



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**RELACIÓN DE TSG-6 EN EL USO DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES COMO TERAPIA ALTERNATIVA EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE EPOC**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ERICK FELIPE RAMÍREZ GUTIÉRREZ



**DIRECTOR DE TESIS:
BIOL. JESÚS ALQUICIRA MIRELES
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.
2018**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1.- Datos del alumno

Apellido paterno	Ramírez
Apellido materno	Gutiérrez
Nombre(s)	Erick Felipe
Teléfono	70430318
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	310147200

2.- Datos del tutor

Grado	Biol.
Nombre(s)	Jesús
Apellido paterno	Alquicira
Apellido materno	Mireles

3.- Datos del Sinodal 1

Grado	Dra.
Nombre(s)	Patricia
Apellido paterno	Segura
Apellido materno	Medina

4.- Datos del Sinodal 2

Grado	Dra.
Nombre(s)	Elsa Guadalupe
Apellido paterno	Escamilla
Apellido materno	Chimal

5.- Datos del Sinodal 3

Grado	Dr.
Nombre(s)	José Luis
Apellido paterno	Arreola
Apellido materno	Ramírez

6.- Datos del Sinodal 4

Grado	M en C.
Nombre(s)	Enrique
Apellido paterno	Moreno
Apellido materno	Sáenz

7.- Datos de la tesis

Relación de TSG-6 en el uso de células madre mesenquimales como terapia alternativa en un modelo experimental de EPOC.

38 p.

2018

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Hiperreactividad Bronquial en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” ubicado en el Ciudad de México, México.

Como parte del proyecto denominado “Eficacia en el uso de las células mesenquimales derivadas de médula ósea para el tratamiento de EPOC en un modelo de cobaya, cambios leucocitarios y funcionales pulmonares” registrado por el Comité de Investigación y el Comité de Bioética del INER con el número de protocolo B17-14.



Agradecimientos

A mis padres Josefina y Felipe por traerme al mundo a caminar a su lado en los caminos de la vida, por criarme de tal manera que he podido llegar a escribir estas palabras en este humilde documento y ser la persona que hoy en día me enorgullece ser, por todo su amor, apoyo y comprensión en todos los aspectos.

A mi tía Anselma por ser una segunda madre para mí y apoyarme incondicionalmente, así como por sus enseñanzas y consejos.

A mi familia por sus experiencias, conocimientos, consejos y ánimos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segunda casa desde el nivel medio superior en la Escuela Nacional Preparatoria No. 1 “Gabino Barreda” hasta en Ciudad Universitaria en la Facultad de Ciencias dando cobijo en sus instalaciones y de sus profesores quienes buscaron siempre brindar sus conocimientos y experiencias.

A mis sinodales por su dedicación y sugerencias que enriquecieron y complementaron mi desarrollo profesional y educativo.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” por proporcionar las instalaciones y elementos para hacer realidad este proyecto.

A la Dra. Martha Montañó y la Dra. Ana Laura Esquivel por facilitar los recursos e instalaciones para llevar a cabo el desarrollo de este trabajo, así como también todas sus recomendaciones y observaciones.

A la Dra. Patricia Segura Medina por toda la accesibilidad proporcionada para sortear las complicaciones que tuvimos y por sus enseñanzas.

A la Dra. Verónica Carbajal y mi compañera Atzallaly Torreblanca Roa al contribuir de gran manera en este trabajo proporcionando las células madre mesenquimales para ser instiladas en los cobayos

Al Dr. José Luis Arreola Ramírez por ser más que un profesor, por su apoyo y confianza incondicional al encomendarme una parte de este gran proyecto, por ser un segundo padre al darme lecciones, consejos y enseñanzas tanto académicas como de la vida misma, por su gran amistad.

Al Biol. Jesús Alquicira Mireles mi tutor por su dedicación y paciencia con la que me instruyo y dirigió la tesis, así como por brindarme su amistad incondicional y valiosos consejos.

A mi amiga Diana Laura Cabrera López por su apoyo en la inducción de EPOC a los cobayos y en los ELISAs, por siempre ofrecer su consejo y ayuda, así como su amor y comprensión en los momentos difíciles.

A mis compañeros de Taller y mi amigo Carlos Villa por su ayuda en la exposición de humo y mantenimiento de los cobayos.

A los cobayos que dieron sus vidas en nombre de la ciencia.

Dedicatoria

A mi mamá y papá por su amor, cariño y apoyo en todo momento, agradezco todos sus sacrificios y esfuerzos con tal de darme una educación de calidad y una vida plena. Por su confianza y paciencia al apoyarme para estudiar lo que me gusta, por darme siempre lo mejor. Gracias por hacer de mi un hombre de bien.

A mis hermanos ya que al ser el mayor es un gusto ser un ejemplo para ellos, para que aprendan de mis errores y sean mejores, gracias por su apoyo.

A mi tía Anselma por su cariño y preocupación para hacer de mí una mejor persona y por todo su apoyo.

Este logro es también de todos ustedes y prometo seguir con más.

“Estudia no para saber más, sino para saber algo mejor”
Séneca el Joven

Índice

Abreviaturas	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
Tratamientos actuales para la EPOC.....	11
Células madre.....	13
Potencial terapéutico de las células madre mesenquimales.....	14
TSG-6	16
TNF- α	17
IL-1 β	17
Planteamiento y Justificación del problema	18
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
Objetivos Específicos.....	19
MATERIAL Y MÉTODO	19
Grupos Experimentales.....	19
Exposición al humo de tabaco	19
Obtención, cultivo e inmunotipificación de las células madre mesenquimales. .	21
Instilación de las CMM	21
Obtención y procesamiento de las muestras	21
Histología	22
RESULTADOS	23
ELISAS	23
TSG-6.....	23
TNF- α	25
IL-1 β	27
Histología	29
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIÓN	33
LITERATURA CITADA	34

Abreviaturas

AP-1	Proteínas Activadas 1	IL-6	Interleucina 6
CM	Células Madre	IL-8	Interleucina 8
CMA	Células Madre Adultas	IL-10	Interleucina 10
CME	Células Madre Embrionarias	IL-18	Interleucina 18
CMM	Células Madre Mesenquimales	LBA	Lavado Broncoalveolar
CRVP	Cirugía de Reducción de Volumen Pulmonar	LPS	Lipopolisacaridos
DAAT	Déficit de Alfa-1-antitripsina	MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
e.e.	Error Estándar	NF-κB	Factor Nuclear Kappa-Beta
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica	NPPV	Ventilación de Presión Positiva no Invasiva
FEV1	Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo	PMAD	Patrones Moleculares Asociados a Daño
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>	PMAP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
FVC	Capacidad Vital Forzada	RRP	Receptores de Reconocimiento de Patrones
GAG	Glicosaminoglicano	rpm	Revoluciones por minuto
HA	Ácido Hialurónico	SSF	Solución Salina Fisiológica
H&E	Hematoxilina-Eosina	TA	Temperatura Ambiente
IL-1	Interleucina 1	TLR	Receptores Toll-like
IL-1β	Interleucina 1 beta	TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
IL-2	Interleucina 2	TSG-6	TNF- α Stimulated Gene/Protein 6
IL-4	Interleucina 4		

RESUMEN

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es un padecimiento frecuente, que se encuentra en cuarto lugar entre las enfermedades líderes en morbilidad y mortalidad en el mundo. El mayor factor de riesgo es el tabaquismo y se caracteriza por un desbalance inmunitario, ya que las propias defensas van destruyendo el tejido sin tener oportunidad para repararlo de una forma adecuada, además de que su tratamiento basado en broncodilatadores y anticolinérgicos, son meramente para mejorar la calidad de vida del paciente y su tolerancia al ejercicio, por esta razón se busca proponer una terapia alternativa con las células madre mesenquimales (CMM), estas son células pluripotenciales provenientes de la médula ósea que al encontrarse en un ambiente inflamatorio son estimuladas por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) secretado por macrófagos, dichas células liberan el producto del gen 6 estimulado por el TNF- α o TSG-6, esta proteína actúa como inmunomodulador en el sitio de receptores de reconocimiento de patrones del macrófago para desactivarlo, pues no basta con mejorar los síntomas sino regular el daño inflamatorio que es ocasionado por la secreción de citocinas inflamatorias como Interleucina 1 beta (IL-1 β) las cuales desencadenan una respuesta inmune que a la larga será inestable y dañará el tejido alveolar.

Nuestro objetivo fue describir el papel de la proteína TSG-6 como un agente antiinflamatorio, ya que podría tener una aplicación clínica, lo que permitiría el desarrollo de nuevos tratamientos para la EPOC.

Para este estudio se utilizaron 4 grupos de cobayos hembra (*Cavia porcellus*): Grupo 1 (SANO), Grupo 2 (SANO+ CMM), Grupo 3 (EPOC) y Grupo 4 (EPOC+ CMM), los grupos 3 y 4 fueron expuestos al humo de tabaco por 10 semanas, cabe mencionar que a las 2 semanas de exposición se instilaron CMM a los grupos 2 y 4, al término de la exposición se les practicó la eutanasia para obtener muestras de suero y lavado broncoalveolar (LBA). Las muestras fueron analizadas por el método de ELISA para cuantificar las citocinas TNF- α , IL-1 β y la proteína TSG-6.

Como resultados se encontraron los valores de: 258.64 ± 7.11 , 86.14 ± 2.81 y 12.53 ± 0.32 pg/ml en las concentraciones de TNF- α , IL-1 β y TSG-6 (respectivamente) en las muestras LBA del grupo 3 y una disminución tanto de las citocinas como en el TSG-6 en el grupo 4, en comparación con los otros grupos.

Con los datos obtenidos podemos sugerir que las células madre mesenquimales y el TSG-6 están regulando parte de la inflamación disminuyendo los niveles de las citocinas inflamatorias tanto en la parte sistémica y local, así como lo que se puede observar en los cortes histológicos de los diferentes grupos experimentales, por lo tanto, podríamos proponer continuar con la investigación en este campo emergente, debido a que se estima que para el 2020 la EPOC ascienda a la tercera causa de muerte a nivel mundial de continuar con los mismos tratamientos.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es definida como una enfermedad frecuente, prevenible y tratable, sin embargo cuando no es detectada o tratada a tiempo es crónica así como también mortal, se caracteriza por unos síntomas respiratorios y una limitación del flujo aéreo persistente, que se debe a anomalías de las vías respiratorias o alveolares causadas generalmente por una exposición importante a partículas o gases nocivos (1).

