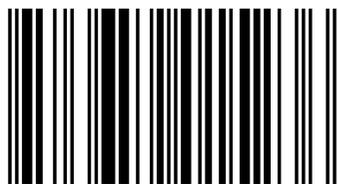


## Modelos experimentales de inflamación y cicatrización con el FILM

Modelos experimentales de inflamación y cicatrización con el FILM abarca un área del conocimiento que permite entender las características anti-inflamatorias del factor inhibidor de la locomoción de los monocitos (FILM), factor relevante en este campo. En base a sus propiedades biológicas demostradas in vivo e in vitro nos permite proponerlo como una posible estrategia terapéutica para obtener resultados clínicos satisfactorios. La colaboración de los co-autores e investigadores que aportan conocimientos básicos de sus líneas de investigación originadas desde hace varios años permitió concluir y presentar esta obra que describe los resultados obtenidos de varios proyectos encaminados, todos ellos, a entender la participación del FILM en la inflamación, cicatrización y recientemente como una molécula neuroprotectora a nivel experimental.

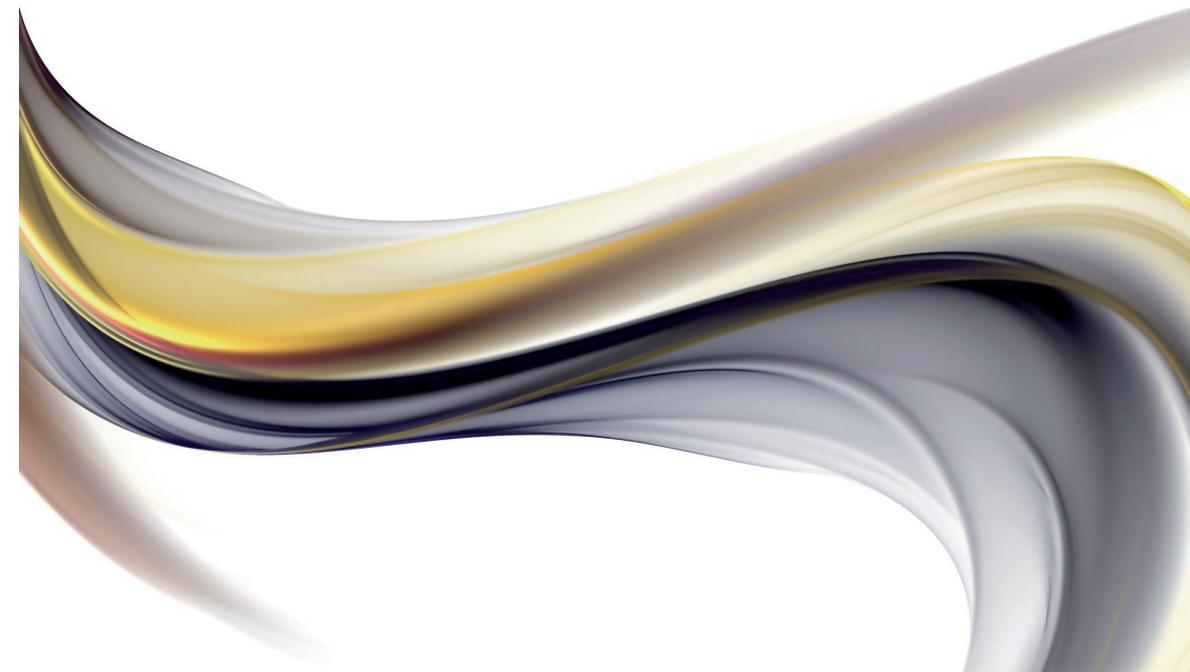
### María Guadalupe Rico

Doctora en Ciencias Biomédicas. Estudió Biología, Maestría y Doctorado en la UNAM. Investigador Titular hasta 2007 en el IMSS. Actualmente pertenece a la División de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM. Premios: Eduardo Liceaga y von Behring Kitasato, Academia Nacional de Medicina; Medalla Alfonso Caso, UNAM; Investigador Nacional, CONACYT.



978-3-659-01523-6

editorial académica española



María Guadalupe Rico

## Modelos experimentales de inflamación y cicatrización con el FILM

El factor inhibidor de la locomoción de monocitos y TGF- $\beta$ : estudios in vivo e in vitro

**María Guadalupe Rico**

**Modelos experimentales de inflamación y cicatrización con el  
FILM**



**María Guadalupe Rico**

**Modelos experimentales de  
inflamación y cicatrización con el FILM**

**El factor inhibidor de la locomoción de monocitos  
y TGF- $\beta$ : estudios in vivo e in vitro**

**Editorial Académica Española**

## **Impresión**

Información bibliográfica publicada por Deutsche Nationalbibliothek: La Deutsche Nationalbibliothek enumera esa publicación en Deutsche Nationalbibliografie; datos bibliográficos detallados están disponibles en internet en <http://dnb.d-nb.de>.

Los demás nombres de marcas y nombres de productos mencionados en este libro están sujetos a la marca registrada o la protección de patentes y son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de sus respectivos propietarios. El uso de nombres de marcas, nombre de producto, nombres comunes, nombre comerciales, descripciones de productos, etc. incluso sin una marca particular en estas publicaciones, de ninguna manera debe interpretarse en el sentido de que estos nombres pueden ser considerados ilimitados en materias de marcas y legislación de protección de marcas y, por lo tanto, ser utilizadas por cualquier persona.

Imagen de portada: [www.ingimage.com](http://www.ingimage.com)

Editor: Editorial Académica Española es una marca de  
LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG  
Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Alemania  
Teléfono +49 681 3720-310, Fax +49 681 3720-3109  
Correo Electronico: [info@eae-publishing.com](mailto:info@eae-publishing.com)

Publicado en Alemania

Schaltungsdienst Lange o.H.G., Berlin, Books on Demand GmbH, Norderstedt,  
Reha GmbH, Saarbrücken, Amazon Distribution GmbH, Leipzig  
**ISBN: 978-3-659-01523-6**

## **Imprint (only for USA, GB)**

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek: The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Any brand names and product names mentioned in this book are subject to trademark, brand or patent protection and are trademarks or registered trademarks of their respective holders. The use of brand names, product names, common names, trade names, product descriptions etc. even without a particular marking in this works is in no way to be construed to mean that such names may be regarded as unrestricted in respect of trademark and brand protection legislation and could thus be used by anyone.

Cover image: [www.ingimage.com](http://www.ingimage.com)

Publisher: Editorial Académica Española is an imprint of the publishing house  
LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG  
Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Germany  
Phone +49 681 3720-310, Fax +49 681 3720-3109  
Email: [info@eae-publishing.com](mailto:info@eae-publishing.com)

Printed in the U.S.A.

Printed in the U.K. by (see last page)

**ISBN: 978-3-659-01523-6**

Copyright © 2012 by the author and LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG  
and licensors

All rights reserved. Saarbrücken 2012

## Co-autores

Dra. Gloria Bertha Vega-Robledo  
Investigador de Carrera  
Profesor Titular de Inmunología en Pre y Posgrado  
Departamento de Medicina Experimental  
Facultad de Medicina, UNAM.

Dr. Raúl Silva-García  
Investigador Asociado, Unidad de Investigación Médica en Inmunología,  
Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano  
del Seguro Social.  
Profesor de Biología Molecular, Universidad del Valle de México, México,  
D.F.

Dr. Juan Antonio Giménez-Scherer  
Investigador Asociado, Unidad de Investigación Médica en Inmunología,  
Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano  
del Seguro Social.  
Profesor de Inmunología, Universidad del Valle de México, México, D.F.

Dr. José Juan Antonio Ibarra Arias  
Docente-Investigador, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad  
Anáhuac, México Norte. Estado de México.  
Centro de Investigación del Proyecto Camina, A. C., México, D. F.

Dr. Carlos Riera Kinkel  
Servicio de Cardio Cirugía Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional  
Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

## **DEDICATORIA**

Este libro es dedicado con todo cariño a la memoria del Dr. Roberto Kretschmer Schmid, tutor, Médico ejemplar, amigo inolvidable e Investigador de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Centro Médico Nacional, Siglo XXI, México, D. F. Su recuerdo perdurará en el ámbito de la ciencia, la cultura y la música.

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| Co-autores  | 1  |
| Índice  | 3  |
| 1.- Introducción  |    |
| 1.1 In inflamación y cicatrización                        | 7  |
| 1.2 Curación de herida                                    | 10 |
| 1.3 Hemostasia  | 11 |
| 1.4 In inflamación  | 12 |
| 1.5 Proliferación y migración                             | 16 |
| 1.6 Angiogénesis y epitelización                          | 17 |
| 1.7 Síntesis de colágena y matriz extracelular            | 19 |
| 1.8 Contracción y remodelación                            | 19 |
| 2.- Modelos experimentales de inflamación y cicatrización |    |
| 2.1 Generalidades   | 21 |
| 2.2 Modelos <i>in vivo</i> de inflamación                 | 23 |
| 2.3 Modelos de hipersensibilidad retardada por contacto   | 23 |
| 2.4 Modelos de cicatrización                              | 24 |
| 2.5 Cicatrización en piel                                 | 24 |
| 2.6 Cicatrización en cavidades                            | 25 |
| 2.7 Lesión en ápex de corazón                             | 26 |
| 2.8 Lesión de las vías de conducción nerviosas            | 27 |

|  |    |
|--|----|
| 3.- Modelos <i>in vitro</i>                                |    |
| 3.1 Amibiasis  | 30 |
| 3.2 Reacción inflamatoria en amibiasis                     | 30 |
| 3.3 Amibiasis y FILM                                       | 31 |
| 3.4 Efectos biológicos                                     | 31 |
| 4.- Material y métodos                                     |    |
| 4.1 Síntesis de los métodos utilizados                     | 34 |
| 4.2 Vías de administración                                 | 35 |
| 4.3 Modelos inflamatorios en animales                      | 35 |
| 4.4 Modelos para cicatrización en animales: piel           | 36 |
| 4.5 Modelos en cavidades corporales                        | 36 |
| 4.6 Modelos en corazón y sistema nervioso                  | 37 |
| 4.7 Inhibición de cicatrización en pericardio              | 38 |
| 4.8 Animales con adyuvante                                 | 39 |
| 4.9 Inmunización   | 39 |
| 4.10 Modelo <i>in vivo</i> del efecto del FILM             | 40 |
| Determinación de concentración y expresión de TGF- $\beta$ | 40 |
| Cuidado de los animales                                    | 41 |
| Obtención de médula espinal                                | 41 |
| Extracción de mRNA total                                   | 42 |
| Síntesis de DNA  | 42 |

|   |    |
|---|----|
| PCR Tiempo Real   | 43 |
| Método estadístico  | 44 |
| 4.11 Modelo <i>in vitro</i> del efecto del FILM               |    |
| Cultivo celular: FM   | 44 |
| Cultivo celular: U-937 y MRC-5                                | 45 |
| Diseño experimental   | 45 |
| TGF- $\beta$  | 46 |
| Análisis estadístico  | 46 |
| 5.- Consideraciones éticas                                    | 46 |
| 6.- Resultados  |    |
| 6.1 Hipersensibilidad por contacto                            | 47 |
| 6.2 Cicatrización cutánea en cobayos                          | 47 |
| 6.3 Inhibición de adherencias intraperitoneales               | 48 |
| 6.4 Inhibición de adherencias pericárdicas                    | 48 |
| 6.5 Determinación de TGF- $\beta$ en suero                    | 49 |
| 6.6 Determinación de la expresión de TGF- $\beta$             | 49 |
| 6.7 Determinación de TGF- $\beta$ en sobrenadantes de células | 49 |
| 6.8 Determinación de TGF- $\beta$ en animales con AF          | 50 |
| 6.9 Estudio macroscópico                                      | 50 |
| 7.- Discusión   | 51 |
| 8.- Conclusiones  | 59 |

|                     |    |
|---------------------|----|
| 9.- Agradecimientos | 61 |
| 10.- Bibliografía   | 62 |
| 11.- Figuras        |    |
| 11.1 Figura 1       | 69 |
| 11.2 Figura 2       | 70 |
| 11.3 Figura 3       | 70 |
| 11.4 Figura 4       | 71 |
| 11.5 Figura 5       | 72 |
| 11.6 Figura 6       | 73 |
| 11.7 Figura 7       | 74 |
| 11.8 Figura 8       | 74 |
| 11.9 Tabla 1        | 75 |

## **INTRODUCCIÓN**

### **INFLAMACIÓN Y CICATRIZACIÓN**

Los seres vivos inevitablemente enfrentan el riesgo de heridas producidas por el contacto con un medio ambiente hostil y por luchas con otros organismos, sean predadores mayores o parásitos de menor dimensión. A lo largo de la evolución los organismos desarrollaron mecanismos para enfrentar ambos riesgos, muchas veces coincidentes.

Los vertebrados, incluidos el ser humano y los animales de experimentación como la rata, el ratón, el cobayo, también conocido como conejillo de indias y el Jerbo, tienen poderosos y muy complejos mecanismos defensivos que se engloban en los procesos para la curación de heridas y en la respuesta inflamatoria-inmunológica.

Aunque estudiadas por separado, ambos procesos interactúan armoniosamente. Definir si el proceso de curación de heridas es la parte inicial de la respuesta inmune o si la segunda es sólo un componente destacado de la primera es una discusión necesaria solo en ciertas condiciones. En esta presentación seguiremos un enfoque ortodoxo donde la respuesta inflamatorio-inmunológica es un componente intermedio de la secuencia de curación de heridas, entre la hemostasis inicial y la cicatrización final.

Es precisamente esta situación intermedia la que multiplica la relevancia de las células encargadas de realizarla. Estas células son los leucocitos, que de una manera muy general se dividen sus tareas en una respuesta inflamatoria rápida o aguda, encarnada por los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y una respuesta inflamatoria tardía, encarnada por los linfocitos y los monocitos o macrófagos. Las otras estirpes, eosinófilos y basófilos desempeñan funciones más especializadas.

Los linfocitos, desarrollaran la respuesta y la memoria inmunológicas propiamente protegiéndonos de nuevas agresiones por sustancias u organismos específicos previamente confrontados.

Los macrófagos o grandes fagocitos, desempeñan funciones más discretas pero claves, al fagocitar y presentar las sustancias extrañas a los linfocitos para la respuesta inmune propiamente. Además limpian el lugar de materiales de desecho, incluidos materiales extraños como tierra y tejidos propios muertos o dañados. Esta labor de limpieza prepara el terreno para la reconstrucción, en las dos etapas de la cicatrización, que serán lideradas por los fibroblastos. Sin embargo el enlace inflamación-cicatrización no es espontáneo o automático. Durante esa transición los monocitos y los linfocitos deben generar un amplio número de señales para, por una parte atraer primero y activar después a los fibroblastos, y por otra para enviar señales de apagado para limitar y extinguir el proceso inflamatorio en desarrollo.

La vida y la curación de heridas, son muy complejas, y cuando los procesos inmuno-inflamatorios van dirigidos a defenderse de algún parásito no es sorprendente que el organismo parásito trate de neutralizar los mecanismos de defensa del hospedero, generando una co-evolución de muchas facetas. Es aquí donde aparece el “Factor Inhibidor de la Locomoción de los Monocitos” (FILM) del cual hablaremos ampliamente más adelante y la relación con *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), no sin antes dar un ligero esbozo de la relación entre ambos. *E. histolytica* es un protozooario que normalmente vive asintómicamente en la luz del intestino del ser humano. En ciertas circunstancias pasa al interior del cuerpo, allí se inicia una batalla entre los leucocitos y el parásito. Pocas amibiasis intestinales se transforman en invasoras extraintestinales, particularmente hepáticas. Sin embargo, entre

50 000 y 100 000 muertes anuales atestiguan la capacidad de la amiba para superar a su hospedero. Los trofozoitos de *E. histolytica* pueden ser encontrados en el absceso hepático amibiano (AHA) rodeados de hepatocitos muertos. Los monocitos y linfocitos se acumulan formando un anillo en el borde del absceso pero sin poder llegar a entrar en contacto con las amibas, como si algo los mantuviera paralizados. Esta imagen microscópica es contraria a los abscesos típicos ante otros microorganismos en el hígado o en otros órganos.

Esta inflamación atípica fue señalada ya por Councilman y Lafleur desde 1895 y permaneció, corroborada, pero inexplicada, por muchos años (1).

Hacia 1974 Brandt y Pérez Tamayo propusieron la teoría anti-migratoria, postulando algún factor todavía hipotético que inhibiera la movilidad de los leucocitos de la inflamación tardía (2). La inhibición de los leucocitos de la inflamación tardía podría además evitar la generación de señales para iniciar la cicatrización y explicar así la ausencia de cicatrices posteriores al AHA.

En un experimento planteado por el Dr. Roberto Kretschmer en 1985, y diseñado originalmente para buscar factores de amiba que fueran atrayentes para los leucocitos de movilidad rápida (PMN y monocitos), se encontró sorpresivamente un factor que inhibía la locomoción de los monocitos en cámaras de Böyden (un tubo en U con dos compartimientos separados por un filtro) (3). El seguimiento de ese factor (*vide infra*) en los medios de cultivos axénicos de *E. histolytica* llevó a la identificación del FILM (4). Ahora sintetizado y probado, encontrándose que el péptido sintético es capaz de reproducir los efectos del FILM amibiano facilitando el desarrollo de nuevos estudios. Los estudios realizados, incluyendo los que se presentan a continuación han permitido aumentar la comprensión de la patología de la amibiasis extraintestinal humana, que fue la motivación original, permitiendo explicar por ejemplo la inflamación atípica y la restitución del hígado por regeneración sin escaras de cicatrización. Una vez identificado este factor

“inventado” por la amiba, surgió la inquietud de si sería posible aprovecharlo como un eventual medicamento anti-inflamatorio de propiedades selectivas.

La escasa inflamación tardía característica de la amibiasis extraintestinal es un fenómeno que entra perfectamente dentro del campo de la inmunología. Todos los datos que se fueron obteniendo del FILM, lo señalaban como un factor relevante en este campo del conocimiento científico. Sin embargo la inflamación crónica es seguida por la cicatrización. La interrupción de las señales de enlace podría cortar la activación de esa etapa, sugiriendo un papel para el FILM en ella. Dos estudios apoyaron la posibilidad de esta segunda esfera de actividad del FILM. El factor afecta la expresión de más genes relacionados con cicatrización en la línea fibroblástica MRC-5 que genes relacionados con la inflamación en la línea U-937 que es promonocítica. Además y destacadamente, en el Gene Bank aparece la secuencia del FILM en una molécula que interactúa con el receptor tipo tres de fibroblastos y no, pese a una búsqueda sistemática, en líneas leucocíticas.

Como la cicatrización excesiva puede ser un problema también aquí el FILM podría resultar útil, por lo que a continuación se recapitula el proceso de curación de heridas en su sentido más amplio y que incluye inflamación y cicatrización.

### **Curación de heridas**

Independientemente del tipo y de la magnitud de la pérdida de tejido, la curación de una herida 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, por lo que producen un estado de hipermetabolismo sistémico y catabólico. El proceso de curación o reparación de una lesión está dividida en tres fases: Fase inicial: hemostasia

e inflamación; Fase intermedia: proliferación, migración, epitelización, granulación y angiogénesis); Fase final: síntesis de colágena, contracción y remodelación tisular (5, 6).

## **Hemostasia**

Después de una herida lo primero que ocurre es la hemorragia, y la curación de la misma se da por una hemostasia. Es el proceso a través del cual se evita la pérdida sanguínea en el sitio de daño vascular. Inmediatamente hay vasoconstricción, favorecida por serotonina, tromboxano y endotelina que son secretados por células endoteliales y plaquetas. Las plaquetas activadas por sustancias como colágena y trombina, aumentan la expresión de moléculas de adherencia, lo que les permite fijarse a la colágena, expuesta por la ruptura de vasos sanguíneos, y agregarse para formar un coágulo, que se refuerza por la adición de fibrina. 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, de las plaquetas, de los fibroblastos y de las células endoteliales; éstos elementos facilitan la unión y la migración de células (5,7).

Activación de plaquetas. Las células participantes liberan además, sustancias inflamatorias y citocinas. Las plaquetas en particular, al ser activadas degranulan y enriquecen el medio con factor de crecimiento epidérmico (EGF), fibrinógeno y factor von Willebrand, que contribuyen a controlar el sangrado. Son la principal fuente de factor transformante de crecimiento (TGF)  $\beta$ , que inicialmente favorece la inflamación, pero en breve regula la respuesta inmune, frena la inflamación y favorece la angiogénesis y la cicatrización. Otros elementos provenientes de las plaquetas como fibronectina, histamina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), son elementos quimioattractantes que inducen la llegada de fibroblastos,

células endoteliales, neutrófilos y macrófagos, células asesinas naturales (NK) y miocitos.

Formación del coágulo. En la coagulación participan factores que circulan como proenzimas, al activarse, se inicia una serie de reacciones en cadena, que se generan en la superficie celular para formar trombina, que es la enzima efectora central de éste sistema.

Un modelo propuesto por Hoffman y col. considera a las células como elementos esenciales en el proceso de formación del coágulo; las superficies celulares poseen elementos que las capacitan para dirigir y regular el proceso (8). Se activa mediante la interacción de superficie celular, factor tisular y factor VII, en tres fases simultáneas: inicio, amplificación y propagación.

La trombina convierte al fibrinógeno en fibrina que atrapa plasma, plaquetas y eritrocitos para formar el coágulo.

## **Inflamación**

La inflamación es una reacción vascular y celular inespecífica fundamental en una respuesta protectora. Esta respuesta de defensa, actúa como un mecanismo homeostático para adaptar al organismo a circunstancias anormales. El proceso es complejo y se presenta como respuesta tanto a infecciones como a una diversidad de estímulos generadores de lesión tisular (tóxicos, traumáticos, isquémicos, autoinmunes, etcétera).

La respuesta inflamatoria es benéfica si es breve y se localiza en el sitio del daño; por el contrario se torna patogénica si tiene una extensión o duración excesivas (9).

La inflamación tiene como objetivos: localizar el proceso, remover el agente causal y reparar el área dañada.

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 (10).

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. Entre las principales moléculas reguladoras del proceso, secretadas por las células participantes, se encuentran mediadores de la inflamación: histamina, serotonina, bradicinina, eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos). Citocinas: tempranas o de “alarma”: IL-1, IL-6, factor de necrosis tumoral (FNT) son las conductoras del proceso; quimioatrayentes: IL-8, proteína quimioattractante de monocitos (MCP), RANTES; inductoras de la respuesta linfocítica: IL-2, IL-4, IL-12, IL-18; generadoras de células en médula ósea: IL-3, IL-11, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); supresoras: IL-10, TGF $\beta$  (11).

La inflamación por su extensión puede ser local o sistémica y por su duración aguda o crónica. La fase aguda es de duración corta (minutos, horas o pocos días), se lleva a cabo en la microcirculación y se caracteriza por el paso de proteínas plasmáticas y leucocitos de la sangre a los tejidos, El proceso es regulado por moléculas que actúan directamente sobre las diferentes poblaciones celulares ubicadas en el entorno del área infectada o lesionada.

Por la acción de quimioattractantes como IL-8, C5a, histamina, leucotrieno B4, lipopolisacáridos, restos de fibrina o colágena, las áreas lesionadas reclutan, además de células de la circulación, a las que se encuentran en reposo adheridas a la pared endotelial. Inicialmente llegan neutrófilos, característicos de inflamación aguda, y posteriormente en un lapso de 24 a 72 horas participan monocitos, fagocitos y linfocitos. Las células tisulares adyacentes (cebas, fibroblastos, queratinocitos, etcétera), son de las primeras en llegar, en ser activadas y en promover la inflamación.

La vasoconstricción presente al inicio de una lesión vascular, va seguida rápidamente por vasodilatación, inducida principalmente por las sustancias

inflamatorias: histamina, bradicinina, triptasa, e icosanoides, que son secretadas desde los primeros segundos por los mastocitos locales y las células endoteliales activadas; aumenta el flujo de sangre en el área inflamada lo que genera elevación de la temperatura y enrojecimiento local (calor y rubor). La dilatación vascular permite el paso de líquido y proteínas sanguíneas, éstos al acumularse producen edema (tumor). La distensión tisular, la acción de la bradicinina y el estímulo que lo anterior ejerce en las terminaciones nerviosas, originan el dolor, última de las cuatro manifestaciones clínicas cardinales de la inflamación, descritas por Celsius. Los neutrófilos 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 (10). 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 (12). Si el agresor persiste o el proceso no limitó el daño, la inflamación aguda, inicialmente local, se transforma en sistémica o crónica.

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 TGF- $\beta$ , iniciando su migración en la inflamación aguda y a las 48 h 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 microbios ingeridos. Las señales de activación incluyen citocinas secretadas por linfocitos T sensibilizados por ejemplo interferón gamma ( $\text{IFN-}\gamma$ ), 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 (13).

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 ( $\text{TNF-}\alpha$ ), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), la Interleucina 1 (IL-1),  $\text{TGF } \alpha/\beta$  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 factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) (14).

La importancia del macrófago radica en la producción de sustancias biológicamente activas, 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 (7,10).

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.

El proceso inflamatorio llega a su término al desaparecer el estímulo, simultáneamente actúan el cortisol, la proteína C reactiva y las citocinas IL-10 y TGF- $\beta$  (11) para limitar la respuesta e inhibir la actividad de IL-1, IL-6 y FNT. TGF- $\beta$  promueve la angiogénesis y aumenta la producción de fibrina y colágena, lo que culmina con la reparación del tejido dañado. Las células T reg Fox-P3 también participan en la limitación de la inflamación (15).

Si el proceso inflamatorio se vuelve crónico, a la exacerbación de los eventos señalados se sumará la destrucción celular y el depósito de fibrina en los sitios inflamados. Esto llevará a la limitación o pérdida de la función, así como al daño que un proceso, como el descrito puede producir al mantenerse activo durante un lapso prolongado.

### **Proliferación y migración**

Para que se lleven a cabo estos procesos se requiere de energía, síntesis proteica y anabolismo. Cuando la lesión tiene 4 días, los fibroblastos son las células fundamentales del proceso. Estos se encuentran en el tejido sano perilesional y son 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- $\beta$ , factor de crecimiento epidérmico (EGF), péptidos de colágena y fibronectina (5,7,10).

### **Angiogénesis y epitelización**

La formación de nuevos capilares de una red vascular preexistente es de vital importancia en procesos fisiológicos (embriogénesis, cicatrización) y patológicos (aterosclerosis, cáncer). Simultáneamente principia la proliferación de fibroblastos.

En procesos reparativos ésta neoformación vascular permite la llegada de nutrientes requeridos para soportar el aumento del metabolismo celular y la eliminación de restos tisulares. El tejido de granulación posee vasos sanguíneos que lo proveen del oxígeno necesario para estimular la reparación y el crecimiento vascular.

Hay factores pro y anti-angiogénicos en el fluído de las heridas que promueven o inhiben ésta neoformación.

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 vascular endotelial (VEGF) estimula la producción de especies reactivas de oxígeno-ROS; el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), recluta pericitos para cubrir el exterior de los vasos recién formados; la angiopoietina; el TGF- $\beta$ , estimula a los fibroblastos para producir colágena y libera enzimas como colagenasa y estromelisin, que degradan a la matriz

extracelular dañada, es pro y anti-inflamatoria y, disminuye la respuesta inmune; 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). Este proceso se altera si hay exceso de inflamación, muerte tisular, exudado o mala perfusión.

Simultáneamente da inicio la formación del tejido de granulación con el predominio de los fibroblastos. Estas células son estimuladas por citocinas, de manera importante TGF $\beta$ , cuya disponibilidad y liberación es regulada por la proteína LTBP4 (proteína unidora del TGF) en fibroblastos normales, la citocina actúa a través de la vía Smad (5). Al ser activados por el TGF, los fibroblastos proliferan y secretan elementos que integran la matriz extracelular de soporte inicial, como fibronectina, ácido hialurónico, proteoglicanos y colágena, cuyas fibras constituyen las estructuras a través de las cuales se desplazan las células participantes en la regeneración tisular.

En la epitelización el tejido granular permite que una herida abierta se reepitelice. Al existir pérdida de la epidermis, los queratinocitos son las primeras células que migran y proliferan en el sitio de la lesión. Si la membrana basal está íntegra, los queratinocitos se desprenden de ella y penetran en la base de la herida. Si la membrana está dañada, la reepitelización se logra a través de queratinocitos ubicados en anexos de la piel como folículos o glándulas. Las células epiteliales necesitan tejido viable para migrar y participar, se superponen al hacerlo y al adherirse a la membrana basal la conforman; estas células continúan su recorrido a través de la herida. Las células epiteliales fagocitan restos tisulares para poder migrar y los queratinocitos disuelven el coágulo y restos de la membrana basal (16), lo que le permite desplazarse por la ECM depositada por los

fibroblastos. Las células de los bordes de la lesión proliferan y migran un máximo de 3 cm, todo el proceso puede durar de 3 a 5 días hasta meses.

Las citocinas que controlan este proceso son: EGF, TGF- $\alpha/\beta$ , IGF, FGF y KGF (6,7).

### **Síntesis de colágena y matriz extracelular**

Esta fase se caracteriza por la síntesis de proteínas de matriz y colágena, en donde los fibroblastos activados producen factores de crecimiento como el FGF y sintetizan colágena, en forma de precolágena. Su producción depende de varios factores como aminoácidos, hierro, vitamina C y A, zinc, cobre y O<sub>2</sub>.

En la síntesis de la colágena participan: FGF, EGF, TGF- $\beta$  (estimulante potente de su síntesis e inhibidor de la actividad de las proteasas), PDGF que influencia la expresión de TGF- $\beta$  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 (6). El proceso se puede alterar por disminución en la irrigación y malnutrición.

### **Contracción y remodelación**

Los fibroblastos transformados en miofibroblastos, que se caracterizan por poseer pseudópodos potentes, son capaces de proporcionar un soporte mecánico resistente al unir fibronectina y colágena con lo que da inicio el proceso de contracción de la cicatriz. 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- $\beta$  que facilita la contracción y la diferenciación hacia miofibroblasto, el PDGF que estimula la contracción por un mecanismo TGF- $\beta$  dependiente, FGF que estimula la contracción e IFN- $\gamma$  que inhibe el proceso. El TGF $\beta$  es una citocina que participa importantemente en las diferentes fases de la regeneración tisular y la cicatrización; se expresa constitutivamente en muchas células como son las óseas, placentarias, del iris del ojo, eritrocitos, linfocitos, eosinófilos, macrófagos. La plasmática proviene principalmente de las plaquetas, se sintetiza como un precursor inactivo, que debe de ser activado (a pH ácido), para unirse a sus receptores específicos (16), su producción es muy estable y participa además el crecimiento celular (17), la respuesta inmune y la tolerancia (18), e induce angiogénesis y cicatrización, aumentando el depósito de colágena (19).

Con la contracción disminuye el tamaño de la herida, que puede reducirse entre 40 y 80%; en ésta etapa el cierre de la herida se acelera. La ruptura de la matriz provisional frena la migración, proliferación y diferenciación de los fibroblastos. Esta etapa finaliza cuando los miofibroblastos ya no se contraen y mueren por apoptosis.

La remodelación es la etapa final de la reparación de una lesión, en ella el tejido de granulación es convertido en tejido conectivo maduro, resistente y con frecuencia en una cicatriz.

Para conseguir el remodelado de la cicatriz entran en juego numerosas enzimas del grupo de las metaloproteasas con actividad colagenolítica, conocidas como metaloproteasas de matriz (MMP). Entre ellas encontramos:

MMP1 (colagenasa intersticial ó metalopeptidasa), MMP2 (gelatinasa A) MMP3 (estromelisin) y la hialuronidasa (6, 10).

Durante ésta fase la fibronectina desaparece gradualmente y el ácido hialurónico y otros glicosaminoglicanos son reemplazados por proteoglicanos. La colágena tipo III es reemplazada por otra más resistente que es la tipo I; las fibras se reorganizan y se ordenan a lo largo de líneas de tensión. Los fibroblastos y los macrófagos son eliminados por apoptosis y disminuye la actividad metabólica en el sitio de la lesión.

El proceso de reparación de una herida finaliza con una cicatriz totalmente madura y una disminución de células y vasos sanguíneos (21).

Si bien el TGF- $\beta$  disminuye la inflamación, puede favorecer el proceso fibrótico. Estudios *in vivo* han confirmado que el TGF- $\beta$  exógeno incrementa el tejido de granulación, y la formación de colágena; por lo que, el aumento en los niveles de TGF- $\beta$  se asocia con ambos, el proceso reparativo normal o la fibropatología.

## **MODELOS EXPERIMENTALES DE INFLAMACIÓN Y CICATRIZACIÓN**

### **Generalidades**

Existe un amplio número de modelos experimentales, en distintas especies de animales de laboratorio que permiten evaluar inflamación, inmunidad y cicatrización. Cada modelo tiene ventajas y desventajas, que varían en función de las preguntas que se busca responder y la información disponible. El origen ambiguo del FILM y su identificación inicial como la actividad inhibitoria de un sobrenadante de cultivos de amibas sobre los monocitos, así como el grado de similitud de las respuestas estudiadas con el humano, la disponibilidad de reactivos y los modelos previamente utilizados resultan

determinantes tanto en la metodología como la especie animal a elegir, no siempre la misma, para cada grupo experimental.

### **Las especies animales elegidas**

Los animales de laboratorio más utilizados son el ratón y la rata. Sin embargo ambas especies son resistentes a la amibiasis y además su respuesta de hipersensibilidad cutánea por contacto no es equivalente a la humana.

El cobayo o conejillo de indias es la especie paradigmática para evaluar la respuesta inflamatoria expresada como hipersensibilidad cutánea retardada por contacto. Además es sensible a la infección amibiana lo que lo hace el modelo ideal para el estudio *in vivo* de los efectos anti-inflamatorios del FILM. Sus dimensiones y características también ayudan y permiten adaptar el modelo para experimentos de cicatrización cutánea y en cavidades. La mayor limitación está en la disponibilidad de anticuerpos marcadores específicos, aunque como roedor, muchas moléculas diseñadas para el ratón o la rata pueden interactuar con las moléculas equivalentes en el cobayo.

El Jerbo (*Meriones unguiculatus*) algo mayor a un ratón, es susceptible a desarrollar abscesos hepáticos amibianos, lo cual lo vuelve ideal para el estudio de esta variante patológica de la amibiasis. Protocolos previos (22) en este modelo, produjeron varias de las observaciones que motivaron el análisis del efecto modulador en la interacción adyuvante de Freund y el animal. Proporcionando al mismo tiempo modelos adecuados para el estudio de inflamación y cicatrización.

Aunque el ratón no es el mejor modelo ni de amibiasis ni para hipersensibilidad, el ensayo en el ratón de los modelos probados en cobayo y

jerbo resulta inevitable cuando se quieren analizar los procesos a nivel molecular debido al amplísimo número de reactivos específicos disponibles para esta especie, y permite además obtener, con los ajustes y precauciones correspondientes, información en otra especie de las observaciones en cobayo o jerbo.

La rata tampoco resulta el modelo ideal ni para amibiasis ni para inflamación tardía. Pero también puede ser adaptada para verificar los efectos encontrados en otras especies. Particularmente en respuesta peritoneal al adyuvante de Freund, pero sobre todo es el modelo de referencia preexistente para los estudios de lesión traumática de la médula espinal.

Por esta razón el estudio en las cuatro especies, a pesar de las limitaciones que implica, es necesario dentro de la evaluación sistemática del FILM.

## **A) Modelos *in vivo***

### **Modelos de inflamación y cicatrización**

Existe un amplio número de modelos *in vivo*, útiles muchas veces en humanos y animales, para el estudio de inflamación y cicatrización, en forma integral o sobre los aspectos de interés para cada investigación particular. A continuación se comentarán aquellos que han sido de interés para las investigaciones del FILM producido por la amiba.

### **Modelos de inflamación; Hipersensibilidad retardada cutánea por contacto**

Existe un amplio número de modelos y variantes para estudiar la inflamación *in vivo*. Un modelo experimental antiguo, pero aún útil y vigente es el de la hipersensibilidad retardada cutánea por contacto a distintos irritantes, entre ellos y clásicamente el di-nitro-cloro-benceno. Una dosis grande o

sensibilizante del irritante se pone en contacto con la piel y dos semanas después se aplica en otra parte de la piel del animal otra dosis, esta vez menor de la sustancia (dosis de reto). Esta genera si la respuesta es positiva un área de enrojecimiento (eritema) y engrosamiento endurecido (induración) entre 24 y 72 horas posteriores al contacto, que luego desaparecen. La inyección intradérmica de las sustancias en estudio, bajo la zona donde se aplicará la dosis de reto permite evaluar el efecto modulador de ésta. El cobayo es el animal ideal para este tipo de pruebas.

### **Modelos de cicatrización**

El enfoque básico para el estudio experimental de la cicatrización incluye activarla por algún mecanismo (herida, traumatismo, corte, irritación, quemadura, infección etc.) y evaluar el efecto de alguno de los distintos agentes moduladores. Se puede explorar el proceso como un todo o de componentes, vías o tiempos selectos.

Desde el punto de partida del estudio del FILM interesarían los modelos donde la transición inflamación-cicatrización fuera muy importante, o por el contrario casi ausente.

### **Cicatrización en piel; herida quirúrgica limpia en piel**

La incisión de la piel como parte de una cirugía es habitual, tanto en medicina humana como en veterinaria. Se busca que sea lo menos traumática posible e incluye procedimientos para favorecer su cierre como son la aposición correcta de los bordes de la herida, puntos de sutura o bandas adhesivas. También se conocen sus eventuales complicaciones, por exceso (cicatrices excesivas), insuficiencia (dehiscencia) o infección. Disponer de productos que permitan evitar una cicatrización excesiva, en los casos que puede ser prevista, sin caer en efectos de inhibición excesiva que generen separación, desgarró o infección de la zona serían muy útiles. Las

incisiones quirúrgicas pueden ser subdivididas en dos grandes grupos. Según haya o no remoción tisular. La realización de una biopsia en sacabocado y la incisión lineal simple son ejemplos de ambas situaciones. El efecto del FILM, como de cualquier otro modulador de cicatrización puede ser evaluada mediante su adición controlada en estos modelos, que por sus características inducen una respuesta inflamatoria muy suave y una cicatrización dentro de los cauces normales de la curación de heridas.

### **Cicatrización en cavidades; adherencias peritoneales**

Los procesos de cicatrización también ocurren en las cavidades corporales, donde el roce entre las capas de un peritoneo lastimado puede generar adherencias entre distintas estructuras. Las adherencias ocurren después de muchas cirugías, pero son más frecuentes, graves e intensas en condiciones de irritación excesiva con una inflamación intensa o persistente. Las adherencias como consecuencias de peritonitis químicas o infecciosas son frecuentes y pueden llegar a generar molestias y complicaciones graves y/o que requieran solución. A diferencia de las cicatrices quirúrgicas “limpias” estas cicatrices secundarias a un proceso irritativo llevan a una inflamación muy intensa y prolongada que es la desencadenante también de una cicatrización muchas veces excesiva, en intensidad y extensión.

Evitar la formación de adherencias excesivas cuando son previsibles es también un problema médico científico en evolución, y cuya solución sería de utilidad práctica.

Los modelos de estudio incluyen la administración medida de un activador de la inflamación cicatrización en presencia o ausencia del factor modulador que se desee probar. El adyuvante de Freund es una preparación que se ha utilizado como inmunoadyuvante inespecífico en muy diversos esquemas experimentales. Sus características, su efecto pro-inflamatorio y, a través de

la inflamación, sus efectos en la cicatrización pueden ser analizadas y moduladas en presencia de reguladores de uno o ambos procesos.

### **Lesión física en el ápex del corazón**

Las condiciones del corazón y la cavidad pericárdica representan una situación excepcional bajo la perspectiva de las respuestas inflamatoria y cicatricial. Comparten con otros tejidos la capacidad de generar ambas respuestas pero la movilidad permanente del corazón con el inevitable roce de las hojas parietal y visceral del pericardio, genera una estimulación extrema de ambos procesos. El resultado puede comprometer la vida del paciente. Ya sea en forma directa, por ejemplo en el síndrome pospericardiotomía, que corresponde a una reacción inflamatoria normal pero extraordinaria, o también por la formación de adherencias cardioparietales que pueden limitar y deformar la movilidad cardiaca. El efecto indirecto más notable es la generación de intensas y resistentes adherencias que complican las cirugías de reintervención en el corazón, y cuya prevención sería de gran utilidad.

Paradójicamente, a partir de este escenario, y bajo la premisa de que la neovascularización que ocurre en la cicatrización podría ayudar a restituir la circulación en casos de isquemia cardiaca, se diseñó el modelo de cicatrización por pericardiotomía. Este en esencia es operar, abrir el pericardio, cerrarlo y suturar.

Puede reforzarse con un estímulo abrasivo, al frotar ligeramente el ápex cardiaco con una lima para uñas. Este procedimiento es suficiente para generar un proceso inflamatorio-cicatricial intensísimo. Desafortunadamente la neovascularización no fue suficiente para corregir la isquemia cardiaca. En cambio permitió un modelo adecuado para tratar de inhibir la cicatrización mediante la aplicación de algún procedimiento anticicatrización. Este modelo hace factible el estudio del FILM como regulador de estos procesos.

## **Lesión traumática de las vías de conducción nerviosas**

La Lesión Traumática de Médula Espinal (LTME) es una enfermedad que ocasiona alteraciones estructurales y funcionales con secuelas sobre las funciones a nivel neural, que van desde un bloqueo transitorio de la conducción eléctrica hasta la falta total de la misma, dependiendo del grado de lesión. Después de la LTME hay destrucción del parénquima medular y un proceso neurodegenerativo crónico que se inicia por los mediadores inflamatorios y otras sustancias que incrementan la necrosis y la desmielinización.

Durante la respuesta inflamatoria se llevan a cabo diferentes eventos. Inicialmente existe un incremento en la permeabilidad vascular y la liberación de lípidos con la consiguiente activación de la vía de los eicosanoides y del factor activador de plaquetas. Se liberan IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y también pequeños péptidos como la bradisinina, y aminas como la histamina ó 5 hydroxytriptamina, al incrementarse la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, se altera el flujo sanguíneo y favorece la agregación plaquetaria lo que trae como consecuencia el fenómeno de isquemia (23). Uno de los fenómenos más importantes que se lleva a cabo después de una LTME es la migración de un gran número de células inflamatorias residentes (células de la microglía) y de aquellas reclutadas de la periferia (macrófagos, linfocitos, etc.). La infiltración de dichas células es indistinguible de la que se lleva a cabo en tejidos periféricos lesionados y es típica de las fases tempranas de la lesión.

La respuesta inmune desarrollada después de una LTME involucra dos etapas de infiltración celular. La primera por células PMN y predomina durante las primeras horas. Los neutrófilos aparecen en la pared de las

venas y vénulas adyacentes a la lesión en las primeras 3 a 4 horas. La segunda etapa de infiltración celular se caracteriza por la presencia de macrófagos, aparecen en los primeros dos días y alcanzan un pico de los 5 a 7 días post-lesión, donde la microglía activada y los macrófagos sanguíneos extravasados constituyen la mayoría de células inflamatorias presentes en el sitio de lesión (24), participando importantemente en los procesos desarrollados después de la lesión liberando citocinas, quimiocinas, neurotoxinas (25,26), diferenciándose en una célula reactiva o fagocítica capaz de funcionar como células presentadoras de antígenos y de secretar factores de crecimiento e intermediarios reactivos del oxígeno (ROI) y de nitrógeno (RNI) como el óxido nítrico (NO), afectando la expresión de una gran diversidad de genes como las proteincinasas, factores de crecimiento y revascularización, entre otros, todos ellos, involucrados en la reparación del tejido lesionado (27).

A pesar de que se confieren efectos benéficos a la respuesta inflamatoria, después de una LTME, esta respuesta puede ser la responsable de la necrosis del tejido lesionado y circundante (28-30), ya que juega un papel importante en la generación de ROI y NO, mismos que dañan en forma importante el tejido neural.

En modelos animales de ratón se han detectado niveles elevados de mRNA de TGF- $\beta$  en tejidos isquémicos entre 1 a 6 horas después del inicio del proceso, y permanecen elevados 15 días después de la isquemia. Esta expresión parece coincidir con la infiltración de monocitos y macrófagos y con la proliferación microglial en los tejidos dañados (31). Algunos estudios experimentales han tratado de dilucidar el efecto neuroprotector del TGF- $\beta$  en el infarto cerebral isquémico. La sobreexpresión de TGF- $\beta$  confiere una protección cerebral en modelos experimentales de infarto cerebral, también

se ha demostrado su efecto neuroprotector cuando se administra antes de la isquemia (32). Se ha propuesto que el TGF- $\beta$  puede ser neuroprotector como consecuencia de un bloqueo de la apoptosis o por su participación en la recuperación del infarto isquémico y está presente en la fase de recuperación de algunas enfermedades del SNC (33). Por otro lado, el TGF- $\beta$  controla la proliferación y la diferenciación celular en la mayoría de las células, además, modula la angiogénesis y la generación de nuevos vasos, facilitando procesos de neuroreparación, que incluyen fenómenos de neurogénesis y sinaptogénesis, los cuales se han descrito en la reorganización de la vascularización cerebral después de la isquemia (34).

Se han administrado directamente en el sitio de la lesión diferentes fármacos neuroprotectores para disminuir el daño del tejido neural (glucocorticoides, metilprednisolona, NG-nitro-L-arginina metilester (inhibidor de la sintasa de NO) entre otros, o fármacos antagonistas (MK-801, 2,3-dihidroxy-6-nitro-7-sulfamoilbenzo-quinoxalina), sin embargo, estos también pueden tener efectos negativos.

A la fecha ninguno de los fármacos ni de las estrategias mencionadas ha logrado dar resultados clínicos satisfactorios, por lo que la investigación continúa para encontrar una mejor terapia neuroprotectora.

## **B) Modelos *in vitro***

Como modelos *in vitro* se realizaron cultivos celulares de fagocitos mononucleares obtenidos de donadores sanos y de líneas celulares U-937 (premonocítica) y MRC-5 (fibroblastos pulmonares humanos), que fueron agrupadas como células tratadas con FILM, PMA (phorbol 12-miristate 13-acetate), FILM+PMA o sin tratamiento.

## **AMIBIASIS**

*E. histolytica* es un protozoo con capacidad fagocítica, citolítica y proteolítica. Fue descubierto en 1875 por el médico Fedor A Lõsh en úlceras del colon de un paciente con disentería. Las principales manifestaciones clínicas de la infección amibiana son la colitis y el absceso hepático.

En la mayoría de los individuos infectados, *E. histolytica* vive como comensal y solamente en un pequeño porcentaje de éstos, el parásito causa enfermedad al invadir la mucosa del colon, esta invasión provoca una colitis inflamatoria, la cual puede determinar la diseminación del parásito al hígado y producir 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 (35).

### **Reacción inflamatoria en la amibiasis**

La reacción inflamatoria que acompaña a la amibiasis invasora por *E. histolytica* es atípica en varios aspectos (2). 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. La escasa reacción inflamatoria tardía, 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.

El AHA por lo general consiste de áreas masivas de necrosis compuestas de material granular eosinofílico y necrótico con restos nucleares, pocos leucocitos, pocas amibas o ninguno de éstos últimos (36). Histológicamente, la formación de AHA después de la inoculación intraportal de amibas virulentas en el hámster incluye tres etapas: reacción inflamatoria aguda, formación de granuloma y necrosis progresiva. La destrucción de las células no resulta del contacto directo con los trozofóitos amibianos, sino que está mediada por la lisis de los leucocitos PMN neutrófilos (PMNn) que liberan productos citotóxicos dañando a los hepatocitos (37).

### **Amibiasis y el factor inhibidor de la locomoción de monocitos (FILM)**

En el absceso hepático amibiano llama la atención la escasez de elementos inflamatorios en los estadios avanzados (2). Para explicar este fenómeno se propusieron fundamentalmente dos hipótesis, que no son excluyentes: la "citofítica" y la "antimigratoria". Según la primera, la amiba destruiría los leucocitos conforme éstos fueran arribando al tejido infectado (38). 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 (2). La falta de estos elementos inflamatorios tardíos pueden, a su vez, estar relacionados con la ausencia de tejido cicatricial y en consecuencia con la perfecta regeneración del parénquima hepático. En relación con esta segunda hipótesis, Kretschmer y col., (3) demostraron que en el sobrenadante de cultivos axénicos de *E. histolytica*, pero no en el sobrenadante de cultivos de *E. dispar* (39), se encuentra un factor capaz de inhibir *in vitro* la locomoción (aleatoria, quimioquinesis y quimiotaxis) de los monocitos humanos (FM), y no la de los PMN humanos (Figura 1).

### **Efectos biológicos del FILM**

La notoria escasez de reacción inflamatoria tardía en las lesiones avanzadas de la amibiasis invasora causada por *E. histolytica* fue descrita por Councilman y Lafleur (1). Igualmente sorprendente, y quizá relacionada con esta escasa inflamación tardía, es la regeneración perfecta, sin cicatrización de los órganos afectados (hígado, piel etc.), que se observa en los pacientes después de un tratamiento médico exitoso (2). Por otra parte, debe señalarse que se observa una intensa reacción inflamatoria temprana (aguda) que incluye además de PMNn, algunos eosinófilos en contacto directo con el parásito invasor (37). Se desconoce la causa de este atípico progreso de la reacción inflamatoria en la amibiasis.

*E. histolytica*, pero no así, *E. dispar* (39) produce un pentapéptido (FILM: Met-Gln-Cis-Asn-Ser), anti-inflamatorio que inhibe *in vitro* la locomoción (aleatoria, quimocinesis y quimiotaxis) de FM, pero no la de PMNn y eosinófilos, (de aquí su nombre) (3,4). El FILM también inhibe la producción de reactivos intermediarios de oxígeno (ROI:  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $OH^*$ ) y la producción de óxido nítrico (RNI: NO) en FM y PMNn (40), sin afectar a los eosinófilos (41). *In vivo* el FILM retarda el arribo de leucocitos mononucleares en ventanas de Rebeck aplicadas a la piel de voluntarios humanos sanos e inhibe la hipersensibilidad retardada cutánea por contacto al 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB) en cobayos (42), abatiendo la expresión de la integrina VL-4 en FM y su ligando endotelial VCAM-1 en células endoteliales y queratinocitos reactivos en cobayos. Estudios en proceso sugieren que el FILM es capaz de reducir y / o retrasar la cicatrización, fenómeno que sigue a la inflamación, mediante señales originadas en parte por los monocitos tanto en la piel del cobayo como en modelos peritoneales en jerbos (43).

El FILM inhibe la expresión inducida por PMA de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , I-309 y su receptor CCR-1, NOS-2 sin afectar su expresión *constitutiva* (44), y modula

la expresión de otros genes relacionados con la inflamación, por ejemplo IL-1 e IL-10 (45,46).

En estudios realizados con colágena marcada ( $C^{14}$ ) (47), se observó que la colagenasa amibiana (trofozoítos de más de 42 h de cultivo) favorece la invasión del parásito y digiere (en un lapso de 24 h) más a la colágena tipo I que a la III (en una cicatrización normal primero se estimula la producción de colágena III y para su etapa final la de tipo I), lo que podría contribuir a disminuir la formación de una cicatriz.

La amiba durante su trayecto inicial invasivo libera factores que destruyen tejidos y producen inflamación. Simultáneamente otros factores del parásito disminuyen esta respuesta inflamatoria, lo que conlleva a la ausencia de cicatriz cuando el proceso se cura con el tratamiento anti-amibiano.

Un péptido sintético con la misma secuencia del FILM y un análogo que difería en el aminoácido de la posición dos reprodujeron el efecto biológico del FILM nativo (FILMn), por otro lado, un pentapéptido con los mismos aminoácidos pero en diferente posición (Gln-Cis-Met-Ser-Asn) (“*scrambled*”) carece de los efectos biológicos mencionados (4).

Con lo mencionado anteriormente podemos indicar que la respuesta inflamatoria/cicatricial es multifactorial por excelencia, tanto genética como bioquímicamente y con los efectos que se conocen del FILM en este fenómeno, a continuación podemos citar los modelos *in vitro* e *in vivo* donde este ha sido empleado.

Por todo lo anterior resulta de interés conocer los efectos del FILM sobre los procesos de inflamación tardía y cicatrización en modelos animales *in vivo* así como la determinación de la expresión del TGF- $\beta$  *in vivo* e *in vitro* por ser una molécula clave entre ambas etapas de la curación de heridas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Síntesis de los métodos utilizados**

Los estudios del FILM, que aquí se presentan, son parte de la secuencia de los estudios sobre este factor publicados en revistas internacionales indexadas. El interés se ha ido desplazando de la caracterización y determinación de su acción sobre los monocitos y por extensión sobre la inflamación crónica *in vivo*, hacia la cicatrización y el control genético de ambas.

También ha pasado de querer identificar su papel biológico en la interacción humano amiba, y la posibilidad de obtener una vacuna, hacia la posibilidad de utilizarlo como un fármaco útil para la humanidad, como modulador de inflamación o cicatrización, tanto en general (hipersensibilidad por contacto, cicatrización cutánea) como en situaciones más específicas, entre las que están la inflamación y cicatrización excesivas o inoportunas en cavidades corporales (adherencias peritoneales, síndrome pospericardiotomía) y lesiones traumáticas en sistema nervioso, donde la inflamación podría dificultar la regeneración ideal (lesión traumática de médula espinal).

### **Factor inhibidor de la locomoción de los monocitos (FILM)**

El factor fue originalmente obtenido por ultrafiltración en la fracción menor de 10, 000 Daltons de los sobrenadantes de cultivos axénicos de *E. histolytica* HM-1 IMSS. Una vez identificado y verificadas la equivalencia de sus efectos se ha remplazado por el factor sintético y probado en dosis de 0.001 a 1000 µg/ml con efectos óptimos entre 1 y 200 µg/ml según el modelo empleado.

El FILM (Met-Gln-Cis-Asn-Ser) con pureza de 96% se obtuvo de American Peptide Co., Sunnyvale, CA, USA. El péptido se disolvió a una concentración de 2 µg/ml en amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.4. Todas las

soluciones de trabajo se probaron para endotoxina (LPS <0.3 pg) usando el ensayo de *Limulus* (Amoebocyte Lysate Endosafe KTA Charles River Endosafe INC, Charleston, SC, USA) y se guardó a -70°C hasta su uso.

### **Vías de administración**

Variaron según los experimentos específicos, subcutánea para la inhibición de la hipersensibilidad por contacto, cutánea para modulación de cicatrización en piel. Intraperitoneal, en solución o emulsión con adyuvante de Freund. Intracardiaca para la regulación de la cicatrización pericardio y para LTME el factor se aplicó directamente sobre el sitio de la lesión producida por el impactador.

### **Especies Utilizadas**

Se eligieron inicialmente al cobayo por ser susceptible a la amibiasis y el modelo ideal y clásico para evaluar hipersensibilidad cutánea por contacto y el jerbo por su susceptibilidad a la amibiasis y la posibilidad de inmunizarlo. Y posteriormente se fueron ampliando los estudios. En esencia inflamación *in vivo* se estudio en cobayos y jerbos (y sin resultados adecuados en ratón y rata). Cicatrización cutánea en cobayo, cicatrización peritoneal en jerbo, cobayo y rata. Los modelos en corazón y sistema nervioso se realizaron en rata.

### **Modelos inflamatorios en animales: hipersensibilidad por contacto**

En estos estudios el procedimiento fundamental fue la sensibilización de los animales con dinitroclorobenceno (DNCB) por contacto epicutáneo y su reto quince días después con dosis de reto menores de DNCB (cuatro zonas en cobayos y dos en jerbos), bajo las cuales se aplicó una inyección subcutánea de 0.05 ml de FILM natural o sintético, sus posibles análogos y diversos testigos. Las lecturas se realizaron a las 24 y 48 horas del reto.

### **Modelos para cicatrización en animales**

Al estudiar cicatrización surge inmediatamente la imagen de una herida quirúrgica, limpia, poco traumática, cuidada y con ayuda para favorecer el cierre progresivo de esa solución de continuidad. Pero existe también otra secuencia de cicatrización muy distinta. Esta es la que se da por una irritación química o física prolongadas y que a través de un proceso inflamatorio intenso activan un proceso cicatricial, que a pesar de ser fisiológico, es también generalmente inoportuno y de resultados excesivos y ectópicos. Son buenos ejemplos las adherencias peritoneales secundarias a peritonitis. La cicatrización puede activarse desde dos orígenes extremos. Por un corte o por un golpe o irritación química.

### **Modelo en piel. Resolución de heridas quirúrgicas**

En piel se estudio, en cobayos, el efecto del FILM ante dos modelos que reproducen situaciones que ocurren normalmente en cirugía. Una herida quirúrgica lineal de 20 mm, y una biopsia en sacabocado circular. Con aplicación o no de FILM al momento del acto, realizado con las medidas de cuidados pertinentes y seguidos por 18 días, hasta más allá de su curación completa.

### **Modelos en cavidades corporales. Adherencias peritoneales**

Otro tipo de cicatrización observado con alta frecuencia es la formación de adherencias peritoneales secundarias tanto a intervenciones quirúrgicas como a procesos irritativos infecciosos o de origen químico. Herida "química", modelo en peritoneo. Para estudiar el efecto del FILM sobre este tipo de cicatrización se partió de un modelo desarrollado para un estudio previo del FILM. Dicho estudio buscaba inducir inmunidad en jerbos contra el FILM. Como este es un pentapéptido y posiblemente se comportara como un hapteno, se inició con un esquema clásico de inmunización apoyada por

adyuvante de Freund (AF) en tres dosis intraperitoneales cada 7 días y concluyendo con el reto por inoculación intraportal de 100 000 trofozoitos de amibas siete días después. El estudio de inmunización posteriormente derivó a un esquema de antígeno polimerizado, sin adyuvantes. Sin embargo el modelo de FILM + adyuvante y sus indispensables controles de FILM y Adyuvante por separado, generaron observaciones inesperadas:

Por una parte, la capacidad de estimular la inmunidad del adyuvante, parecía ser a través de la inducción de una peritonitis química persistente, inductora de respuestas inflamatorias y cicatriciales masivas, presentes aún ocho semanas después. Ante una reacción tan fuerte no resultó sorprendente que el AF solo produjese inespecíficamente una protección del 100% al reto con amibas. Mientras que además constituyó el grupo con mayor mortalidad “espontánea”.

En este entorno, llamó la atención que el grupo con AF y FILM, (que también tuvo una protección al 100% contra el reto amibiano) presentaba una respuesta inflamatoria-cicatricial, pero mucho más leve, que el grupo con AF solo.

Con pequeños ajustes este modelo en jerbo fue adaptado como un modelo de inhibición de la cicatrización y adherencias intraperitoneales. Utilizando al adyuvante como irritante químico y ensayando al FILM como inhibidor de la reacción. A partir de este modelo los estudios variaron las dosis, los esquemas de sensibilización y se amplió el estudio a cobayos y luego a ratas. Destinado a un análisis esencialmente morfológico, el modelo también permitió realizar análisis bioquímicos, con TGF- $\beta$ , como se detalla más adelante.

## **Modelos especiales en corazón y sistema nervioso**

Dos condiciones donde la cicatrización excesiva puede producir más daño que beneficio se encuentran en corazón y sistema nervioso. En el primero, la simple apertura del pericardio origina una intensísima reacción inflamatoria y cicatricial que compromete la recuperación de los pacientes humanos y generalmente ocasiona adherencias tan resistentes que son un grave problema en situaciones de cirugía cardiaca que requiere dos o más tiempos. La inflamación en el sistema nervioso es también muy compleja pero hay situaciones que son tanto muy frecuentes como de características bien definidas. La lesión traumática de médula espinal, termina muchas veces en parálisis de los segmentos distales al nivel de la lesión, en humanos (por ejemplo accidentes en automóvil) y en otros mamíferos. La capacidad de regeneración del sistema nervioso, limitada pero presente parece ser obstaculizada por el proceso inflamatorio primero y cicatricial después que ocurren en el lugar donde las fibras nerviosas deberían poder reconectarse.

### **Modelo de inhibición de la cicatrización en pericardio de ratas**

Se utilizó el modelo de inducción de adherencias pericárdicas por pericardiotomía. Este modelo fue diseñado originalmente para inducir adherencias pericárdicas en la esperanza de que la neoformación vascular en la cicatriz pudiera mejorar la circulación en zonas isquémicas del corazón. El modelo no funcionó para ese propósito pero proporcionó un sistema para ensayar técnicas para inhibir la formación de adherencias pericárdicas. El modelo consiste esencialmente en operar a la rata, abrir el pericardio, pasar tres veces una lija suave en el ápex del corazón, agregar o no las sustancias en estudio. Cerrar la cavidad y la pared torácica, mantener al animal en las mejores condiciones y sacrificarlo al décimo día. En este momento la herida ya ha cicatrizado correctamente pero la cavidad pericárdica presenta una intensa reacción que incluye adherencias extensas e intensas. El FILM se aplicó a dosis de 50 µg/ml en un volumen total de 0.1ml en una dosis única al

momento de la operación. Se tomaron fotos de la cavidad pericárdica, las cuales fueron evaluadas en forma ciega por cuatro investigadores independientes.

### **Animales con adyuvante de Freund**

Se utilizaron 24 animales, se alimentaron con tabletas de Purina y agua estéril *ad libitum*. Se hicieron cuatro grupos con 6 animales cada uno, y se inocularon por vía intraperitoneal para incrementar los niveles de TGF- $\beta$  de acuerdo al siguiente esquema:

Grupo A: Ratas con PBS (control negativo).

Grupo B: Ratas con AF (control positivo).

Experimentales:

Grupo A: Ratas con FILM

Grupo B: Ratas con AF + FILM

### **Inmunización**

Se inoculó adyuvante completo de Freund al día “cero” (AFc), seguido de adyuvante incompleto de Freund los días siete y catorce (AFi). Con o sin dosis de FILM (50  $\mu$ g), en las tres ocasiones.

Los animales se mantuvieron por ocho semanas, después de las cuales se obtuvo sangre por punción intracardiaca, las ratas se anestesiaron con una inyección intramuscular de ketamina (60 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). Posteriormente se sacrificaron por sobredosis de los mismos anestésicos (48,49). Al comprobar su muerte se hizo la disección para evaluar: hemorragia, inflamación peritoneal y cicatrización así como presencia de bridas, adherencias y vasos de neoformación.

Las muestras de sangre tomadas a los animales se centrifugaron a 1500 rpm por 15 min y los sueros se almacenaron en tubos Eppendorf a  $-70^{\circ}\text{C}$  para la determinación de TGF- $\beta$ .

### **Modelo *in vivo* del efecto del FILM en LTME**

Los animales se anestesiaron con una inyección intramuscular de ketamina (60 mg/kg) y xilazina (10 mg/Kg). Treinta minutos después, y previa asepsia de la región torácico-lumbar, se hicieron dos cortes longitudinales y se realizó una laminectomía a nivel de la 9<sup>a</sup> vértebra torácica hasta exponer la médula espinal. La LTME se hizo mediante una contusión. Para la contusión, se dejó caer un cilindro de 10 g de una altura de 25 mm (lesión moderada) sobre el sitio expuesto, utilizando el impactador (Universidad de Nueva York NYU, USA), que produce una lesión por contusión en la médula espinal bien calibrada (50). Inmediatamente después y, en el sitio de la lesión se depositaron 50  $\mu\text{l}$  de la solución de FILM. Los animales se suturaron, primero el músculo con hilo Dexon (ETHICON, Brasil) absorbible, y después la piel con hilo de nylon. Los animales sin LTME se evaluaron al día siguiente, colocándolos en una superficie para observar el movimiento de sus extremidades y verificar que la laminectomía se realizó en forma adecuada.

### **Grupo experimental: determinación de concentración y expresión de TGF- $\beta$**

Se realizó un experimento de 27 ratas, 9 para cada grupo.

Grupo A: Ratas sin lesión y sin tratamiento

Grupo B: Ratas con LTME + administración de PBS

Grupo C: Ratas con LTME + administración de FILM

Los animales se sacrificaron a las 3 hrs, 7 y 10 días, se obtuvo el suero para determinar el TGF- $\beta$  por el método de ELISA y la médula espinal para determinar la expresión del mRNA mediante PCR tiempo real.

### **Cuidado de los animales con lesión**

Los animales con LTME se colocaron sobre camas con aserrín y agua filtrada, se cambió diariamente hasta el término del estudio. La vejiga fue evacuada con ayuda de un masaje en el abdomen, dos veces al día (mañana y tarde), hasta que se logró la función normal de la micción. Todos los animales se revisaron cuidadosamente para evitar infección en el tracto urinario u otro signo de enfermedad sistémica, durante los primeros diez días y también cuando se presentó hematuria, después de este periodo, recibieron tratamiento con enrofloxacin 64 mg/Kg/día en el agua (PARFARM, México).

### **Determinación de TGF- $\beta$ por la técnica de ELISA en suero de ratas sometidas a LTME**

El TGF- $\beta$  se cuantificó en el suero obtenido de los animales con lesión y tratados con FILM o PBS, los valores se compararon con los obtenidos de un grupo control de animales sin lesión y sin tratamiento.

Para la determinación del TGF- $\beta$  se empleó el método de ensayo enzimático inmunoabsorbente (ELISA). Se utilizó un equipo comercial, y se siguieron los protocolos sugeridos por el fabricante (Biosource International, Inc. Camarillo California, USA).

### **Determinación de la expresión de TGF- $\beta$ por la técnica de PCR tiempo real en médula espinal de ratas sometidas a LTME**

#### **Obtención de la médula espinal**

A las 3hrs, 7 y 10 días posteriores a la lesión, se anestesió a cada animal via intramuscular con ketamina (60 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg), se colocó en posición dorsal, se realizó un corte en la piel y se expuso el área de contusión. Se cortó el músculo a los lados del sitio de la lesión y las apófisis

espinosas de las vértebras, se expuso mediante laminectomía 1cm de la medula espinal (0.5 cm caudal y 0.5 cm craneal del sitio de lesión) y se retiró con cuidado del canal vertebral y el tejido se colocó en 1 ml de Trizol (Invitrogen, USA).

### **Extracción de mRNA total**

Las médulas obtenidas y mantenidas en trizol se homogenizaron por 10 s a mediana velocidad (PRO 200, Bio-Gen Series, PROScientific. Oxford, CT, USA) y se agregó 220 µl de cloroformo (SIGMA, CA, USA) a cada uno de los tubos, se homogenizo por vortex y se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 min a 4°C, se obtuvo el sobrenadante, se agregó 500 µl de isopropanol (SIGMA, CA, USA) y se dejó reposar a -20°C de 30 a 60 min, se centrifugó a 10000 rpm por 15 min a 4°C. Se eliminó el isopropanol y se adicionó 1 ml de etanol al 80%, las muestras se centrifugaron a 6000 rpm por 5 min a 4°C, se eliminó el alcohol y se calentaron a 45°C por 3 min. Se dejaron a temperatura ambiente por 10 min, se adicionaron de 20 a 50 µl de agua inyectable a 45°C, se homogenizó el mRNA total. Se determinó su concentración y pureza a 260/280 nm en un espectrofotómetro (Nanodro 2000c, Thermo Scientific; Wilmington, DE, USA) y se visualizó su integridad mediante un gel de agarosa al 1.8%.

### **Síntesis de cDNA**

A 2 µg del mRNA total se agregaron 1 µl de Oligo dT, 1 µl de dNTP's 10 mM y agua a un volumen final de 13 µl. La mezcla se calentó a 65 °C por 5 min. Posteriormente se agregaron 4 µl de Buffer de reacción 5X, 1 µl de DTT 0.1 M, 1 µl de RNAsa OUT Recombinant RNAsa Inhibidor y 1 µl de Enzima Super Script (Invitrogen, USA), se mezcló y se incubo a 25 °C por 5 min, posteriormente a 50 °C por una h y se inactivo a 70 °C por 15 min, a la

mezcla se le agregó 1 µl de RNasa H y se incubó a 37 °C por 20 min, finalmente se almacenó a 4 °C hasta su uso.

### PCR Tiempo Real (PCR- TR)

La expresión semicuantitativa del gen de TGF-β se realizó por duplicado mediante PCR-TR (LightCycler FastStart® DNA Master PLUS SYBR Green 1 (Roche, Applied Science, Mannheim, Germany) en un volumen de 10 µl. Para determinar la expresión semicuantitativa de TGF-β, se utilizó como gen constitutivo la hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HPRT). Cada gen se amplificó mezclando 2.5 µl del cDNA sintetizado anteriormente, 0.5 µl de cada uno de los primers específicos (izquierdo/derecho); tamaño del amplicón y la entrada al Genbank fueron:

TGF-β: CCCAACCCAGCTCCAAGCG / CAGCCACTCTGCGGTGCCTC / 132pb / NM\_013174.1;

HPRT: AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA / CAAAGCCTAAAAGACAGCGG / 192pb / NM\_012583.2

2 µl de la mezcla de reacción y 4.5 µl de agua, esta reacción se colocó en el equipo de PCR Tiempo Real (LightCycler 2.0, Roche, Applied Science, Mannheim, Germany) bajo las siguiente condiciones.

| Paso          | Ciclos                 | Condiciones |
|---------------|------------------------|-------------|
| Preincubación | 1                      | 95°C 10 min |
| Amplificación | 45                     | 95°C 10 s   |
|               | Cuantificación         | 60°C 10 s   |
|               |                        | 72°C 7 s    |
| Disociación   | 1 Curva de disociación | 95°C 0      |
|               |                        | 65°C 1 min  |
|               |                        | 95°C 0      |
| Enfriamiento  | 1 Enfriamiento         | 40°C 30 s   |

## **Método estadístico para el análisis de resultados de la determinación de la concentración de TGF-β por ELISA y la expresión del gen por PCR-TR**

Se realizó un análisis estadístico de todos los grupos y se verificó la distribución de los datos bajo la curva de normalidad. Se aplicó la prueba estadística paramétrica de análisis de varianza si los datos mostraron una distribución normal o bien, la no paramétrica de Kruskal-Wallis si los datos no mostraron una distribución normal en aquellos experimentos con más de dos grupos, y se usó la U de Mann-Whitney cuando solo hubo dos grupos.

El análisis para la expresión del gen se llevó a cabo mediante la identificación de los productos de PCR-TR, que se confirmó mediante las curvas de disociación. Las concentraciones relativas se calcularon por el método de Ct [doble derivada) (número de ciclos en el que se inicia la amplificación exponencial del templado)] obteniendo un promedio de los valores de cada muestra, así como un promedio de los genes seleccionados el cual se comparó con la expresión del gen constitutivo HPRT utilizado, asignando un valor de 1 para normalizar la expresión bajo el siguiente esquema donde Delta 1 (D1) es la razón de la expresión del gen problema sobre el gen constitutivo de los grupos experimentales sin tratar o tratados y delta 2 (D2) es la relación de D1 de los grupos tratados sobre D1 de los grupos no tratados, aplicando la siguiente fórmula tenemos.

$$\% \text{de expresión} = \frac{\text{Cp del gen problema (con FILM) / Cp gen constitutivo (con FILM)}}{\text{Cp del gen problema (sin tratar) / Cp gen constitutivo (sin tratar)}}$$

## **MODELO *in vitro* DEL EFECTO DEL FILM**

### **Cultivo celular: FM**

Las células se obtuvieron a partir de muestras de 15 ml de sangre heparinizada de adultos sanos en ayuno, y no fumadores. Las células mononucleares se aislaron con un gradiente de Ficoll Hypaque® ( $\delta = 1.077$ ) (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway) por el método de Böyum (51). Brevemente: Sobre 3 ml de la solución de Ficoll Hypaque se colocaron 10 ml de sangre diluida 1:1 en solución salina de fosfatos (SSF). Se centrifugaron a 400 x g por 40 min a 20°C, al cabo de los cuales las células de la interfase se recogieron y se lavaron 3 veces con SSF. El conteo y la viabilidad de las células obtenidas se realizó en cámaras de Boyden utilizando el colorante de azul tripano: Los FM obtenidos se usaron para los ensayos *in vitro*.

### **Cultivos y estimulación de células: Líneas celulares U-937 y MRC-5**

Las líneas celulares premonocítica U-937 (American Type Culture Collection, ATCC, No. CRL-1593.2) y de fibroblastos MRC-5 (American Type Culture Collection, ATCC No. CCL-171) se propagaron en botellas de 25 cm<sup>2</sup> de poliestireno con RPMI-1640 o medio mínimo esencial de Eagle (MME) libres de endotoxinas (In Vitro, Life Technologies, Eggenstein, Germany) respectivamente, suplementados con: L-glutamina 2mM, bicarbonato de sodio 1.5 g/L, glucosa 4.5 g/L, HEPES 10mM, piruvato de sodio 1.0 mM, y suero fetal bovino al 10% libre de endotoxinas (FBS, Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY). Las células se mantuvieron a 37°C / 5% CO<sub>2</sub>.

### **Diseño experimental**

Diseño experimental para los tres tipos celulares (FM, U-937 y MRC-5):

- a) Sin tratamiento [medio RPMI o MME (constitutivo)]
- b) Tratadas con PMA (inducido)
- c) Tratadas con FILM
- d) Tratadas con PMA+FILM

Se cultivaron  $1 \times 10^6$  de cada uno de los tipos celulares en 2 ml de RPMI-1640 ó MME en placas de 24 pozos, las células se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 hr / 5% de  $\text{CO}_2$  con FILM ( $50\mu\text{g}/10^6$  células), con PMA ( $10\text{ng}/10^6$  de células), con PMA + FILM, o sin ningún estímulo (RPMI-1640 ó MME solos).

### **TGF- $\beta$**

El TGF- $\beta$  se cuantificó en los sobrenadantes de los FM, células U-937 y MRC-5 estimuladas con el FILM, PMA, PMA + FILM o sin estímulo.

Para la determinación del TGF- $\beta$  se empleó el método de ensayo enzimático inmunoabsorbente (ELISA). Se utilizó un equipo comercial, y se siguieron los protocolos sugeridos por el fabricante (Biosource International, Inc. Camarillo California, USA).

### **Análisis Estadístico**

Además de las determinaciones de estadística descriptiva, se emplearon las pruebas para comparación de grupos, según el estudio en particular y la naturaleza de las variables consideradas. Incluyendo estadística no paramétrica como Xi cuadrada y prueba de Fischer. También pruebas de estadística paramétrica incluyendo las pruebas “T” de Student y “U” de Mann-Whitney. En todos los casos se eligió para el análisis,  $p < 0.05$  como nivel de significancia.

### **Consideraciones éticas**

Para realizar el proyecto se siguieron las normas institucionales de la ley de salud, de la declaración de Helsinki y otras aplicables. Se tomó una muestra de sangre venosa a personas que previamente leyeron y firmaron la carta de consentimiento informado, misma que fue autorizada por el comité de ética. Además, se tomaron en cuenta los lineamientos establecidos por el reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la

Salud (Título séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación) y la Norma Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (48,49). Los estudios forman parte de proyectos de investigación, revisados y aprobados, sea por el Comité Local de Investigación del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, y/o por la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS.

## **RESULTADOS**

### **Modelo de hipersensibilidad por contacto al DNCB en cobayos y jerbos**

Los estudios de inflamación *in vivo* en cobayos, mostraron un efecto inhibitor del FILM sobre la respuesta de hipersensibilidad cutánea por contacto al DNCB, presente a las 48 horas. La inhibición fue producida tanto por el FILM natural como por el sintético y estuvo ausente en pentapéptidos no relacionados (“*scrambled*”).

En jerbos se encontró el mismo fenómeno, aunque la respuesta positiva es menos intensa y aparente en esta especie. Rata y ratón generaron respuestas de hipersensibilidad positivas esporádicas y débiles, insuficientemente objetivas para permitir la evaluación del efecto inhibitor.

### **Modelo de cicatrización cutánea en cobayos**

El efecto del FILM en las dos variantes de este sistema puede resumirse en un retraso de un día en el proceso normal de cicatrización comparado con las regiones testigo contralaterales en los mismos animales. Las incisiones longitudinales cuyos bordes quedaron yuxtapuestos ya habían iniciado su fusión a las 24 horas (48 en el grupo con FILM). Las biopsias en sacabocado, circulares se contrajeron en forma lenticular (48 horas FILM y 24 horas en el testigo) y fueron reduciendo sus dimensiones en pocos días.

A las dos semanas todas las incisiones habían cerrado completamente, tenían las mismas características, no hubo reapertura de heridas ni tampoco evidencias de infección local o sistémica en los animales. El retraso de 24 horas en la contracción de la herida por la biopsia en sacabocado en presencia de FILM sugiere un posible efecto de este sobre los miofibroblastos, un subtipo particular de fibroblastos.

### **Modelo de inhibición de adherencias intraperitoneales, en jerbos, cobayos y ratas**

La inyección intraperitoneal de AF originó una intensa reacción inflamatoria cicatricial que macroscópicamente se manifestó como la presencia de un material amarillento, grueso, adherente, tanto libre en cavidad peritoneal como incluido en la pared abdominal por debajo de un epitelio neoformado. Estas placas podían formar puentes entre asas intestinales, entre si y con otras estructuras. También podían estar presentes bajo la cápsula hepática y formando engrosamientos en el diafragma. La evolución de este proceso se detectó tanto en sacrificios tempranos, 4 ó 10 días, como tardíos 4 u 8 semanas. La coadministración del FILM junto con el AF redujo sin eliminar completamente, la intensidad de esta reacción en los grupos estudiados (Figuras 2, 3).

### **Modelo de inhibición de adherencias pericárdicas en ratas**

Al sacrificar al día 10 a las ratas del grupo testigo positivo, (cirugía y triple toque en el ápex cardíaco) su cavidad pericárdica mostraba estar reducida por la presencia de grandes masas de un material amarillento, grueso, denso y adherente que formaba adherencias variables, en posición y firmeza que podían envolver completamente al corazón. Posterior a la recuperación de la anestesia, las ratas tuvieron una conducta normal. En el grupo experimental con FILM, la imagen cambió por la desaparición de esas gruesas

adherencias, la desaparición de los puntos de adherencia y de las masas gruesas y densas de tejido inflamatorio, aunque sin embargo se presentó una serie de membranas libres, delgadas y transparentes de características semejantes a capas de pericardio (Figura 4).

### **Determinación de TGF- $\beta$ en suero de animales con LTME**

Debido a la participación del TGF- $\beta$  con la remodelación celular se determinó la concentración del mismo en animales con LTME moderada. La figura 5 muestra la concentración de TGF- $\beta$  en el suero de animales tratados con FILM y en animales controles tratados sólo con PBS, a las 3 horas, 7 y 10 días posteriores a la LTME. El análisis estadístico mostró una diferencia significativa entre ambos grupos, en todos los tiempos estudiados. La concentración de TGF- $\beta$  fue mayor a los 10 días en ambos grupos (Figura 5).

### **Determinación de la expresión de TGF- $\beta$**

En la figura 6 podemos observar la expresión relativa de TGF-  $\beta$ , en los animales tratados con FILM hubo una diferencia  $p < 0.01$  a las 3 h y  $p < 0.05$  a los 7 y 10 días cuando se compararon con el grupo de PBS y con el grupo basal (laminectomía, sin lesión y sin tratamiento) (Figura 6).

### **TGF- $\beta$ en sobrenadantes de células**

Las células U-937 y los FM tuvieron una producción semejante de TGF- $\beta$  en todos los grupos experimentales. El FILM indujo un pequeño aumento en la producción de TGF- $\beta$ , sin que este fuera significativo.

Cuando los fibroblastos MRC-5 se cultivaron en medio MME sin estímulo sintetizaron  $266 \pm 19.2$  pg/ml de TGF- $\beta$ . Al ser estimulados con FILM produjeron  $286 \pm 17.2$  pg/ml. Al estimular las células con PMA la producción de TGF- $\beta$  aumentó ( $324 \pm 20.3$  pg/ml), y al agregarles simultáneamente PMA

y FILM, se obtuvieron  $284 \pm 19.6$  pg/ml de TGF- $\beta$ , cantidad similar a la producida solamente con el FILM.

La concentración del TGF- $\beta$  producida por las células MRC-5 fue significativa cuando se comparó con la producción de las otras dos líneas celulares, pero no lo fue cuando se hicieron comparaciones entre los diferentes grupos.

### **Determinación de TGF- $\beta$ en suero de animales inmunizados con adyuvante**

En la tabla puede observarse el valor basal de TGF- $\beta$  que corresponde al grupo control 7298 pg/ml el cual se eleva a 8989 pg/ml en el grupo con AF; con el FILM se alcanzaron valores de 13710 pg/ml y de 12666 pg/ml cuando se agregó además de FILM, el AF. El incremento en el TGF- $\beta$  en los grupos inoculados con FILM y con AF+FILM fueron significativos al compararse con el grupo control (Tabla 1).

### **Estudio Macroscópico**

Los datos macroscópicos obtenidos a las ocho semanas coinciden con los resultados de producción de TGF- $\beta$ , en donde vemos que el grupo control no fue totalmente negativo, ya que las inyecciones con PBS, fueron capaces de inducir la producción de TGF- $\beta$  en suero y una ligera inflamación peritoneal. En el grupo con AF se puede observar una intensa inflamación, vasodilatación, peritoneo hemorrágico, nódulos y adherencias. En el grupo con FILM hay vasodilatación, inflamación menos intensa que, peritoneo discretamente hemático, fibras adherentes y formaciones neovasculares. En el grupo de AF + FILM se observó una reacción inflamatoria cicatricial con depósitos de material blanquecino, peritoneo cianótico, fibras adherentes, neoformación vascular e incluso circulación colateral, que en ocasiones formaron puentes. La reacción más intensa correspondió a los animales

inoculados con AF (Figura 7) y la menos intensa a los animales que solo se les inoculó FILM (Figura 8).

## **DISCUSIÓN**

Los resultados presentados en este estudio, junto con los producidos por investigaciones previas y en paralelo sobre el FILM señalan que este pentapéptido podría resultar relevante en dos vertientes. Por una parte en la comprensión de la interacción amiba-humano, su patología, manejo, curación y eventualmente su prevención. Por otro lado también es de interés su potencial como herramienta al servicio de la medicina o la ciencia. Ya que podría servir como instrumento para entender mejor procesos biológicos como la inflamación, la cicatrización y sus sistemas de regulación intra e intercelulares y genéticos.

Finalmente sus propiedades podrían aprovecharse como un potencial fármaco modulador de la inflamación y/o cicatrización, por ejemplo en casos de fibrosis y cirrosis hepáticas, adherencias posteriores a la cirugía o limitación del daño traumáticos en la médula espinal.

Sin embargo para esta visión integral se requiere un enfoque con aproximaciones desde panorámicas hasta estudios muy especializados, celulares, moleculares y genéticos, Estos estudios involucran la necesidad de combinar investigaciones a distintos niveles. Tanto en animales experimentales que, como organismos íntegros, permiten ver las respuestas integrales aunque no permitan juzgar el papel de cada célula o molécula particular. Como el trabajo en poblaciones celulares de sangre y o cultivos, que permiten apreciar los papeles y respuestas específicos de cada estirpe. Sin excluir las determinaciones de concentraciones moleculares en sangre o en sobrenadantes, ni el estudio de la expresión génica e incluso de

evaluación del comportamiento molecular a través de modelos computacionales.

### **Efectos del FILM en el enfoque integral *in vivo***

Esta es la aproximación más panorámica, en individuos completos, con toda la complejidad de las interacciones celulares inmunitarias o no y las cascadas moleculares asociadas a la inflamación.

Los estudios *in vivo* señalan, primero, que los efectos anti-inflamatorios del FILM son de un tipo y magnitud que permiten su expresión objetiva en los animales experimentales, en forma topográficamente circunscrita. Así la inhibición de la hipersensibilidad retardada cutánea por contacto al DNCB, en la que participan esencialmente los leucocitos agranulocíticos, monocitos y linfocitos, constituye evidencia *in vivo*, de que los efectos inhibidores del FILM documentados *in vitro*, sobre la locomoción, la fagocitosis y las funcionalidades citoesquelética y energética, son suficientes para alterar la evolución de la respuesta inflamatoria tardía como proceso integral *in vivo*. Los hallazgos son también consistentes con que un gradiente de FILM, como factor soluble liberado o desprendido de la amiba pueda ejercer un efecto inhibitor de los leucocitos inflamatorios que los mantenga a suficiente distancia para permitir el desarrollo de la amiba, sin provocar una inmunosupresión sistémica, y explicar así las características de la pobre inflamación tardía que se observa en la amibiasis invasora humana.

Los experimentos *in vivo* de cicatrización con el FILM muestran efectos de este.

Retrasan, sin impedir, la cicatrización cutánea en un modelo “limpio” poco estimulante de la inflamación y reducen, también sin impedir, la cicatrización en modelos inflamatorios muy intensos en las cavidades corporales. Sin que se observen datos de inhibición excesiva como serían infecciones o reapertura de las heridas.

Los hallazgos de las evaluaciones *in vivo* de la respuesta cicatricial apuntan a un efecto modulador de la cicatrización. Posiblemente un efecto adicional al efecto anti-inflamatorio. El “apagado de los leucocitos de la inflamación tardía” por el FILM permitiría asumir que al cortar las señales de transición inflamatorio cicatriciales, este segundo proceso no se llegara a iniciar. Pero este mecanismo solo no es suficiente para explicar el retraso de la cicatrización cutánea en un modelo de corte quirúrgico donde el estímulo inflamatorio es mínimo y donde la cicatrización se desarrolla hasta reparar la herida. El efecto del FILM, vía monocitos, tampoco explica muy bien el hecho de que la reducción de las adherencias y cicatrización peritoneal sean claramente detectables hasta a ocho semanas. Especialmente si asumimos que la vida media del FILM en el cuerpo debe ser corta por eliminación debido a su pequeño tamaño o degradación/inactivación debido a su naturaleza peptídica. Todo lo cual hace más factible que exista un segundo efecto del FILM sobre los fibroblastos, la colágena o las moléculas coordinadoras de la cicatrización. