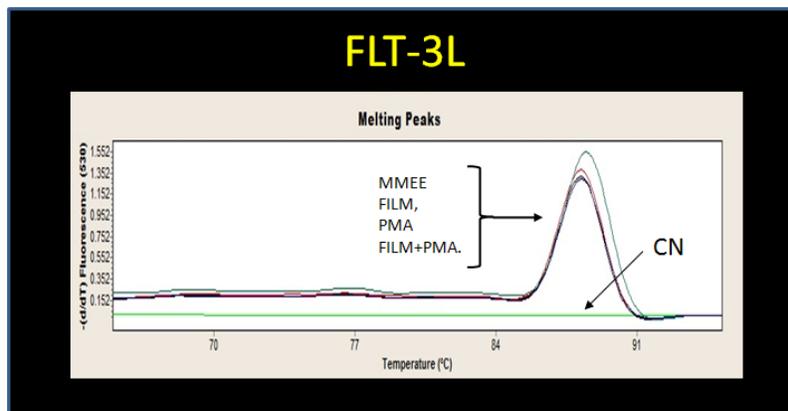


Figura 19. Curvas de disociación para el gen FLT-3L en los ensayos de PMA, PMA-FILM, FILM y no estimulado, comparado con un control negativo (CN).

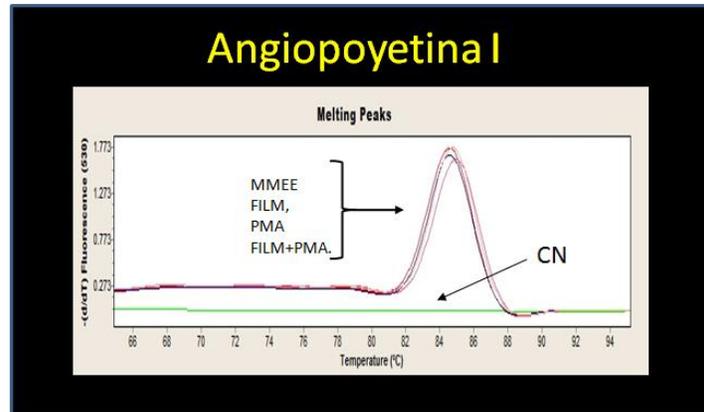


Figura 20. Curvas de disociación para el gen Angiopoyetina I en los ensayos de PMA, PMA-FILM, FILM y no estimulado, comparado con un control negativo (CN).

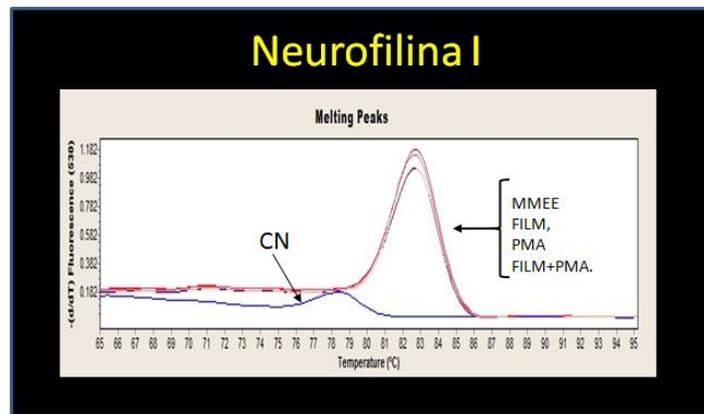


Figura 21. Curvas de disociación para el gen Neurofilina I en los ensayos de PMA, PMA-FILM, FILM y no estimulado, comparado con un control negativo (CN). Se observa formación de dímeros a 78°C.

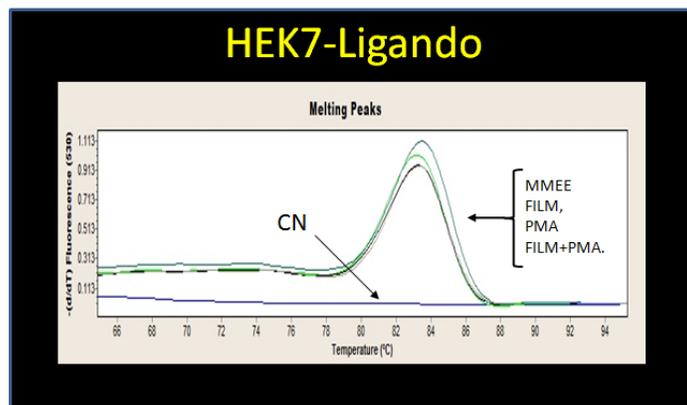


Figura 22. Curvas de disociación para el gen HEK7-Ligando en los ensayos de PMA, PMA-FILM, FILM y no estimulado, comparado con un control negativo (CN).

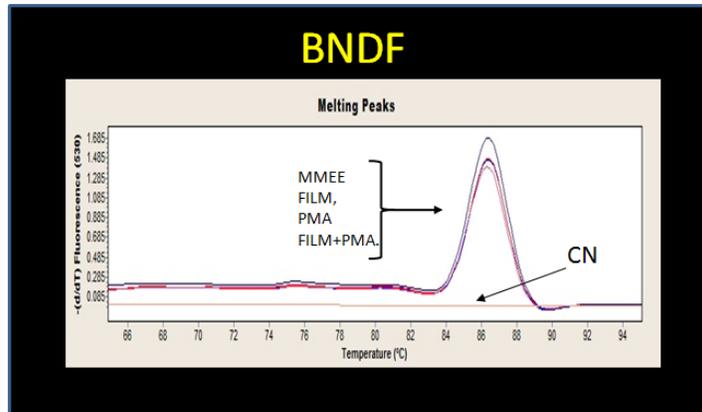


Figura 23. Curvas de disociación para el gen BDNF en los ensayos de PMA, PMA-FILM, FILM y no estimulado, comparado con un control negativo (CN).

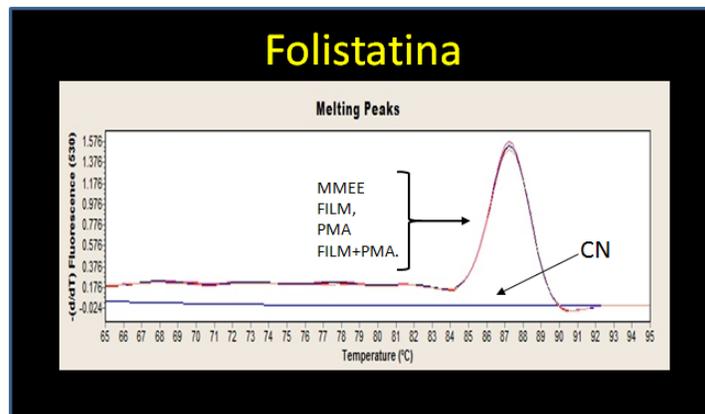


Figura 24. Curvas de disociación para el gen Folistatina en los ensayos de PMA, PMA-FILM, FILM y no estimulado, comparado con un control negativo (CN).

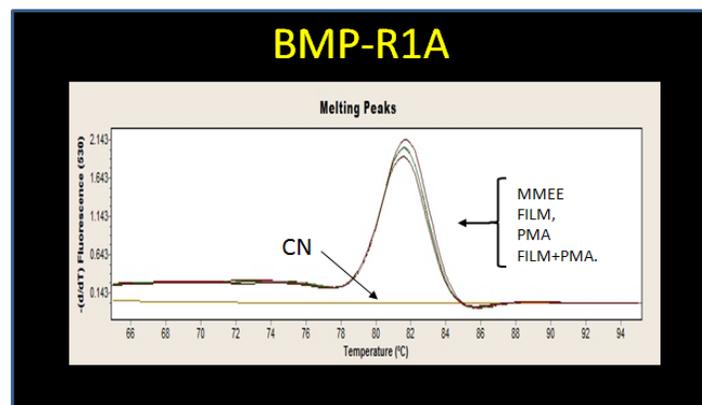


Figura 25. Curvas de disociación para el gen BMP-R1A en los ensayos de PMA, PMA-FILM, FILM y no estimulado, comparado con un control negativo (CN).

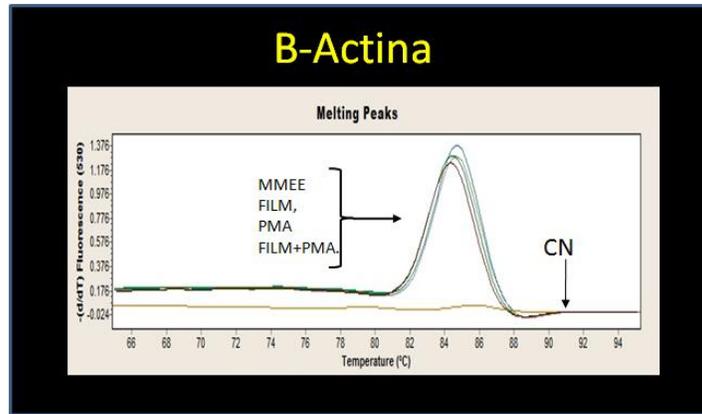
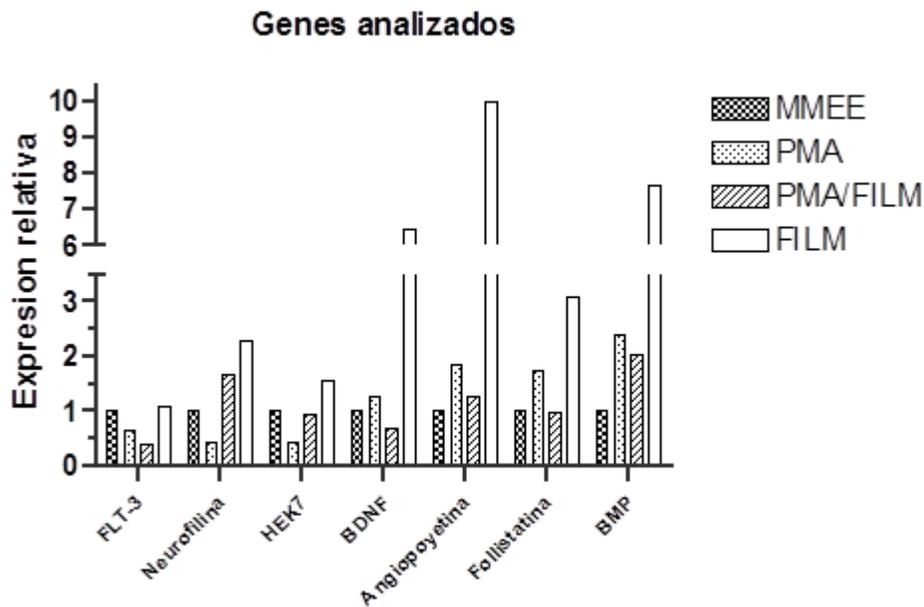


Figura 26. Curvas de disociación para el gen Beta-Actina en los ensayos de PMA, PMA-FILM, FILM y no estimulado, comparado con un control negativo (CN).

8.4 Perfil de expresión.

La Expresión Relativa (E.R.) se realizó por el método de Ct que es el ciclo umbral en el que se inicia y detecta la amplificación exponencial del templado (por sus siglas en inglés Cycle Threshold o Cp que es el punto de cruce), obteniendo un promedio de los valores de cada muestra, así como un promedio de la expresión de los genes seleccionados el cual se comparo con la expresión del gen constitutivo β -Actina y se le asigno un valor de 1 como normalización de la expresión. La gráfica 1 muestra el perfil de expresión de los genes analizados en la línea celular: sin estímulo (MMEE), estimuladas con FILM, PMA o PMA+FILM.



Grafica 1. Expresión relativa de los genes HEK7-ligando, Angiopoietina I, BMP-R1A, FLT-3L, Neurofilina, Follistatina y BDNF de fibroblastos humanos MRC-5 en los grupos experimentales (MMEE, FILM, PMA, FILM+PMA) comparado con la expresión del gen constitutivo.

9. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó el efecto del FILM sobre los cambios en la expresión de genes relacionados con la inflamación y la cicatrización en la línea celular MRC-5 de fibroblastos humanos utilizando la técnica de PCR Tiempo Real. La especificidad de la reacción de PCR es proporcionada por el par de cebadores y las condiciones óptimas de reacción. Con la adquisición de la fluorescencia durante el proceso de amplificación en el último paso de cada ciclo (temperatura superior a T_m de la formación de los dímeros, pero debajo de la T_m del producto específico), sólo registra la señal específica del producto amplificado de PCR. El resultado de la curva T_m permitió conocer la temperatura de disociación de cada amplificado en cada sistema de expresión (HEK7-ligando, Angiopoyetina I, BMP-R1A, FLT-3L, Neurofilina I, Folistatina, BDNF y β -Actina). Se obtuvo información sobre las funciones biológicas en las que participan los genes que modificaron su expresión en las condiciones empleadas.

El FILM posee diversos efectos anti-inflamatorios comprobados tanto *in vitro* como *in vivo*, afecta la quimiotaxis de mononucleares, cancela la explosión respiratoria y la producción de óxido nítrico en monocitos y neutrófilos humanos, abate la expresión de moléculas de adhesión VLA-4 y VCAM-1 en células del endotelio vascular y monocitos, altera el proceso inflamatorios como lo sugiere la inhibición de la hipersensibilidad retardada al dinitroclorobenceno (DNCB) en gerbos y cobayos, retrasa el arribo de células mononucleares en cámaras de Rebuck en la piel humana entre otras características, esta multiplicidad de efectos a diversos niveles del fenómeno inflamatorio sugiere que su acción biológica es diversa y altera la expresión de señales pro y anti-inflamatorias de las células que participan en el proceso inflamatorio. La regulación de la síntesis de mediadores de la inflamación lo hace blanco potencial como una terapia anti-inflamatoria (18,26,30).

La participación celular en el proceso inflamatorio es de orden cronológico; anteriormente se realizaron estudios en PMN y mononucleares, que son células que intervienen en el proceso inflamatorio en etapas tempranas, por lo que este trabajo representa el efecto del FILM en una estirpe celular (fibroblastos) que interviene en etapas tardías en el proceso inflamatorio.

Los fibroblastos también pueden producir citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos y pueden iniciar, amplificar y sobre todo modular algunos eventos relacionados con la respuesta inflamatoria. En este contexto el FILM afecta la expresión de los genes HEK7-ligando, Angiopoyetina I, BMP-R1A, FLT-3L, Neurofilina, Folistatina y BDNF.

El ligando tirosina quinasa 3 relacionado a FMS (FLT-3L) es una de las citocinas que afecta el desarrollo de múltiples linajes hematopoyéticos. Estos efectos ocurren a través de la unión de FLT3L al receptor FLT3 (FLT3R). FLT3R tiene un rango bastante estrecho de expresión de células, que se localiza principalmente en los tejidos hematopoyéticos y de los nervios, lo que presumiblemente limita sus funciones a estos tipos de células; por el contrario, su ligando se expresa en casi todos los tipos celulares hasta ahora examinadas.

En un proceso de activación celular (PMA) se observa que FLT-3L se encuentra por debajo del estado basal (no estimulado) en comparación con la adición de FILM que disminuye a

un mas su expresión. El gen FLT3R desempeña una función importante en la proliferación, diferenciación, apoptosis en las células durante la hematopoyesis normal, además de ser un factor quimiotático para células dendríticas, así como también para la proliferación de éstas y de células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés *Natural Killer*). El FLT-3L actúa en sinergia con otras citocinas para promover la expansión de precursores hematopoyéticos, y la interrupción selectiva de FLT-3L conduce a una reducción de precursores hematopoyéticos que no resulta letal, pero si benéfico al inhibir el arribo de células dendríticas y NK con su respectiva proliferación local y daño tisular en respuesta al agente patógeno, disminuyendo la respuesta crónica. En el estado no estimulado el factor no altera la hematopoyesis en forma significativa al encontrarse ligeramente por encima de la basal en un estado casi normal. Una de las características iniciales del efecto del FILM fue la inhibición del arribo celular de fagocitos mononucleares y en este proyecto el efecto del FILM sobre el gen FLT-3L y su relación con la quimiotaxis nos hace suponer que posiblemente el factor también inhibe indirectamente la quimiotaxis de otros tipos celulares afectando la respuesta inmunológica (53-57).

Existen varias moléculas que funcionan como mediadores críticos en la angiogénesis, entre ellas la familia Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF-A, B, C, D y E) y sus receptores (VEGF-1, 2, 3 y la Neurofilina), efrinas, angiopoyetinas y sus receptores entre otros. La familia de VEGFs son mitogenos específicos para células epiteliales, y sus receptores participan en la formación de los vasos sanguíneos, angiogénesis, reclutamiento celular y mantenimiento de la vascularización, su acción es regulada por la Neurofilina entre otros factores. VEGF coopera con otros factores angiogénicos como las angiopoyetinas que son esenciales para el último estado de la formación de los vasos (remodelación y maduración) y estabilizan el desarrollo de los mismos mediante el reclutamiento y la interacción celular. Las angiopoyetinas junto con VEGF potencian y sostienen el crecimiento y maduración de los capilares. Cabe señalar que en estudios anteriores de expresión se observó que el FILM sobreexpresó a VEGF y posiblemente para tener un balance en el ámbito inflamatorio, la expresión de la Neurofilina I se vio aumentada como se menciona más adelante (58-60).

Angiopoyetina I es una familia de factores de crecimiento endotelial que funcionan como ligandos para el receptor endotelial específico tirosina quinasa (TIE2) y se expresa típicamente en línea de base (es decir, no inflamada). La unión de la expresión de Angiopoyetina 1 a TIE2 promueve la integridad de los vasos sanguíneos, inhibe la pérdida vascular y es un factor quimiotático de células endoteliales.

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes. Mediante este importante proceso los vasos son capaces de acomodar su crecimiento al del organismo, aportar sangre a tejidos que quedan ocasionalmente desprovistos de aporte sanguíneo (p.e. en casos daño tisular) y adaptarse a las necesidades de oxígeno y nutrientes del entorno fisiológico. En un estado activado de la célula inducido por medio del mitógeno PMA se aumentó la expresión de Angiopoyetina I lo que generaría inhibición de la apoptosis, remodelación y bifurcación de los vasos sanguíneos y así mismo disminuiría el arribo de leucocitos que participaran durante la inflamación; con la adición del FILM durante el estado activado, la expresión de Angiopoyetina I se ve disminuida pero siguió encontrándose por encima de la basal; de esta forma el proceso de inflamación se vería

controlado reduciéndose la permeabilidad del endotelio vascular sin ser inhibido el estímulo angiogénico además de estar presente la actividad de la Neurofilina I en un estado sobre expresado. Cuando el FILM es adicionado en un estado no activado o se suprime ese estado en presencia del factor, la expresión de la Angiopoyetina I se ve incrementada favoreciendo la angiogénesis, mejorando la estabilización y maduración de los vasos recién formados, y se evitará posiblemente la formación de una cicatriz fibrosa con apoyo de la sobreexpresión de la Neurofilina I (61-64).

En estados de hipoxia por daño en tejidos se activan múltiples genes que favorecen la vasculogénesis y la angiogénesis como VEGF que promueve la activación del endotelio de vasos sanguíneos cercanos. Las neurofilinas son receptores de superficie celular que se unen a moléculas de guía neuronal durante el desarrollo neural y el crecimiento axonal y modulan la vasculogénesis-angiogénesis mediada por VEGF. Las Neurofilinas son receptores de semaforinas segregadas, así como de VEGF y se expresa abundantemente en células endoteliales de los vasos sanguíneos en desarrollo embrionario. Tras la estimulación con PMA en los fibroblastos MRC-5 se observa una disminución en la respuesta de la Neurofilina I por debajo de la basal, lo que conllevaría a un aumento del crecimiento axonal posiblemente por disminución de la unión con semaforinas y disminución en la angiogénesis medida por VEGF. Al agregar el factor en un medio estimulado con PMA la expresión de Neurofilina I se incrementó por encima de la basal; con esto se vería beneficiada la vasculogénesis-angiogénesis mediada por VEGF, favoreciendo la proliferación y migración de células endoteliales, organización tubular e inhibiendo la apoptosis, así como también se presenta una organización y ubicación espacial de los vasos sanguíneos (mediadas por la unión semaforinas-Neurofilina I) estimulados por Angiopoyetina I dando paso a la formación de un nuevo plexo vascular. La expresión de VEGF estimulado por el factor junto con la sobre expresión de Neurofilina I favorecería el crecimiento del endotelio acelerando la reendotelización después de una lesión promoviendo el remodelamiento y atenuando la cicatrización. Se desconoce la posible disminución que se tendría en el crecimiento axonal, por el aumento de la expresión de la Neurofilina I debido a que ésta requiere formar complejos con las proteínas Plexinas que funciona como correceptor para que se logre la unión con las semaforinas, esto último no forma parte del estudio en cuestión, sin embargo, en el sistema nervioso de mamíferos adultos se produce una inhibición de la regeneración de los axones tras una lesión debido a que el guiado axonal es importante después de una lesión para controlar su trayectoria e inhibir el acceso a zonas inadecuadas, efecto que se corrobora con aumento de la expresión de HEK7-L y la disminución de BDNF. En un estado basal la adición de FILM permitiría una adecuada regeneración vascular al aumentar la expresión de los genes Angiopoyetina I y Neurofilina I sobre tejido lesionado, y el posible efecto adverso sobre la disminución del crecimiento axonal se vería favorecido por la sobreexpresión de BDNF (65-68).

Los receptores Eph (erythropoietin-producing hepatocellular) y su ligando Efrin A2 ligado a quinasa (HEK7-Ligando) constituyen la mayor familia de receptores con actividad tirosina quinasa (RTKs) conocidos y se encuentran en gran variedad de tipos celulares durante el desarrollo y en tejidos maduros.

Los receptores Ephs y HEK7-ligando son reguladores clave de la formación de la guía axonal, sinaptogénesis y durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) son

capaces de transmitir señales extracelulares y de modular la migración de células progenitoras neuronales en el SNC en desarrollo, adhesión celular, regulan la supervivencia neuronal y la proliferación de células madre. Las efrinas (que se encuentran sub expresadas en nuestro sistema) regulan la función de moléculas de adhesión incrementándola hacia la matriz extracelular vía integrinas. HEK7-ligando es un regulador negativo de la proliferación de células progenitoras neurales, sin afectar la supervivencia celular. Estudios anteriores han demostrado que el FILM modifica la expresión de diversas integrinas y posiblemente HEK7-ligando funciona como un regulador negativo de expresión de las mismas.

Durante un proceso de activación celular (inducido por PMA) la expresión de HEK7-Ligando se ve disminuido por debajo de la basal con la finalidad de que se lleve a cabo una reparación del tejido nervioso lesionado y favoreciendo la migración leucocitaria. En estados tempranos de la inflamación el receptor EphA2 es sobre expresado en el endotelio y en células epiteliales, éste evento es la causa de la repulsión celular y la ruptura entre las barreras epitelial y endotelial, mientras que en los estados avanzados en un proceso de inflamación la expresión de las efrinas sobre los leucocitos y células epiteliales decrece, promoviendo la adhesión de los leucocitos hacia las células endoteliales, así, modulan la interacción migración/adhesión de varios tipos celulares. En presencia del factor en nuestro sistema la expresión del gen es llevado a un estado casi basal (7% por debajo de ésta), lo que evitaría reparar la sinaptogénesis durante un proceso de daño tisular en donde la misma inflamación no favorecería una adecuada neurogénesis y sinaptogénesis sin afectar la supervivencia celular; así mismo el factor aumenta la expresión del gen el cual está asociado con una disminución de adhesión entre células endoteliales de los vasos sanguíneos y en la adhesión de leucocitos circulantes hacia el endotelio vascular y hacia el epitelio de los órganos internos, estos cambios inhiben la extravasación y transmigración leucocitaria hacia el tejido, efecto que se vería también modulado por acción de FLT3-L, Angiopoyetina I y VEGF. Se mantendría un control de la inflamación con la disminución en la extravasación leucocitaria. En un estado basal la adición del factor no es benéfico debido a una disminución en la adhesión que tiene un papel crucial en las células para su organización lo que contribuye a la estabilidad del tejido, promoviendo la angiogénesis, la neovascularización y remodelación de la matriz extracelular, la guía axonal, la morfogénesis y la plasticidad del tejido, por lo que se tiene que valorar en modelos experimentales el costo-beneficio de los posibles efectos adversos (69-73).

El factor neurotrófico derivado de cerebro también conocido como BDNF es un miembro de la neurotrofina "familia de factores de crecimiento nervioso". BDNF actúa sobre ciertas neuronas del sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico, ayudando a apoyar la supervivencia de las neuronas existentes, y fomentar el crecimiento y la diferenciación de nuevas neuronas y las sinapsis. El BDNF está presente durante la neurogénesis por lo que juega un papel importante es el desarrollo neuronal normal. A pesar de su nombre, el BDNF se encuentra realmente en una amplia gama de tipos de células y tejidos, no sólo en el cerebro.

La adición de PMA en los cultivos promueve una neurogénesis sobre los tejidos nerviosos al verse expresado el gen BDNF por encima de la basal no siendo lo mismo en la adición concomitante con el factor en estudio, presentándose una disminución en la expresión por

debajo de la basal lo que implicaría una no regeneración mientras las células se encuentren activadas, efecto que se ve sumado a la acción de HEK7-L y la posible participación de la Neurofilina que también podrían disminuir la neurogénesis normal durante un proceso inflamatorio evitando una inadecuada regeneración neuronal y sinaptogénesis. Terminado el estímulo el factor promueve la neurogénesis y la formación de nuevos contactos sinápticos al sobreexpresarse por encima de la basal lo que podría compensar de cierto modo el efecto negativo de HEK7-L y la Neurofilina después de un proceso inflamatorio debido a que BDNF es una de las sustancias más activas para generar neurogénesis. Bajo las evidencias de expresión génica hasta ahora observadas *in vitro* se está valorando actualmente el efecto del FILM sobre la expresión de BDNF y otros genes relacionados con regeneración neuronal en ratas sometidas a una LTME y sus posibles efectos como neuroprotectores (74-76).

Los factores de crecimiento y diferenciación como las activinas, factor transformador de crecimiento beta (TGF- β), Proteínas Morfogénicas de Hueso (BMPs) y moléculas como la Folistatina entre otras, controlan muchos procesos biológicos orquestando y modulando el desarrollo programado, perfil de crecimiento, diferenciación, homeostasis, eritropoyesis, angiogénesis, función reproductora, respuesta inmune, formación de hueso, inductor de moléculas de matriz extracelular, fibronectina y colagenasa, crecimiento del hígado, regeneración, remodelación y reparación del tejido (77-78).

La Folistatina es una glicoproteína que se expresa en casi todos los tejidos y que se une directamente a las activinas. En los tejidos la activina tiene un importante papel en la proliferación celular, con lo que la Folistatina da protección contra la proliferación celular incontrolada y también le permite funcionar como un instrumento de diferenciación celular. Ambas funciones son esenciales en la reconstrucción y reparación de tejidos.

En base al sistema utilizado se detectó un aumento de la expresión del gen que transcribe para Folistatina por encima de la basal en un estado activado (activación con PMA) de las células con la finalidad de controlar la proliferación durante un daño y favorecer la diferenciación celular. En la sangre, la activina y Folistatina son conocidos por estar involucrados en la respuesta inflamatoria tras la lesión del tejido o incursión de patógenos. En estudios anteriores se observó el aumento de la expresión de las activinas, donde la fuente probable son los fibroblastos y las células endoteliales, actuando como agentes anti-inflamatorios locales en el sitio de lesión y sitios periféricos. La adición de PMA-FILM produce una disminución de la expresión del gen por debajo de la basal, permitiendo una regeneración de los tejidos de manera casi normal durante el proceso inflamatorio; sin embargo, el aumento prolongado y significativo de las activinas podría estar involucrado en el desarrollo de fibrosis (participación de TGF- β entre otros), por lo que es necesario un control fino de los niveles de expresión de las activinas para lograr una reparación normal del tejido dañado estimulando la deposición del tejido. La Folistatina es una proteína que se une a las activinas y BMPs modulando su acción y neutralizando su actividad biológica. Al término del estímulo con PMA y en presencia del factor se favorecería el crecimiento epitelial e inhibición de la apoptosis al inhibirse BMP por acción de la Folistatina con una sobreexpresión por encima de la basal. La expresión de las activinas y Folistatinas se requiere para modular la expresión de IL-1 β , IL-6 y proteínas de fase aguda, controlando la integridad vascular después de la lesión del tejido, por lo que el proceso inflamatorio se

limita, minimiza el daño al tejido y facilita el proceso de reparación. En estudios anteriores *in vitro* se observó que el FILM inhibe la síntesis de IL-1 β e IL-6 en células premonocíticas, apoyando con esto el efecto del FILM sobre el proceso inflamatorio (29, 34,79-81).

Los BMPs integran la superfamilia de TGF- β , sus miembros modulan la proliferación celular, diferenciación, síntesis de matriz y apoptosis. Sin embargo, los BMPs sólo están implicados en el desarrollo prenatal y posnatal de crecimiento, remodelación y mantenimiento de una variedad de otros tejidos y órganos. Asimismo, son fuertes inductores del crecimiento de tejido conectivo y tejido conjuntivo. Todos los miembros de la familia de las BMPs ejercen su acción celular uniéndose a dos tipos de receptores transmembranales (receptores tipo I y tipo II). La unión al receptor tipo II induce activación del receptor tipo I. Los receptores tipo I determinan la especificidad de las señales intracelulares. Existen tres receptores tipo I que transducen la señal de los miembros de la familia de las BMPs entre los que se encuentra BMPR-1A.

En el proceso inflamatorio se realiza la activación del receptor de tipo I BMP-R1A por encima de la basal lo que inicia, promueve y regula el desarrollo, remodelamiento, reparación, crecimiento de hueso, cartílago y otros tejidos; aunque en presencia del factor durante la activación celular se presentó una disminución de la respuesta del receptor BMP-R1A ésta es favorable debido a que en esencia, los TGF- β son inhibidores del crecimiento epitelial, de la función inmunológica y hematológica promoviendo asimismo la apoptosis y su actividad incrementada favorece la fibrosis; con ello se disminuiría éste efecto. El FILM sin adición de otro estímulo (PMA) indujo una sobreexpresión del gen con lo que el proceso de desarrollo, remodelación y reparación ósea se lleven de manera óptima al ser eliminada la causa de inflamación pero se vería regulada por acción de la Folistatina presentándose una disminución en la actividad del BMP-R1A en BMP-2, -4, -6, -7 y -11 que afectaría a la formación de cartílago y regulación de calcio en hueso principalmente, sin embargo el costo-beneficio es que se inhibiría BMP-2, -4, y -7 que participan en la regulación de la apoptosis acelerándola; la regeneración y reparación de tejido, hueso y otros órganos sería beneficiada pero se necesitaría una regulación minuciosa en la dosis para prevenir fibrosis e inmunosupresión (82-84).

10. CONCLUSIONES

- a) El FILM es capaz de alterar la expresión de los genes HEK7-ligando, Angiopoyetina I, BMP-R1A, FLT-3L, Neurofilina, Folistatina y BDNF involucrados en la inflamación y cicatrización.

Con el efecto sobre la expresión de los genes estudiados *suponemos* que:

- b) Se regula la permeabilidad vascular.
- c) Promueve la vasculogénesis-angiogénesis mediada por VEGF.
- d) Inhibe la adhesión de leucocitos circulantes hacia el endotelio vascular y tejido.
- e) Inhibe el arribo de células dendríticas.
- f) Inhibe la proliferación de células dendríticas y células NK.
- g) Favorece la diferenciación, proliferación y remodelación celular.
- h) Favorece la neurogénesis y la sinaptogénesis.
- i) Inhibe la apoptosis.

Con lo anterior mencionado y los antecedentes del factor se sugiere que el FILM promueve la modificación de genes que intervienen en la respuesta inflamatoria y de cicatrización facilitando un retorno a la normalidad estructural y funcional de él o los órganos afectados.

11. PERSPECTIVAS

Los genes alterados presentados en el estudio sugieren el posible comportamiento que estos tendrían en el organismo durante un proceso inflamatorio en donde estos participarían; por tal motivo se sugiere el estudio de la expresión de los genes reflejada en la producción de proteínas y su comportamiento de ambas, expresión génica *in vivo* y la producción de proteínas *in vivo e in vitro*. Con la finalidad de conocer de forma más amplia el comportamiento del FILM e ir sentando las bases de una investigación se sugiere un estudio más amplio de expresión de genes y producción de proteínas que nos dé una pauta del mecanismo de acción del FILM en procesos inflamatorios y así mismo dirigir su aplicación a diferentes patologías en donde la inflamación es un proceso común y el FILM podría atacar dianas importantes que servirían como anti-inflamatoria.

12. ANEXOS

Preparación de reactivos.

PBS 1X

8 g NaCl
0.2 g KCl
1.44 g Na₂HPO₄
0.24 g KH₂PO₄

En 800mL de agua destilada se disolvieron los reactivos uno a uno y se ajustó el pH a 7.4 con HCl o con NaOH. Se aforó a un litro con agua y se esterilizó en autoclave.

TBE 1X

10.8g Tris base
5.5 Ácido bórico
0.744 Na₂EDTA*2H₂O(MW=372.24)

En 600mL de agua destilada se disolvieron uno a uno los reactivos y se aforó a 1000mL.

MEDIO DE CULTIVO MMEE

Suplementado con:
2mM L-glutamina
1.5g/L Bicarbonato de sodio
Glucosa 4.5g/L
10mM HEPES
1.0mM Piruvato de sodio
10% Suero fetal bovino

13. REFERENCIAS

1. Gallin J, Snyderman R. Inflammation: basic principles and clinical correlates. 3 ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1999;35-48.
2. Duffield J, The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. Clin Sci. 2003;104:27-38.
3. Sigal H, and Yacov R. Immunology and inflammation basic mechanisms and clinical consequences. USA: Mc Graw-Hill; 1994.
4. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. New Eng: J Med. 1999;341(10):738-46.
5. Martin P. Wound healing- aiming for perfect skin regeneration. Science. 1997;276:75-81.
6. Robbins S, Cotran R, Kumar V. Pathologic basis of disease. 5th ed USA: W.B. Saunders Company. 1994:51-92.
7. Brodt P. Cell adhesion and invasion in cancer metastasis. U.S.A: R.G. Landes Company. 1996:1-10.
8. Wilkinson PC. Assays of leukocyte locomotion and chemotaxis. J Immunol Methods. 1998;216:139-53.
9. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol. 1999;17:593-623.
10. Luscinskas FW, Gimbrone MA. Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leucocyte recruitment. Annu Rev Med; 1996;47:413-21.
11. Adams DH, Lloyd AR. Chemokines: leucocytes recruitment and activation cytokines. Lancet. 1997;349:490-95.
12. Ravdin JJ. Amebiasis. Clin Infec Dis. 1995;20:1453-66.
13. Celis A, Alva J. "Patología de la pobreza". Rev Med Hosp Gen Mex. 1970;33:371-86.
14. Walsh JJ. In: Amebiasis, human infection by *Entamoeba histolytica*. ed Churchill Livingstone. New York. 1988:93-105.
15. Trissl D, Martínez-Palomo A, Argüello C, de la Torre M, de la Hoz R. Surface properties related to concanavalin A-induced agglutination. A comparative study of several *Entamoeba* strains. J Exp Med. 1977;145:652-55.

16. Pérez-Tamayo R, Brandt H. Amebiasis In: Marcial Rojas. Pathology of protozoan and helminthic disease. Baltimore: Williams and Wilkins. 1971:145-188.
17. Jervis HR, Takeuchi A. Amebic dysentery, animal model: experimental *Entamoeba histolytica* infection in the germfree guinea pig. Am J Pathol. 1979;94:197-200.
18. Kretschmer R, Collado ML, Pacheco MG, Salinas MC, López-Osuna M, et al. Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. Parasite Immunol. 1985;7:527-43.
19. Giménez-Scherer JA, Pacheco Cano MG, Cruz de Lavin E, Hernández-Jauregui P, Merchant MT, et al. Ultrastructural changes associated with the inhibition of monocyte chemotaxis caused by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. Lab Invest. 1987;57(1):45-51.
20. 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.
21. 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.
22. Salata RA, Pearson RD, Ravdin JI. Interaction of human leucocytes and *Entamoeba histolytica*. Killing of virulent amebae by the activated macrophage. J Clin Invest. 1985; 76:491-99.
23. Wang W, Keller K, Chadee K. *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells. Immunol. 1994;83:601-10.
24. Ravdin JI and Guerrant RL. A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. Rev Infect Dis. 1982;4:1185-207.
25. 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. 2003;90:264-67.
26. Giménez-Scherer J, Rico R, Fernández-Diez J, Kretschmer RR. Inhibition of contact cutaneous delayed hypersensitivity reactions to DNCB in guinea pigs by the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by axenically grown *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res. 1997;28 suppl: 237-38.
27. Kretschmer RR, Rico RG, Giménez-Scherer J. A novel anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol. 2001;112:201-09.

28. Velázquez RJ, Kretschmer RR. *Entamoeba histolytica*, a remarkable anti-inflammatory parasite. *Immunol.* 2004;23:201-07.
29. Utrera-Barillas D, Velázquez JR, Enciso A, Cruz SM, Rico RG, et al. An anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica* down-regulates the expression of pro-inflammatory chemokines. *Parasite Immunol.* 2003;25(10):475-82.
30. Giménez-Scherer JA, Arenas E, Díaz L, Rico RG, Kretschmer RR. 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.* 2000;31 (4suppl): 92-3.
31. Bermeo G. Evaluación del efecto del FILM en la recuperación motriz, producción de ceruloplasmina, nitritos y peroxidación lipídica en animales con lesión traumática en médula espinal. Tesis de licenciatura. UNAM. 2009.
32. Rico RG, Díaz GO, Kretschmer RR. Cyclic nucleotide changes induced in human leukocytes by a product of axenically grown *Entamoeba histolytica* that inhibits human monocyte locomotion. *Parasite Res.* 1995;81(2):158-62.
33. Giménez Scherer JA, Cárdenas G, López-Osuna M, Velázquez JR, Rico G, et al. Immunization with a tetramer derivat of an anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica* protects gerbils (*Meriones unguiculatus*) against experimental amoebic abscess of the liver. *Parasite Immunol.* 2004;26:343-49.
34. Silva-García R, Estrada-García I, Ramos-Payán R, Torres-Salazar A, Arenas-Aranda D, et al. The effect of anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica* on gene expression in the U-937 monocytic line. *Inflamm Res.* 2008;57;145-150.
35. Ledesma SY. Efecto modulador del FILM sobre la regulación de IL-1 β en células mononucleares humanas. XVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Inmunología. Chihuahua, Chihuahua 2006.
36. Sara Rojas, Guadalupe Rico, Julia Pérez, Juan Velázquez, Raúl Silva, et al. Cytokine expression in CD4+ cells exposed to the monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res.* 2006;98:493-95.
37. Velázquez JR, Utrera BD, Zentella A, García BE, Ledesma SY, Kretschmer RR. The amebic anti-inflammatory monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) modifies the NF-kB nuclear translocation in human monocytes. *Eur: Cytokine Netw.* 2003;14:64.
38. Mullis BK. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 1990;262:56-65.
39. Bruce A, Johnson A. *Biología molecular de la célula.* 4a ed. Barcelona: Editorial Omega. 2002;508-9.

40. McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J, et al. A physical map of the human genome. *Nature*. 2000;409:934-41.
41. Rodriguez IP, Barrera H. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. 2004;7:323-32.
42. Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends Mol Med*. 2003;9:189-95.
43. Templeton KE, Scheltinga SA, Graffelman WA, Van Schie JM, Crielaard JW, Sillekens P, et al. Comparison and evaluation of real time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4366-71.
44. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22:299-305.
45. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Biotech*. 1992;24:476-80.
46. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific ADN sequences. *Biotech*. 1992;10:413-7.
47. Deepi Parashar, Chauhan DS, Sharma VD, Katoch VM. Applications of real time PCR technology to mycobacterial research. *Ind J Med Res*. 2006;385-98.
48. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, et al. Real time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19:165-256.
49. Zimmermann K, Mannhalter J. Technical aspects of quantitative competitive PCR. *Biotechniques*. 1996;21:268-72, 274-79.
50. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechnique*. 1999;26:112-25.
51. Morrison TB, Weiss JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*. 1998;24:954-62.
52. Ramos-Payán- R, Aguilar-Medina M, Estrada-Parra S, González-Merchand JA, Favila-Castillo L, et al. Quantification of cytokine gene expresión using an economical real-time polymerase chain reaction metod based on SYBR Green I. *Scand J Immunol*. 2003;57:439-45.

53. McKenna, Hilary J. "Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells". *Blood*. 2000; 95:3489-97.
54. Drexler H, Quentmeier H. "FLT3: receptor and ligand". *Growth Factors*. 2004;22(2):71-73
55. Hannum C, Culpepper J, Campbell D. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of hematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature*. 1994;368(6472):643-48.
56. Lyman SD, James L, Johnson L. Cloning of the human homologue of the murine FLT3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1994;83(10):2795-801.
57. Rusten LS, Lyman SD, Veiby OP, Jacobsen SE. The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells *in vitro*. *Blood*. 1996;87(4):1317-25.
58. Mamluk R, Klagsbrun M, Detmar M, Bielenberg DR. Soluble neuropilin targeted to the skin inhibits vascular permeability. *Angiogenesis*. 2005;8:217-27.
59. Chae JK, Kim I, Lim ST, Chung MJ. Coadministration of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:2573-78.
60. Emanuelli C, Schratzberger P, Kirchmair, Madeddu P. Paracrine control of vascularization and neurogenesis by neurotrophins. *Br J Pharmacol*. 2003;140:614-19.
61. Tufro-Mcreddie A. 'Oxygen regulates VEGF-induced vasculogenesis and tubulogenesis'. *Dev Biol*. 1997;183:139-49.
62. Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, et al. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*. 1998;282:468-71.
63. Thurston G, Wang Q, Baffert F, Rudge J, Papadopoulos N, et al. Angiopoietin 1 causes vessel enlargement, without angiogenic sprouting, during a critical developmental period. *Development*. 2005;132:3317-26.
64. Gamble JR, Drew J, Trezise L, Underwood A, Parsons M, et al. Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent *in vitro* and targets cell junctions. *Circ Res*. 2000;87:603-07.
65. Artigiani S, Comoglio P, Tamagnone L. Plexins, semaphorins and scatter factor receptors: a common root for cell guidance signals? 1999;477-82.

66. Nakamura F. 'Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance'. *J Neurobiol.* 2000;44(2):219-29.
67. Mamluk, Roni, Gechtman Ze'ev, Kutcher Matthew E, Gasiunas Nijole, et al. "Neuropilin-1 binds vascular endothelial growth factor 165, placenta growth factor-2, and heparin via its b1b2 domain". USA: *J. Biol. Chem.* 2002;277 (27): 24818–25.
68. Chen H, Chedotal A, He Z, Goodman CS, Tessier-Lavigne M. "Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins sema E and sema IV but not sema III". *Neuron.* 1997;19(3):547–59.
69. Martínez A, Soriano E. Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005;49:211–26.
70. Holmberg J. Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes Dev.* 2005;19:462–71.
71. Ivanov A, Romanovsky A. Putative dual role of ephrin-Eph receptor interactions in inflammation. *IUBMB Life.* 2006;58:389-94.
72. Zamora DO, Babra B, Pan Y, Planck SR. Human leukocytes express ephrinB2 which activates microvascular endothelial cells. *Cell Immunol.* 2006;242:99-109.
73. Himanen JP, Nikolov DB. Eph receptors and ephrins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:130-34.
74. Binder DK, Scharfman HE. "Brain-derived neurotrophic factor". *Growth Factors.* 2004;22 (3):123–31.
75. Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, et al. "BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage". USA: *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105 (7):2711–16.
76. Huang EJ, Reichardt LF. "Neurotrophins: roles in neuronal development and function". *Annu. Rev. Neurosci.* 2001;24:677–736.
77. Vale W, Hsuh A, Riviel C, Yu S. The inhibin/activin family of growth factor. In peptide growth factors and their receptors. Eds Ma, sporn and Roberts, Heidelberg; Springer Verlag, Handbook of experimental pharmacology. pp 211-48.
78. Bilezikjian LM, Blount AL, Donaldson CJ, Vale WW. Pituitary actions of ligands of the TGF-beta family: activins and inhibins. *Reproduction.* 2006;132:207-15.
79. Kretser DM, Hedger MP, Phillips DJ. Activin and follistatin: their role in the acute phase reaction and inflammation. *J Endocrinol.* 1999;161:195-98.

80. Kozian DH, Ziche M, Augustin HG. The activin-binding protein follistatin regulates autocrine endothelial cell activity and induces angiogenesis. *Lab Invest.* 1997;76:267-76.
81. Phillips DJ, Jones KL, Scheerlinck JY, Hedger MP, de Kretser DM. Evidence for activin A and follistatin involvement in the systemic inflammatory response. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;180:155-62.
82. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 1996;10:1580-94.
83. Lories RJ, Derese I, Luyten FP. Modulation of bone morphogenetic protein signaling inhibits the onset and progression of ankylosing enthesitis. *J Clin Invest.* 2005;115:1571-79.
84. Chen Di, Zhao, Ming y Mundy, Gregory R. "Bone Morphogenetic Proteins". *Growth Factors.* 2004;22 (4):233–241.