Debe contemplarse la posibilidad de EPOC en todo paciente que presente disnea, tos crónica, producción de esputo y/o antecedentes de exposición a factores de riesgo de la enfermedad como el humo de tabaco y leña, es necesario realizarles a estos pacientes una espirometría para establecer el diagnóstico clínico, donde se confirmará la presencia de una limitación persistente del flujo aéreo y por tanto de la EPOC (1). Las pruebas para el diagnóstico, control, valoración, e incluso pronóstico se basan en la espirometría forzada, en la EPOC su definición viene dada por la disminución del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1; por sus siglas en ingles) y de su relación con la capacidad vital forzada (FVC; por sus siglas en ingles), para el caso contrario es decir el asma, los parámetros pueden ser diferentes, aunque existen casos en los que hay una disminución parecida como en la EPOC, en tal caso el uso de broncodilatadores ayuda a distinguir, ya que en los asmáticos la obstrucción bronquial es reversible, mientras que en la EPOC no se ve este efecto (2).

La limitación crónica del flujo aéreo que es característica en la EPOC es producida por una combinación de enfermedades de las vías respiratorias pequeñas y la destrucción del parénquima (enfisema) cuyas contribuciones relativas varían de un individuo a otro (1). Actualmente la EPOC es la cuarta causa de muerte en todo el mundo, pero se prevé que llegue a ser la tercera para el 2020 de seguir así (1).

El conocimiento de la etiopatogenia de la EPOC ha avanzado considerablemente en los últimos años. Desde los tiempos del médico parisino Laennec (3) hasta casi la primera mitad del siglo XX predominaban las explicaciones mecánicas del enfisema, sin considerarse el efecto del tabaco (4).

A finales de 1950 Liebow, propone un modelo de atrofia vascular en el enfisema y más tarde surge la hipótesis del desequilibrio entre proteasas y antiproteasas.

Esta hipótesis de la patogenia del enfisema se basa en dos observaciones muy importantes: por una parte, Laurell y Eriksson en 1963 describen la asociación entre el enfisema y el déficit de alfa-1-antitripsina (DAAT); por otra parte, el grupo de Gross en 1965 describe el primer modelo de enfisema inyectando papaína, una proteasa vegetal, en los pulmones de modelos experimentales (4).

Con todas estas bases se fue desarrollando el conocimiento sobre los factores de riesgo de la EPOC, por lo que en la actualidad se diferencian en factores genéticos y por exposiciones ambientales diversas, como por ejemplo la contaminación, el humo de leña y el consumo de tabaco. Este último es la causa más importante de la EPOC en todo el mundo, la Organización Mundial de la Salud estima que en los países desarrollados representa el 73% y en los países en vías de desarrollo el 40% de la mortalidad causada principalmente por el tabaquismo (5).

El humo de tabaco contiene más de 4700 compuestos químicos de los cuales se encuentran altas concentraciones de oxidantes, así como radicales libres (6). La primera línea de defensa es la inmunidad innata, una respuesta rápida y no específica, en donde las células del sistema inmune identifican y reaccionan a agentes patógenos, así como también agresores ambientales (7). El sistema inmune puede reconocer estos productos como antígenos y desencadenar una respuesta inmunitaria mediante la liberación de autoantígenos, receptores toll-like (TLR; por sus siglas en inglés), sensores de las células del sistema inmune innata que reconocen los patrones moleculares expuestos por los agentes patógenos en la superficie de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC; por sus siglas en inglés), e iniciar la respuesta inmune frente a los daños celular y tisular (8).

Esta respuesta inmune inicial desestabiliza la matriz extracelular del parénquima pulmonar y los componentes de la misma, como el ácido hialurónico y los biglicanos, actuando como ligandos de los TLR, que tras su unión activan la vía de

transcripción del factor nuclear kappa-beta (NF- κ B; por sus siglas en inglés) lo que induce a las células epiteliales para que produzcan mediadores inflamatorios (9), obteniendo como resultado una respuesta inflamatoria en la que los macrófagos y otras células secretaran Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α ; por sus siglas en inglés) e Interleucina 1 (IL-1) que juntas desencadenaran la cascada de inflamación para activar el sistema inmune adaptativo (10).

La integración de estos estudios sobre la inflamación puede sintetizarse en los siguientes puntos:

- a) Desde la exposición al humo del tabaco se reclutan células inflamatorias a los espacios aéreos del pulmón.
- b) Estas células inflamatorias liberan mediadores con capacidad elastolítica, que degradan la matriz extracelular.
- c) Los mecanismos de reparación alveolar están alterados, lo que da lugar a la destrucción de los espacios alveolares, característicos del enfisema pulmonar.

La unión de estos hallazgos descritos anteriormente, es la base que sustenta el conocimiento actual de la etiopatogenia de la EPOC (4).

Tratamientos actuales para la EPOC

El tratamiento de la EPOC es meramente sintomático teniendo como objetivo la reducción en frecuencia y gravedad de las exacerbaciones para mejorar el estado de salud, así como también la tolerancia al ejercicio (11).

A continuación, se describe las herramientas disponibles en la actualidad para el tratamiento de la enfermedad:

- **Educación:** Los programas educativos orientados a la prevención del consumo de tabaco, así como una correcta aplicación de las técnicas inhalatorias y al reconocimiento temprano de exacerbaciones, junto con campañas de vacunación (12).

- **Tratamiento farmacológico:**

Broncodilatadores: Constituyen la base del tratamiento de la EPOC, ya que consiguen mejorar los síntomas en estos pacientes. Los broncodilatadores de acción corta mejoran la tolerancia al esfuerzo y clásicamente han estado indicados en estadios muy iniciales de la enfermedad, como medicación de rescate para el alivio sintomático.

Agonistas-B₂-adrenergicos: (salmeterol, formoterol ó indacaterol) de acción prolongada.

Anticolinérgicos: (bromuro de tiotropio), puesto que tienen una eficacia superior en la reducción del número de exacerbaciones actuando como antagonista competitivo y reversible de los receptores del musculo liso bronquial para disminuir la secreción de moco (13).

Asociación de 2 broncodilatadores o de broncodilatador y corticoide inhalado (14).

- **Antibióticos**

Estudios recientes muestran que el uso regular de antibióticos macrólidos (Azitromicina y Eritromicina) ayudan a disminuir las exacerbaciones (1).

- **Otros Tratamientos**

Oxigenoterapia y apoyo respiratorio: Se ha demostrado que la administración de oxígeno en un plazo menor a 15 horas al día en pacientes con insuficiencia respiratoria crónica, aumenta la supervivencia en los pacientes con hipoxemia grave en reposo (15). La ventilación de presión positiva no invasiva (NPPV, por sus siglas en inglés) mejora la supervivencia sin hospitalización, utilizando una mascarilla nasal, facial o de otro tipo para evitar la necesidad de una intubación o canulación en la tráquea que brinde soporte ventilatorio artificial (16).

Cirugía de Reducción de Volumen Pulmonar (CRVP): La cirugía de reducción del volumen pulmonar mejora la supervivencia en los pacientes con un enfisema grave de lóbulo superior y con una baja capacidad de ejercicio (1).

Bulectomía: Se asocia a una disminución de la disnea, así como también, una mejora en la función pulmonar y tolerancia al ejercicio (1).

En la actualidad son las únicas herramientas disponibles para el tratamiento de la enfermedad y en la mayoría de los casos los resultados no son 100% satisfactorios, por lo que la EPOC constituye un importante reto de salud pública y es una causa importante de morbilidad crónica y mortalidad en todo el mundo (17).

Esto conlleva a la búsqueda de nuevos tratamientos y/o terapias alternativas para tener mejores resultados en la salud del paciente, dentro de estas se encuentra la terapia regenerativa o terapia con células madre, un campo emergente de tratamiento basado en la estimulación de las células madres residentes endógenas o por la administración de células madres provenientes de un donador, con el propósito de tratar enfermedades o corregir el mal funcionamiento de los tejidos dañados.

Células madre

Las células madre (CM) se definen como células indiferenciadas, pluripotenciales, capaces de autorrenovarse y ante determinadas señales especializarse para realizar una función en concreto (18), las podemos clasificar atendiendo a su origen en: células madre adultas (CMA) y células madre embrionarias (CME). Las CMA o multipotenciales, también son conocidas como órgano-específicas, ya que generan los tipos celulares del mismo tejido (19). Las CME provienen de embriones y actualmente se conocen tres fuentes para su obtención: a) embriones que no llegaron a utilizarse en los procedimientos de fertilización *in vitro* (FIV), b) embriones creados de células somáticas por técnicas de transfección y c) líneas de CME ya existentes, las cuales se obtienen de cultivos celulares, estas últimas son las que han provocado menos controversia en cuanto a factores bioéticos (20).

La diferencia entre las CME y CMA radica en la capacidad de cada una para generar las líneas germinales de un organismo. Las CMA se derivan principalmente de la médula ósea, mismas que son capaces de generar todos los tipos celulares de la sangre y del sistema inmune; se han aislado también de la piel, tejido adiposo, ligamentos periodontales, membranas sinoviales, hueso trabecular, sistema nervioso, entre otros (19).

Aunque parece ser que en todos los tejidos existen CM capaces de compensar los daños al igual que mantener su reparación; el sistema nervioso central y el corazón son tejidos en los cuales su activación, así como su reparación después del daño es menor o tardío. Se sabe que a edades más tempranas existen células suficientes para compensar los daños y mantener la reparación, sin embargo, con la edad y la presencia de algunas enfermedades crónicas, se llegan a producir errores en la capacidad de reparación, debido a que disminuye la cantidad y funcionalidad de las CM progenitoras, además de perder su capacidad de enfrentar demandas de reparación mayores (21).

Por tanto, las CM se dividen en embrionarias totipotenciales, dando lugar a las tres líneas germinales y a la placenta, mientras que las pluripotenciales solo pueden diferenciarse en las líneas germinales. Las CMA se dividen en multipotenciales que están limitadas a diferenciarse en un linaje celular específico de acuerdo a su ubicación y las unipotenciales que generan un tipo celular específico (19).

Potencial terapéutico de las células madre mesenquimales.

Su aplicación principal es su potencial de diferenciación en el uso de la regeneración en tejidos destruidos o dañados, así como terapia de reemplazo celular o medicina regenerativa. En esta área se están desarrollando trabajos de investigación donde se busca reemplazar células dañadas por células funcionales que restituyan la función normal de los tejidos u órganos en enfermedades crónodegenerativas, tales como: diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, enfermedad de Parkinson y enfermedades de células sanguíneas (22).

Nuestro trabajo se orienta al uso de células madre mesénquimales (CMM) como terapia alternativa para el tratamiento de la EPOC, estas células fueron descubiertas inicialmente por el investigador ruso Alexander Freidenstein en 1950, como una pequeña fracción de células provenientes de la médula ósea que se aíslan fácilmente y se adhieren a la superficie del tejido rápidamente, son células

pluripotenciales que, al ser implantadas *in vivo*, se ha reportado una diferenciación en células de mineralización, adipocitos y condrocitos (23).

Estas CMM al estar en condiciones inflamatorias secretan una proteína llamada TNF- α stimulated gene/protein 6 (TSG-6) identificada como un mediador clave de los efectos antiinflamatorios en modelos de infarto de miocardio, daño corneal, peritonitis, lesión cerebral traumática, lesión pulmonar aguda por bleomicina, cicatrización de heridas y diabetes tipo 1 (Fig. 1) (24).

Fue descubierta en pacientes con artritis reumatoide y osteoartritis sugiriendo un papel proinflamatorio, posteriormente al ser aislado y administrado en modelos inflamatorios se observaron efectos inhibitorios al daño, así como también al rechazo de trasplante por lo que indicaron sus propiedades antiinflamatorias (24).

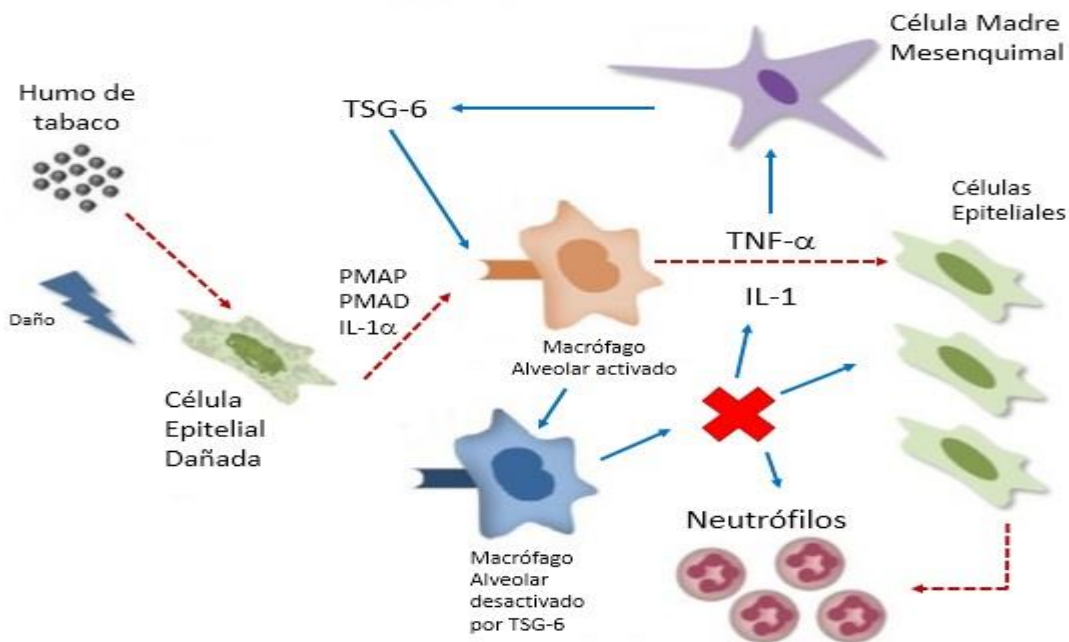


Fig. 1 Esquema de la inmunidad innata en EPOC (Flechas punteadas) y mecanismo de acción de las CMM (Flechas continuas). Entrada de humo de tabaco comienza el daño a las células epiteliales induciendo la producción de IL-1 α , patrones moleculares asociados a patógenos y al daño (PMAP y PMAD). La activación del macrófago alveolar comenzará a secretar TNF- α e IL-1 desencadenando la cascada de inflamación, estimulando los neutrófilos. TSG-6 normaliza la activación de macrófagos mediante una regulación positiva. (Modificado de referencia 24).

TSG-6

La TSG-6 o TNF-stimulated gene/protein 6, es decir, el producto del gen 6 estimulado por el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), es una proteína de unión al receptor de adhesión de la superficie celular CD44, proteína de enlace a cartílago, proteína del núcleo de proteoglicanos, así como al hialuronano que pertenece a la familia de las hialadherinas (26). Es una proteína de aproximadamente 35 kDa compuesta de un dominio Link y CUB con una secuencia pequeña N-terminal (Fig.2) (27). El módulo Link cargado positivamente enlaza varios glicosaminoglicanos (GAGs) incluyendo ácido hialurónico (HA), heparina, sulfato de condroitina y heparán sulfato (HS) (28). El dominio CUB de TSG-6 es similar al módulo CUB encontrado en varias proteínas reguladas de desarrollo que se cree están implicados en las interacciones proteína-proteína. Sin embargo, hasta la fecha solo se ha demostrado que la fibronectina se une al dominio CUB de TSG-6 (29). La TSG-6 no es constitutivamente expresada, pero puede ser inducida por citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 y lipopolisacáridos (LPS) (28). En contraste, las citocinas antiinflamatorias como IL-4 o IL-10, suprimen la expresión de TSG-6 ya sea directamente o a través de la inhibición de la activación celular inducida por el receptor de LPS/Toll-like (30).

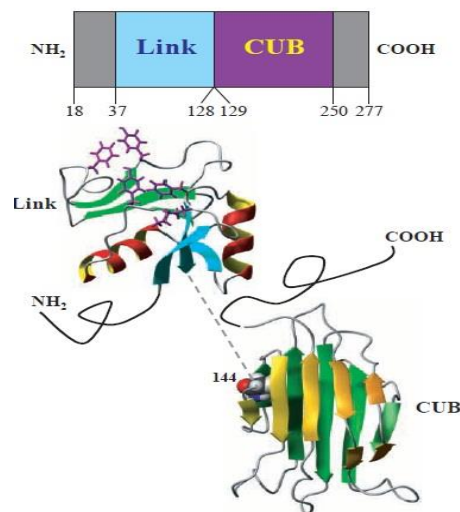


Fig. 2 Esquema molecular del TSG-6 con sus dominios Link y CUB (27).

TNF- α

El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) es una citocina inflamatoria, la gran producción de esta, en forma lenta y continua, ocasiona enfermedades inflamatorias crónicas, pero cuando su producción es exagerada y rápida provoca una inflamación severa y daño tisular. Es producida principalmente por macrófagos en el pulmón, así como también, las células epiteliales, eosinófilos, y mastocitos en respuesta al daño tisular o infección (31). Es ligando de receptores que inician señales de proliferación celular y apoptosis actuando en dos niveles tisular y celular. En el primero produce deterioro de proteoglicanos. Mientras que a nivel celular contribuye a la adhesión de neutrófilos y linfocitos, así como también la estimulación de leucocitos (32). Es un péptido parecido a una hormona que actúa localmente de manera autocrina y paracrina o en sitios distantes por todo el flujo sanguíneo. Muchos mediadores inflamatorios estimulan la producción de TNF- α incluyendo LPS, IL-1, IL-2, Interferon- γ , plaquetas derivadas de factores de crecimiento, factores estimuladores de colonias de granulocitos y macrófagos, así como la misma TNF- α (31).

La unión de TNF- α a sus receptores inicia una cascada de señalización terminando en la activación de factores transcripcionales, NF- κ B y proteínas activadas 1 (AP-1: por sus siglas en inglés). La activación de estas señales intracelulares es importante cuando TNF- α modula la apoptosis, diferenciación, proliferación y la producción de proteínas proinflamatorias (IL-6, IL-8, IL-18) entre otros. En estudios anteriores se han observado en muestras de lavado broncoalveolar (LBA) de fumadores crónicos y esputo de pacientes con EPOC, niveles altos de TNF- α por lo que se cree que contribuye en el desarrollo de la enfermedad, estimulando la expresión de moléculas de adhesión que da como resultado el reclutamiento de células inflamatorias y la producción de citocinas como IL-1 β (33).

IL-1 β

La Interleucina 1 beta (IL-1 β) es una potente citocina proinflamatoria crucial para la respuesta inmune a infecciones y lesiones, es producida y secretada como un precursor de 31kDa inactivo llamado pro-IL-1 β por monocitos y macrófagos en

respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos y al daño (PMAPs y PMADs), estos actúan a través de receptores de reconocimiento de patrones (RRPs) en los macrófagos para regular las vías de expresión. La inducción de expresión para pro-IL-1 β se interpreta como una etapa de cebado hacia la célula donde necesita encontrarse con otro PMAP para inducir la secreción de IL-1 β activa (34).

IL-1 β es un potente activador de macrófagos alveolares en pacientes con EPOC (35). Las células broncoepiteliales en cultivo de sujetos con EPOC liberan más IL-1 β cuando son estimuladas con humo de tabaco que las células broncoepiteliales de sujetos sin EPOC (36).

Planteamiento y Justificación del problema

Los tratamientos de la EPOC son paliativos por lo que no mejoran el estado físico del pulmón solo proporcionan al paciente una mejor calidad de vida, pero el daño alveolar sigue latente, además de que en la mayoría de los casos las exacerbaciones continúan por lo que no ayudan de una manera eficaz para reducir la mortalidad de los pacientes, por ello es necesario valerse de la investigación y el desarrollo de nuevas terapias alternativas.

HIPÓTESIS

Si las células madre mesenquimales poseen un efecto inmunomodulador entonces se disminuirá la inflamación y el daño alveolar producido por la exposición crónica a la EPOC del modelo animal.

OBJETIVO GENERAL

La finalidad de este trabajo es describir el papel del TSG-6 como proteína antiinflamatoria en la terapia con células madre mesenquimales, ya que podría tener una aplicación clínica, que permitirá el desarrollo de nuevos tratamientos para la EPOC ocasionada por humo de tabaco.

Objetivos Específicos

- Reproducir la EPOC en un modelo de cobayo expuesto a humo de tabaco.
- Instilar células madre mesenquimales por la vía aérea a las 2 semanas de exposición con humo de tabaco.
- Medir las concentraciones de TSG-6, TNF- α e IL-1 β en lavado broncoalveolar (LBA) y suero.
- Histopatología de los pulmones para comprobar si los animales desarrollaron la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODO

Grupos Experimentales

Se utilizaron 20 cobayos (*Cavia porcellus*) hembra de dos meses de edad con un peso entre 350 a 400g, que se mantuvieron en condiciones de bioterio de acuerdo con la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, para la producción, cuidado y uso de los animales de Laboratorio. El estudio fue aprobado por nuestro comité institucional de Ciencia y Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Los cobayos se dividieron aleatoriamente en 4 grupos de estudio:

- Grupo 1: Control sanos (n= 5).
- Grupo 2: Cobayos sanos con CMM (n=5).
- Grupo 3: Cobayos con EPOC (n=5).
- Grupo 4: Cobayos con EPOC y CMM (n= 5).

Para identificar a cada animal fueron marcados con un número y pesados al inicio y término del estudio.

Exposición al humo de tabaco

El método de exposición que se utilizó para este proyecto fue el de cuerpo entero (Wholebody), donde a los grupos experimentales se les indujo la enfermedad en una cámara de exposición de acrílico (100cm de largo x 60cm de ancho x 20cm de alto). Dicha cámara estaba conectada a una bomba, la cual tuvo como función de crear un vacío produciendo la combustión de los cigarrillos y el ingreso del humo

dentro de la cámara. La inducción consistió con el consumo de 20 cigarros sin filtro marca Marlboro® de la variedad roja de México, estos eran previamente secados en una estufa de cultivo a 37°C por 24 h para facilitar su combustión. La inducción se realizó de la siguiente manera: se colocaron 5 cigarros y al término de su combustión se dejó respirar el humo durante 20 minutos a los animales con la bomba apagada, posteriormente se encendió por 15 minutos para la recuperación de los mismos. Una vez concluido el tiempo de reposo se prosiguió con otros 5 cigarros realizando la misma maniobra anteriormente mencionada, hasta completar un total de 20 cigarros por día, en un lapso de 5 días a la semana, durante 10 semanas para inducir la enfermedad. Cada grupo se expuso al humo de tabaco por separado.

Los grupos Sano y Sano + CMM, se mantuvieron separados de los grupos expuestos al humo de tabaco en condiciones habituales de bioterio. Cabe mencionar que este modelo experimental de exposición al humo de tabaco ya se encuentra estandarizado en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”.

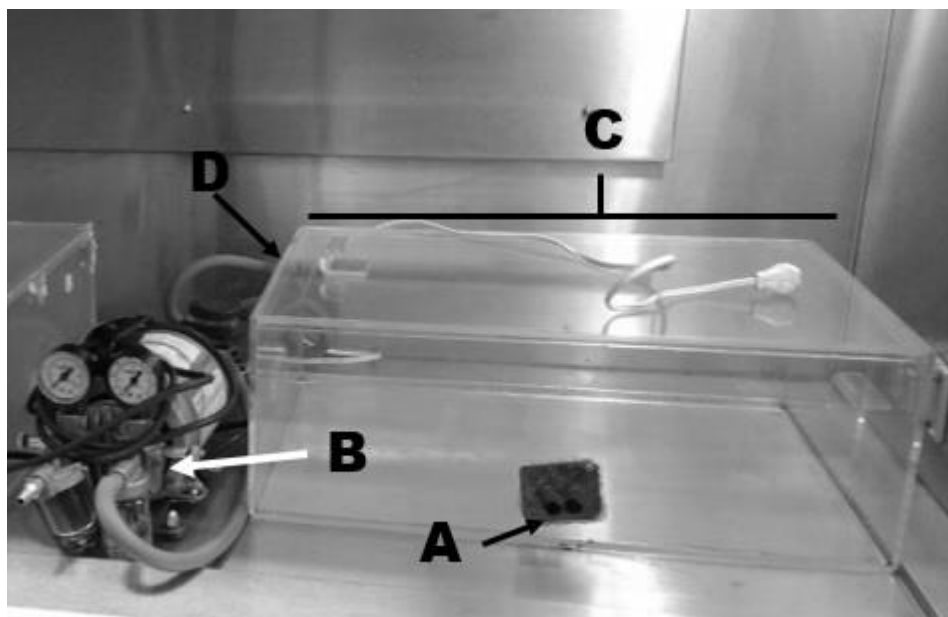


Fig. 3 Equipo de exposición al humo de tabaco: A) Tubos para poner los cigarros. B) Bombas de vacío. C) Cámara de acrílico para los animales en libre movimiento. D) Tubo de conexión a la bomba de vacío.

Obtención, cultivo e inmunotipificación de las células madre mesenquimales.

Esta parte del proyecto fue realizada por la Dra. Verónica Carbajal adscrita al departamento de Hiperreactividad Bronquial e integrante del equipo de investigación. Las CMM fueron aisladas del fémur de un cobayo macho adulto. Se realizó un corte transversal a lo largo de la epífisis y la cavidad medular para infiltrar medio utilizando una aguja 26-G para suspender el líquido medular.

Las células fueron sembradas en placas tomando como densidad inicial 60 células/cm² y fueron incubadas con medio de cultivo añadiendo factores de crecimiento, que fue recambiado de 60-72 h durante 12-14 días hasta que las células estaban confluentes al 70-85% y por último se utilizó tripsina para despegar las células, evitando una exposición no mayor a 5 min para evitar que las células sufrieran daño. Se inmunotipificaron por citometría de flujo utilizando un citómetro FACSCanto™ de Beckton Dickinson, obteniendo valores positivos para CD45 y CD34 así como negativamente para cuatro anticuerpos más comprobando con esto, que fueron células madre mesenquimales las que se obtuvieron.

Instilación de las CMM

Se instilaron 5 millones de células a los grupos 2 y 4 después de dos semanas en exposición al humo de tabaco, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (PiSA® Agropecuaria) i.p con una dosis de 28mg/Kg, se les realizó una traqueotomía para instilar las CMM por esta vía, finalmente la incisión fue suturada dejando al animal en observación hasta su recuperación.

Obtención y procesamiento de las muestras

Al término de las 10 semanas de exposición a los animales se les practicó la eutanasia por grupos para obtener muestras de suero, LBA y tejido.

Se anestesiaron con pentobarbital sódico (PiSA® Agropecuaria) i.p. usando la dosis de 28mg/Kg, en seguida se realizó una traqueotomía y se le colocó una cánula traqueal para ventilar los pulmones (3-5ml volumen) con un ventilador de volumen Harvard Apparatus Limited, posteriormente se hizo una esternotomía para obtener sangre del animal por punción en el ventrículo derecho del corazón

con una jeringa de 10 ml y la muestra se vertió en tubos Vacutainer BD® para obtención de suero rápido. Después se hicieron dos LBAs instilando 5ml en cada uno con solución salina fisiológica 0.9% (SSF), el volumen recuperado se guardó en un tubo Falcon de 10 ml. En seguida se obtuvo el bloque cardiopulmonar, se exsanguinó con SSF y posteriormente fue fijado en formol al 10% para estudios de patología. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3500 rpm x 15 minutos a temperatura ambiente (TA) para separar el suero del plasma y de LBA a 1900 rpm x 10 minutos se recuperó el sobrenadante, se hicieron alícuotas de todas las muestras y fueron almacenadas a -80° C hasta su estudio.

Las muestras fueron evaluadas y cuantificadas por el método de ELISA para TSG-6, TNF- α e IL-1 β las cuales se analizaron conforme a las instrucciones del fabricante para cada uno de los kits comerciales MyBioSource®.

- TSG-6: Guinea pig Hyaluronate Binding Protein (HABP) ELISA kit (Competitive ELISA) 96 Tests, Catalogo MBS732995.
- TNF- α : Cavy Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α) ELISA kit, 96 Tests, Catalogo: MBS9303082.
- IL-1 β : Guinea pig Interleukin 1 β (IL-1 β) ELISA kit (Competitive ELISA) 96 Tests, Catalogo MBS726312.

Histología

El bloque cardiopulmonar extraído de cada cobayo se fijó en formol a 10%, posteriormente se realizaron cortes transversales del lóbulo medio manteniendo un grosor de 4 a 5 mm. Inmediatamente el material fue incluido en bloques de parafina, después se hicieron cortes en seco de 3 a 4 μ m con un micrótopo, los cuales se colocaron en un portaobjetos. A continuación, se realizó la técnica de tinción Hematoxilina-Eosina (H&E). Finalmente, las laminillas fueron digitalizadas con un escáner de preparación completa de patología digital Marca Leica® Modelo Aperio CS-O.

RESULTADOS

Todos los animales llegaron al término del estudio.

ELISAS

Las muestras se hicieron por duplicado, se realizó la curva estándar del fabricante, de acuerdo con el inserto de cada ELISA, fueron leídos a 450 nm con un lector de microplaca Biotek, modelo Synergy HT U.S.A, los resultados de las densidades ópticas obtenidas fueron analizados con el programa Curve Expert® versión 1.4 para obtener las concentraciones, todos los valores obtenidos se les calculó el promedio \pm el error estándar (e.e) de la media donde el valor fue analizado para la comparación entre las concentraciones locales contra las sistémicas. Posteriormente se cotejaron los resultados de cada tipo de muestra por separado, en donde todos los grupos se compararon con el grupo control para buscar diferencias significativas usando las pruebas de ANOVA, Dunnet y Tukey.

TSG-6

Al analizar las concentraciones de TSG-6 por medio del método de ELISA los valores obtenidos se muestran en la Tabla 1, en comparación entre las muestras de suero y LBA se obtuvo una significancia de $p < 0.01$ utilizando una prueba de Tukey en los Grupos EPOC y EPOC + CMM (Gráfico 1). Para la comparación de todos los grupos de LBA se obtuvieron diferencias significativas de $p < 0.05$ con una prueba de Dunnet entre el Grupo SANO y el Grupo EPOC + CMM (Gráfico 3) mientras que en suero una $p < 0.01$ entre el grupo SANO y el grupo EPOC con la prueba de Tukey (Gráfico 2).

Muestra\Grupo	SANO	SANO + CMM	EPOC	EPOC + CMM
Suero	7.78 \pm 0.47	7.18 \pm 1.30	8.14 \pm 0.86	4.43 \pm 0.16
LBA	8.54 \pm 0.48	10.22 \pm 1.15	12.53 \pm 0.32	11.11 \pm 0.58

Tabla 1. Resultados de la prueba de ELISA para TSG-6 en las muestras de suero y LBA (unidades expresadas en pg/ml \pm e.e.).

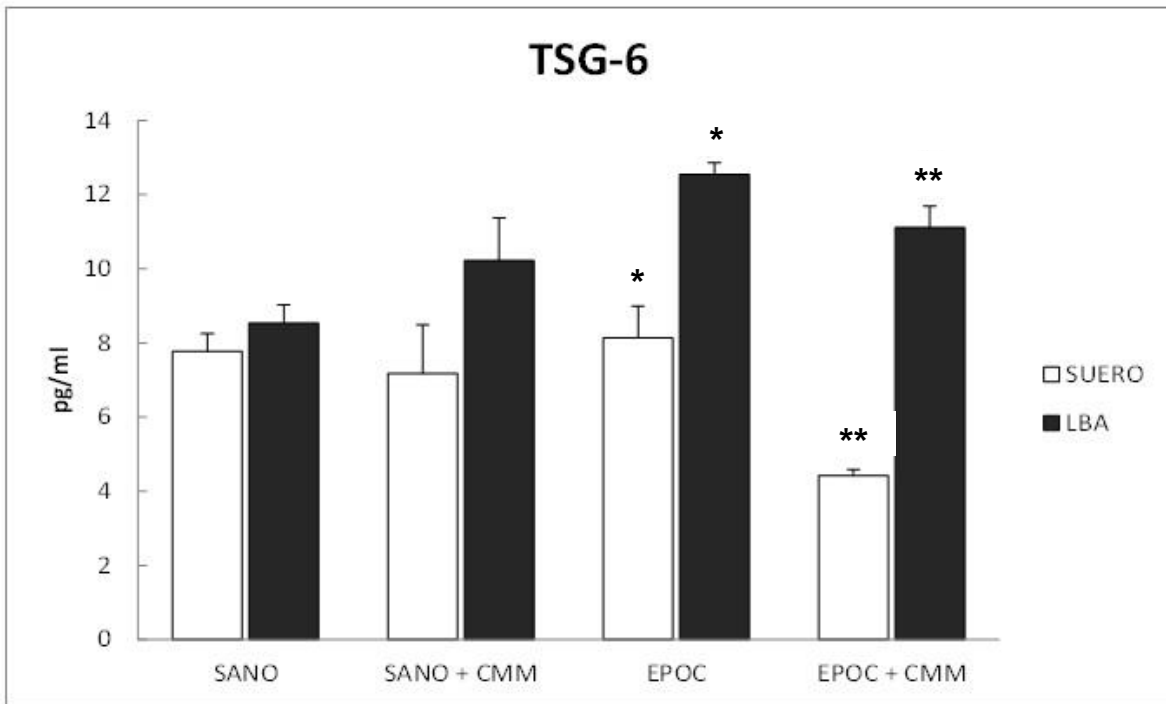


Gráfico 1. Histograma de la proteína TSG-6 en donde se comparan los niveles sistémicos (suero) contra los locales (LBA) con una prueba de Tukey en los Grupos EPOC y EPOC + CMM (*, ** = $p < 0.01$).

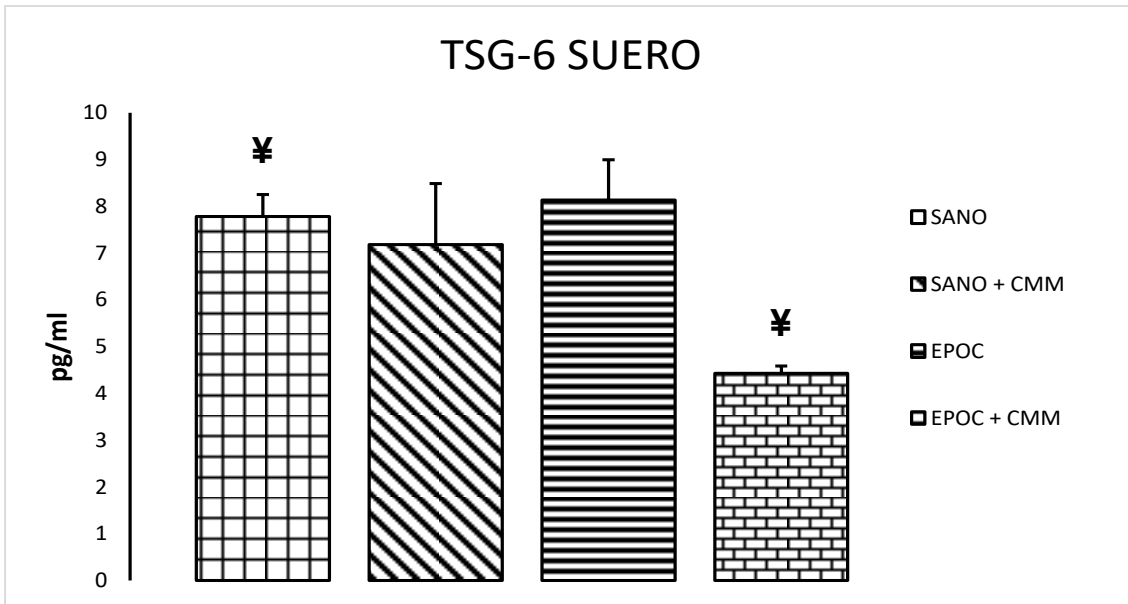


Gráfico 2. Histograma de la concentración de TSG-6 de las muestras obtenidas de suero, se obtuvo una diferencia significativa entre el grupo SANO y EPOC + CMM mediante una prueba de Dunnett ($\neq = p < 0.05$).

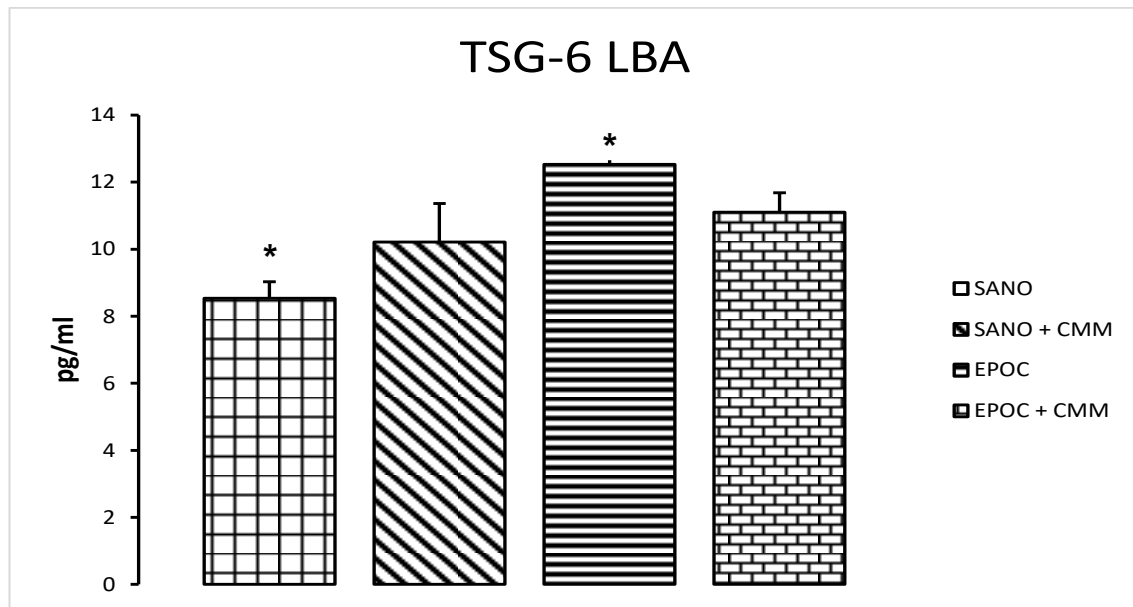


Gráfico 3. Histograma de la concentración de TSG-6 de las muestras obtenidas de LBA, con una prueba de Tukey entre el grupo SANO y EPOC (*= $p < 0.01$).

TNF- α

Los resultados para TNF- α se encuentran registrados en la Tabla 2. Teniendo una comparación entre los valores de suero y LBA obtuvimos una significancia estadística entre todos los grupos de $p < 0.01$ realizando una prueba de Tukey (Gráfico 4). La comparación de todos los grupos de suero y en LBA no se obtuvieron diferencias significativas (Gráfico 5 y Gráfico 6).

Muestra\Grupo	SANO	SANO + CMM	EPOC	EPOC + CMM
Suero	68.41 \pm 5.60	69.07 \pm 3.67	63.74 \pm 6.69	65.97 \pm 2.32
LBA	242.07 \pm 4.34	245.65 \pm 6.06	258.64 \pm 7.11	252.16 \pm 8.06

Tabla 2. Valores de TNF- α en las muestras de suero y LBA (unidades expresadas en pg/ml \pm e.e.).

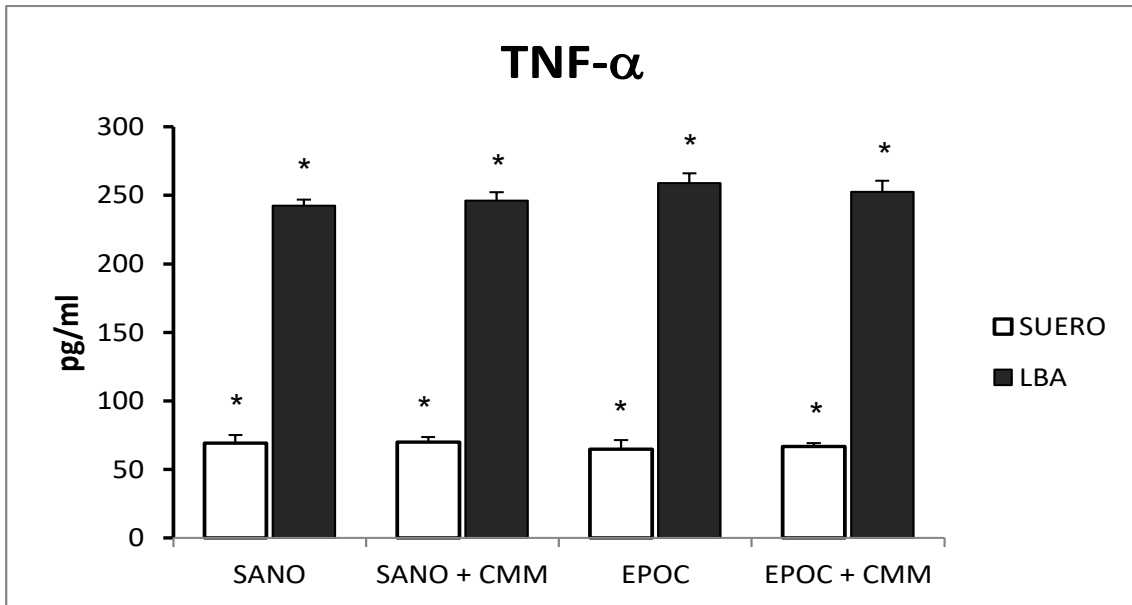


Gráfico 4. Histograma de la citocina TNF- α en donde se comparan las concentraciones sistémicas (suero) y locales (LBA) todos los grupos presentan una diferencia significativa utilizando una prueba de Tukey (*= $p < 0.01$).

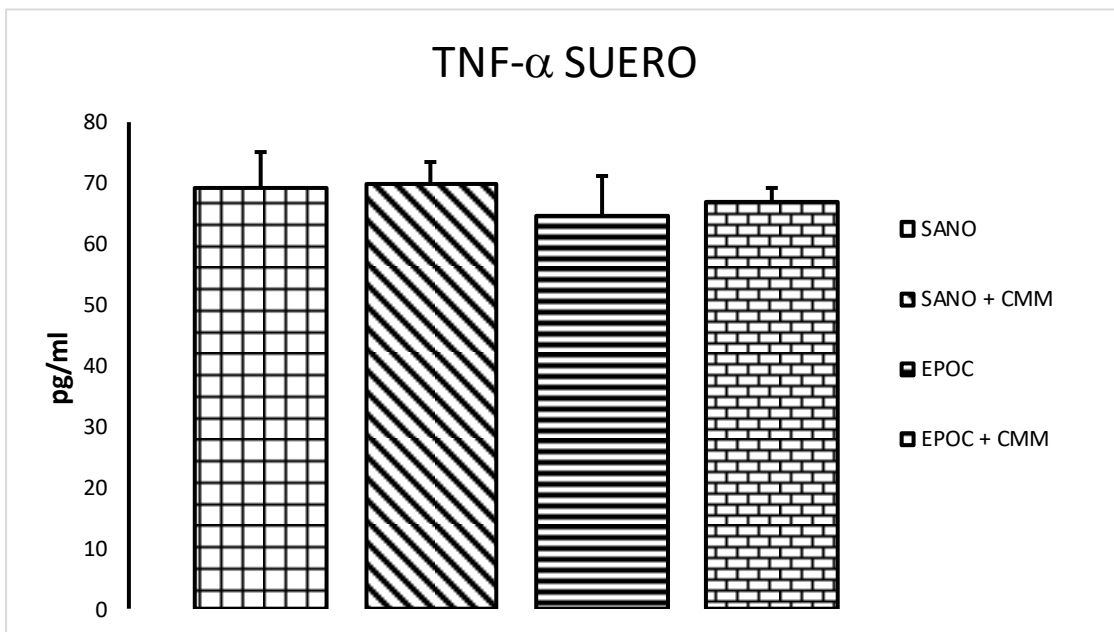


Gráfico 5. Histograma de la concentración de TNF- α de las muestras de suero.

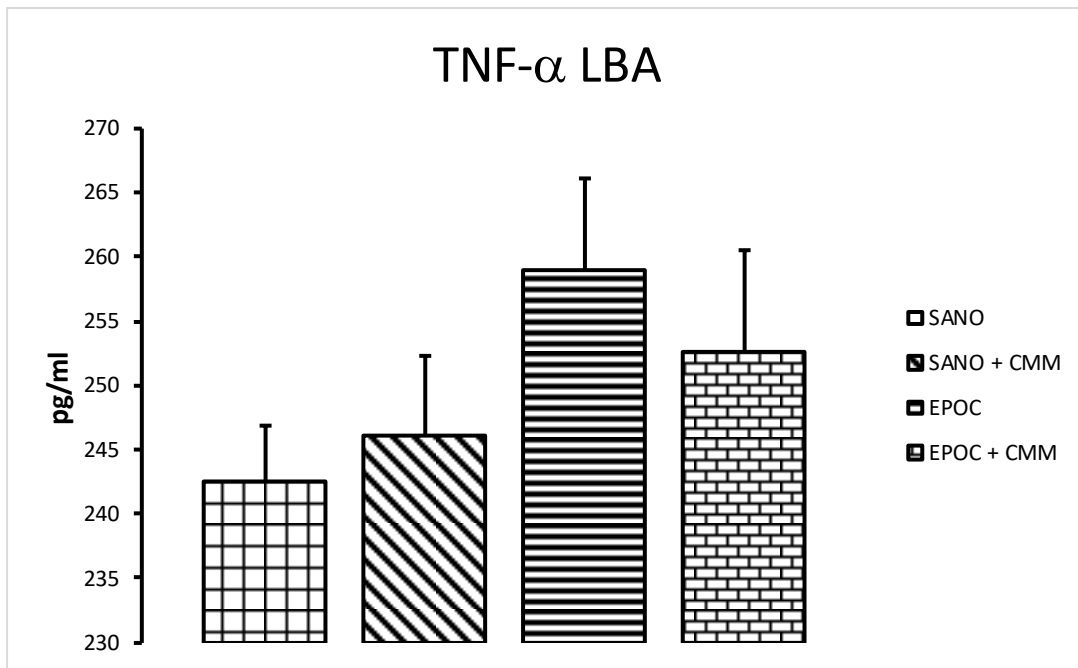


Gráfico 6. Histograma de la concentración de TNF- α en LBA, concentración mayor fue la de EPOC, seguida de la de EPOC + CMM.

IL-1 β

El promedio de las concentraciones se encuentra anotado en la Tabla 3. El análisis entre el contraste de las muestras de suero y LBA demostró que para el grupo SANO se obtuvo una $p < 0.01$ en la prueba de Tukey (Gráfico 7). Se compararon las concentraciones de todos los grupos de suero obteniendo diferencias significativas entre el grupo SANO y el grupo EPOC con una $p < 0.01$, así como también el grupo de EPOC + CMM con el grupo SANO con una $p < 0.05$ ambas en la prueba de Tukey (Gráfico 8). Para LBA se encontraron diferencias entre los grupos SANO y EPOC con una $p < 0.01$ usando una prueba de Tukey (Gráfico 9).

Muestra\Grupo	SANO	SANO + CMM	EPOC	EPOC + CMM
Suero	160.45 \pm 8.42	134.62 \pm 24.50	72.90 \pm 10.30	86.45 \pm 11.73
LBA	49.09 \pm 4.74	67.78 \pm 3.87	86.14 \pm 2.81	63.43 \pm 7.55

Tabla 3. Resultados del ELISA para TNF- α de las muestras de suero y LBA (unidades están expresadas en pg/ml \pm e.e.).

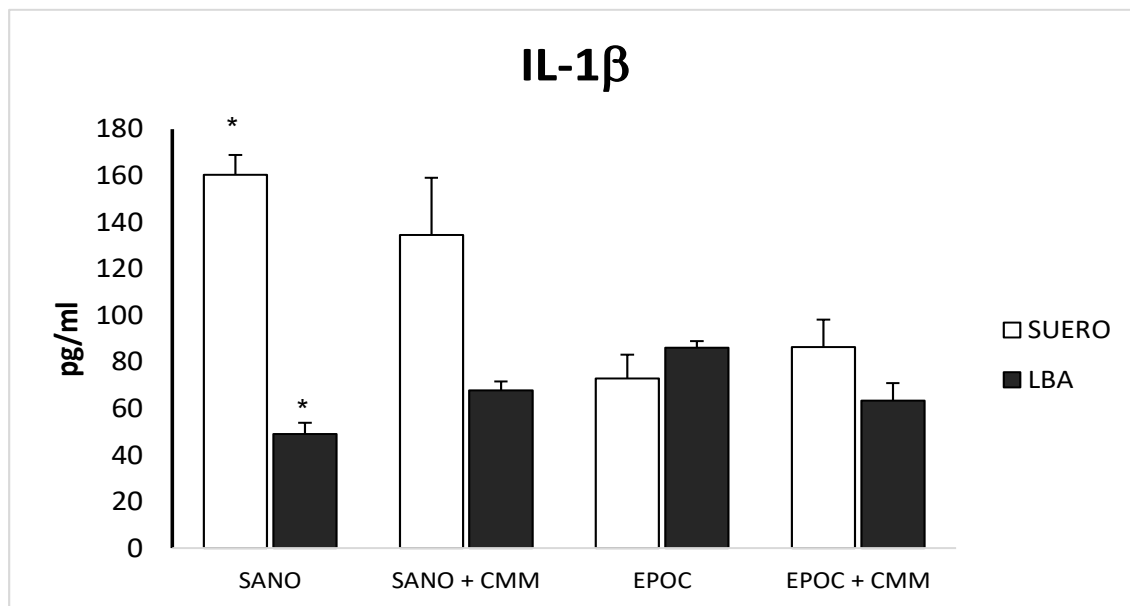


Gráfico 7. Histograma de la citocina IL-1 β en donde se comparan las concentraciones sistémicas (suero) contra las locales (LBA), usando una prueba en la prueba de Tukey se obtuvieron diferencias significativas (*= $p < 0.01$).

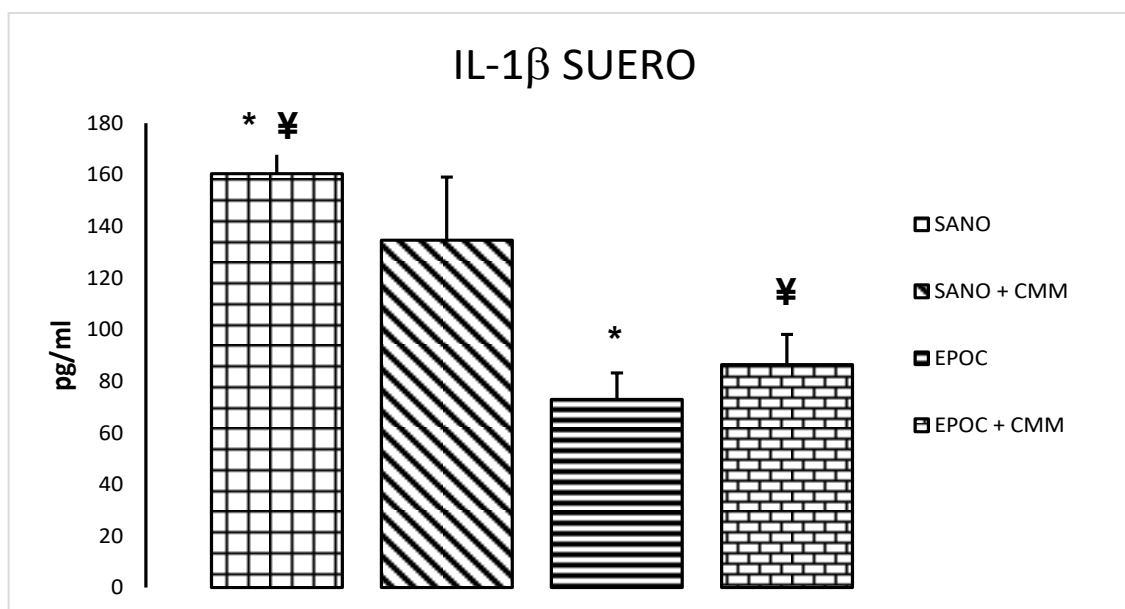


Gráfico 8. Histograma de concentración de IL-1 β en suero, obtuvimos diferencias significativas entre el grupo SANO y EPOC, así como también entre el grupo SANO y EPOC + CMM mediante el análisis con una prueba de Tukey (*= $p < 0,01$ y $\neq = p < 0.05$).

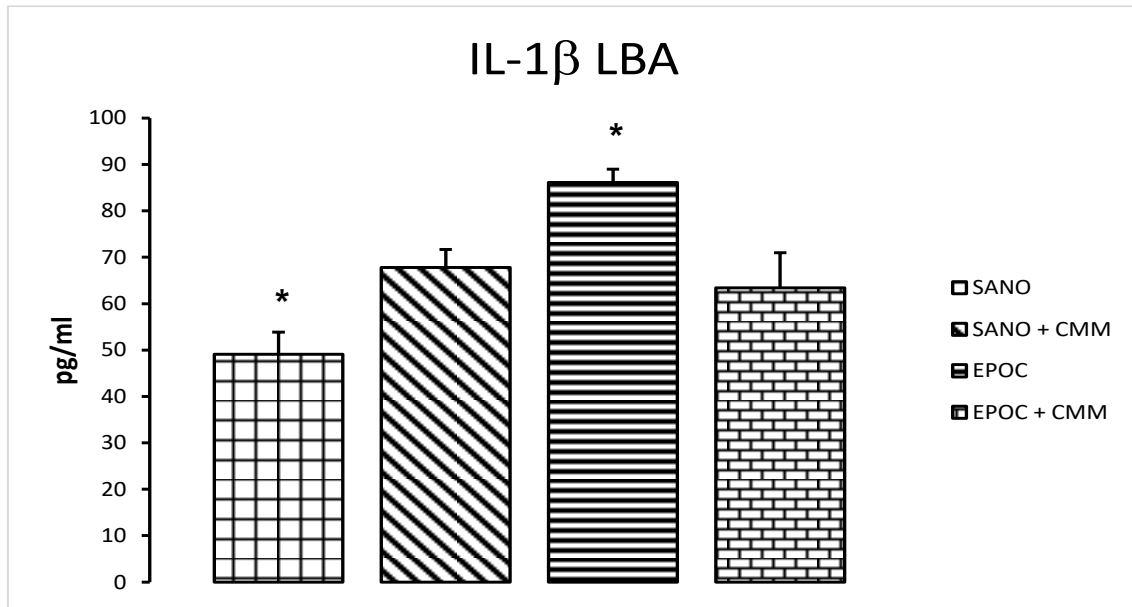


Gráfico 9. Histograma de concentración de IL-1 β en LBA, con una prueba de Tukey se obtuvo una diferencia significativa (*= $p < 0.01$).

Histología

En la muestra histológica del grupo SANO se observan los espacios alveolares del cobayo y paredes sin aparentes signos de una ruptura ó reparación. Hay varios espacios que parecieran grandes, pero es debido al corte por el acomodamiento de los alveolos (Fig .4). Para el grupo de EPOC es apreciable en el corte el engrosamiento de las paredes alveolares, así como también señales de enfisema por las marcas cicatrizadas debido a la ruptura (Fig. 5). Y por último la preparación del grupo EPOC + CMM muestra un estado alveolar con poca infiltración de células inflamatorias, así como un reducido engrosamiento en las paredes, hay pocas rupturas causadas por la enfermedad, la gran mayoría son ocasionados por el corte (Fig. 6).

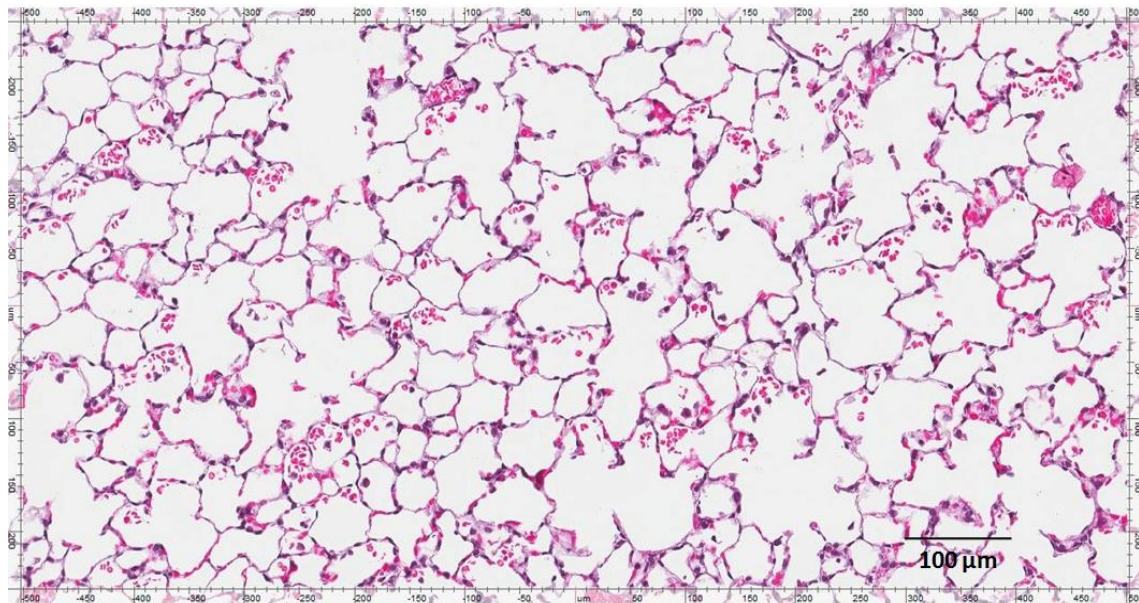


Fig. 4 Corte Histológico de pulmón de cobayo perteneciente al grupo SANO a 8x

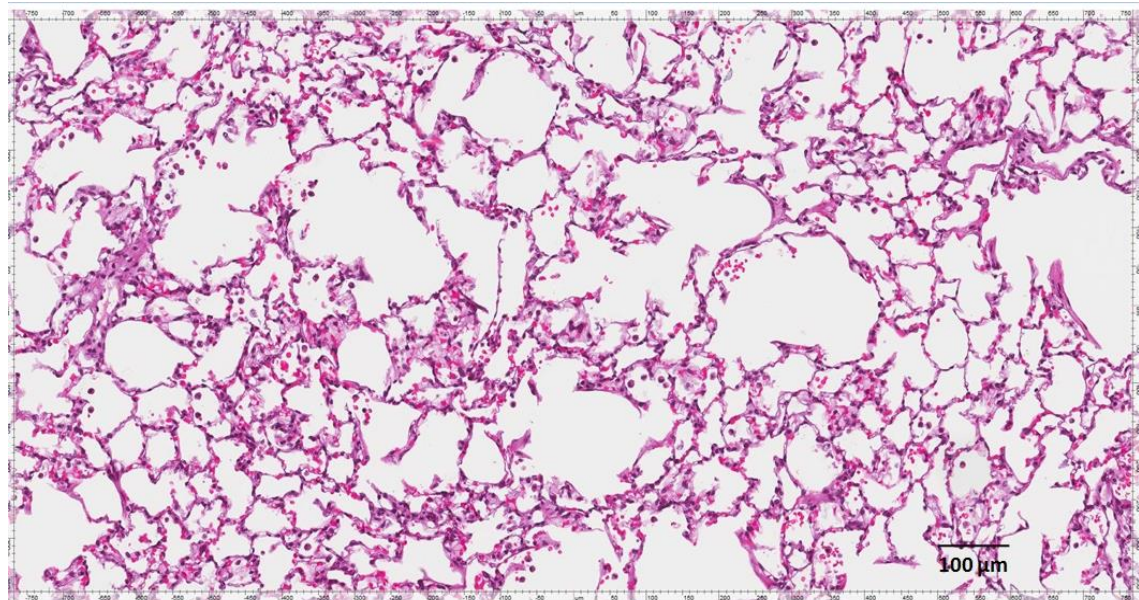


Fig. 5 Corte Histológico de pulmón de cobayo perteneciente al grupo EPOC a 8x

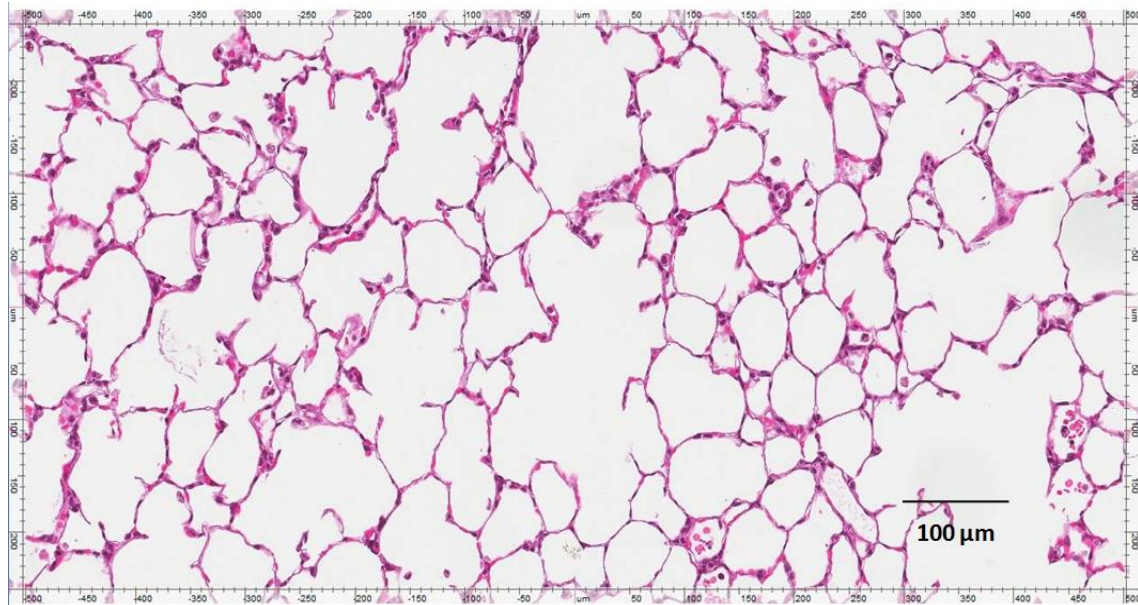


Fig. 6 Corte Histológico de pulmón de cobayo perteneciente al grupo EPOC + CMM con un aumento de 8x.

DISCUSIÓN

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica con sus tratamientos actuales representa un problema de salud a nivel mundial, ya que con el paso del tiempo aumenta el número de personas afectadas con este padecimiento, por lo que es necesario hacer énfasis en explorar otros campos de investigación para encontrar una mejor opción en el tratamiento de la EPOC. Por ello el objetivo de este estudio fue evaluar un posible procedimiento para atenuar el daño provocado por la EPOC, utilizando una terapia experimental basada en células madre mesenquimales buscando así un método más competente.

En los resultados obtenidos de la cuantificación por el método de ELISA para TSG-6 de los grupos SANO y SANO + CMM fueron sorprendentes dado que esta proteína tiene una expresión no constitutiva por lo que no será expresada siempre, a menos que se presente un estado inflamatorio en el organismo (28).

Sin embargo, no siempre sucede de esta forma, considerándose que al ser una proteína multifuncional, es regulada y secretada por una amplia variedad de tipos celulares, entre ellos las células secretoras de factores de crecimiento epidérmicos, así como también fibroblastos siendo estos, componentes de la

epidermis y de la matriz extracelular del tejido de diferentes organismos, incluidos los cobayos lo que justificaría las concentraciones de estos grupos (27).

Ahora bien, se esperaba que los niveles de TSG-6 en el grupo EPOC fueran menores en comparación al grupo que se le instilaron CMM, las cuales producen esta proteína al ser expuestas en condiciones inflamatorias, por lo que se tendría una mayor concentración, sin embargo, ocurrió lo contrario teniendo niveles en EPOC mayores que en todos los grupos (Gráfico 3). Esto podría ser explicado debido a las fuentes de TSG-6 propias del organismo, que buscan regular esta inflamación en el caso del grupo de EPOC, aunque al no disminuir esta inflamación los niveles continúan altos. Por otro lado, con EPOC + CMM la concentración de TSG-6 fue menor debido al injerto de las CMM, ya que proporcionan una mayor fuente de esta proteína, llegando a una concentración óptima para regular a los macrófagos siendo esta consumida, y por tanto la expresión de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ fue disminuyendo como se explica en la Fig.1, adelantando la explicación de los resultados de los grupos EPOC y EPOC + CMM en las citocinas evaluadas.

$\text{TNF-}\alpha$ es una citocina inflamatoria, pero esto no significa que solo será expresada cuando el organismo experimente esta situación, a causa de actuar en niveles tisular y celular, así como también, es ligando para receptores que inician señales de proliferación celular y apoptosis por ello es un factor importante del organismo, encontrándose concentraciones considerables en suero y LBA (32).

Para el caso de la $\text{IL-1}\beta$ no ocurre lo mismo, puesto que esta es fundamental para la respuesta inmune ante infecciones y lesiones (34). Sin embargo, en la técnica de ELISA obtuvimos concentraciones relevantes en los Grupos SANO y SANO + CMM, esto puede explicarse tomando encuenta la forma pro- $\text{IL-1}\beta$ la cual se encuentra en torrente sanguíneo de forma proinflamatoria e inactiva (34).

Con estos resultados podemos decir que se cumplieron con satisfacción nuestros objetivos, comparando los niveles sistémico y local de TSG-6, $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ en todos los grupos (Gráfico 1, Gráfico 4 y Gráfico 7) para tener una manera amplia de observar los factores que se analizaron bajo las condiciones experimentales, donde la técnica ELISA mostro que las concentraciones de suero siempre fueron menores en las de LBA, esto podría sugerir que el modelo de EPOC generó

debidamente la inflamación localizada característica de la enfermedad. Recordando también que se realizaron pruebas histológicas para confirmar dicha premisa. En las cuales son observables las diferencias entre el grupo SANO (Fig. 4) y grupo EPOC (Fig. 5) en color y engrosamiento de las paredes, pero para cuestiones sobre la terapia podemos observar en la Fig. 6 donde las paredes están poco inflamadas, no hay indicios de ruptura alveolar exagerada como en el caso del grupo EPOC el cual tiene enfisema y una gran infiltración de células inflamatorias en el tejido.

Con este proyecto de investigación se pudo observar que TSG-6 tiene influencia sobre el macrófago, porque disminuye la respuesta inflamatoria local por las concentraciones observadas en las ELISAs de TNF- α e IL-1 β en el tejido alveolar.

CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se reportan los niveles de TSG-6 basales para los grupos EPOC y EPOC + CMM, estos hallazgos preliminares pudieran contribuir en las bases de una propuesta para una terapia alternativa a la EPOC, conforme a los resultados obtenidos, sugieren que el TSG-6 tiene un papel importante como un factor de regulación inflamatoria atenuando el grado de esta respuesta en la EPOC, como lo muestran los resultados con las citocinas inflamatorias IL-1 β y TNF- α , así como también en los cortes histológicos el grupo de EPOC + CMM donde las paredes no se encuentran tan engrosadas.

Perspectivas

- Localizar las células de macho en el tejido de la hembra.
- Cambiar el tiempo de exposición.
- Reproducir el modelo con humo de leña.
- Incluir conteo celular

LITERATURA CITADA

1. Gerald LB, Bailey WC. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. *J Cardiopulm Rehabil* [Internet]. 2002;22(4):234–44. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00008483-200207000-00004>
2. Naberan Toña K. Diferencias entre el asma y la enfermedad obstructiva crónica. *Atención Primaria*. 2002;30(10):648–54.
3. Petty TL. The history of COPD. [Review] [100 refs]. *Int J Copd* [Internet]. 2006 Mar;1(1):3–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2706597/>
4. Cosío BG. EPOC. 2007;43(Supl 2):15–23.
5. Mannino DM, Buist AS. Global burden of COPD : risk factors , prevalence , and future trends. *Rev Lit Arts Am*. 2007;370.
6. Rahman I, MacNee W. Oxidant/antioxidant imbalance in smokers and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* [Internet]. 1996 Apr 1;51(4):348 LP-350. Available from: <http://thorax.bmj.com/content/51/4/348.abstract>
7. del Puerto-Nevado L, Pérez-Rial S, Girón-Martínez Á, Peces-Barba G. Papel de la inflamación en la etiopatogenia de la EPOC. *Arch Bronconeumol*. 2010;46(SUPPL.11):2–7.
8. Parker LC, Prince LR, Sabroe I. Translational mini-review series on Toll-like receptors: Networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin Exp Immunol*. 2007;147(2):199–207.
9. Basu S. Toll-like receptors: function and roles in lung disease. *AJP Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2003;286(5):L887–92. Available from: <http://ajplung.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajplung.00323.2003>
10. Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2006 Nov;6(11):823–35. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri1957>
11. Ancochea J, García TG, de Miguel Díez J. Hacia un tratamiento

- individualizado e integrado del paciente con EPOC. *Arch Bronconeumol*. 2010;46(SUPPL.10):14–8.
12. Bourbeau J, Julien M, Maltais F, al et. Reduction of hospital utilization in patients with chronic obstructive pulmonary disease: A disease-specific self-management intervention. *Arch Intern Med* [Internet]. 2003 Mar 10;163(5):585–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.163.5.585>
 13. Miravittles M. [Individually-tailored treatment of chronic obstructive pulmonary disease: a proposed change]. *Arch Bronconeumol* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2017 Oct 9];45 Suppl 5(Supl 5):27–34. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300289609729527>
 14. Rabe KF, Timmer W, Sagkriotis A, Viel K. Comparison of a combination of tiotropium plus formoterol to salmeterol plus fluticasone in moderate COPD. *Chest* [Internet]. 2008;134(2):255–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.07-2138>
 15. Cranston JM, Crockett A, Moss J, Alpers JH. Domiciliary oxygen for chronic obstructive pulmonary disease. In: Cranston JM, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2005 [cited 2017 Oct 9]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD001744.pub2>
 16. Triolet Gálvez A, Bofill Oliva MI, Estrada Alonso AR, Pino Álvarez AA. Ventilación no invasiva con presión positiva. *Rev Cubana Med*. 2002;41(1):29–34.
 17. De Lucas Ramos P, Martín SL, González-Moro JMR. Limitaciones del tratamiento actual: Necesidades no cubiertas en el tratamiento de la EPOC. *Arch Bronconeumol* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2017 Oct 9];46(SUPPL.10):8–13. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300289610700508>
 18. Arce SRA, Mosqueda M de LJ, Gaona HV, Mas MCR, Cortés MÁC, Ríos MAM. ¿Qué son las células troncales o “células madre”? *Vet México*. 2007;38(1):81–104.
 19. Mata M, Vázquez GJ, Sánchez V. Generalidades y aplicaciones de las

- células madre. *Perinatol y Reprod Humana* [Internet]. 2013;27(3):194–9. Available from: <http://www.scielo.org.mx/pdf/prh/v27n3/v27n3a9.pdf>
20. Hug K. Sources of human embryos for stem cell research: ethical problems and their possible solutions. *Medicina (Kaunas)* [Internet]. 2005;41(12):1002–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16401956>
 21. Herreros González J, Prósper Cardoso F, Alegría Ezquerro E. Utilización de células madre para la regeneración miocárdica en la insuficiencia cardíaca. *Rev Española Cardiol* [Internet]. 2003 Oct 1 [cited 2017 Oct 10];56(10):935–9. Available from: http://www.revespcardiol.org/cgi-bin/wdbcgi.exe/cardio/mrevista_cardio.fulltext?pidet=13052378
 22. Doss MX, Koehler CI, Gissel C, Hescheler J, Sachinidis A. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2004 Oct 1 [cited 2017 Oct 10];8(4):465–73. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00471.x>
 23. Prockop DJ. Inflammation, fibrosis, and modulation of the process by mesenchymal stem/stromal cells [Internet]. Vol. 51, *Matrix Biology*. Elsevier; 2016 [cited 2017 Oct 9]. p. 7–13. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X16000032>
 24. Dyer DP, Salanga CL, Johns SC, Valdambri E, Fuster MM, Milner CM, et al. The anti-inflammatory protein TSG-6 regulates chemokine function by inhibiting chemokine/glycosaminoglycan interactions. *J Biol Chem*. 2016;291(24):12627–40.
 25. Prockop DJ, Youn Oh J. Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs): Role as Guardians of Inflammation. *Mol Ther* [Internet]. 2012 Jan 18;20(1):14–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525001616304452>
 26. Lee TH, Wisniewski HG, Vilcek J. A novel secretory tumor necrosis factor-inducible protein (TSG-6) is a member of the family of hyaluronate binding proteins, closely related to the adhesion receptor CD44. *J Cell Biol* [Internet]. 1992 Jan 2;116(2):545–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2289279/>

27. Milner CM. TSG-6: a multifunctional protein associated with inflammation. *J Cell Sci* [Internet]. 2003 May 15;116(10):1863–73. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.00407>
28. Nagyri G, Radacs M, Ghassemi-Nejad S, Trynieszewska B, Olasz K, Hutás G, et al. TSG-6 protein, a negative regulator of inflammatory arthritis, forms a ternary complex with murine mast cell tryptases and heparin. *J Biol Chem*. 2011;286(26):23559–69.
29. Kuznetsova SA, Mahoney DJ, Martin-Manso G, Ali T, Nentwich HA, Sipes JM, et al. TSG-6 binds via its CUB_C domain to the cell-binding domain of fibronectin and increases fibronectin matrix assembly. *Matrix Biol* [Internet]. 2008 Apr 25;27(3):201–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2384166/>
30. Maina V, Cotena A, Doni A, Nebuloni M, Pasqualini F, Milner CM, et al. Coregulation in human leukocytes of the long pentraxin PTX3 and TSG-6. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2009;86(1):123–32. Available from: <http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.0608345>
31. Malaviya R, Laskin JD, Laskin DL. Anti-TNF α therapy in inflammatory lung diseases. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2017 Jun 19 [cited 2017 Oct 9]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725817301560>
32. Bazzoni F, Beutler B. The Tumor Necrosis Factor Ligand and receptor families. *Semin Med Beth Isr Hosp*. 1996;334(26):1717–25.
33. Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2001;18(34):50–9.
34. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1?? secretion. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2011 Aug;22(4):189–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3714593/>
35. Russell REK, Thorley A, Culpitt S V., Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, et al. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2002;283(4):L867–73. Available from: <http://ajplung.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajplung.00020.2002>

36. Rusznak C, Mills PR, Devalia JL, Sapsford RJ, Davies RJ, Lozewicz S. Effect of cigarette smoke on the permeability and IL-1beta and sICAM-1 release from cultured human bronchial epithelial cells of never- smokers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease [In Process Citation]. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2000;23(4):530–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ajrcmb.org/cgi/content/full/23/4/530>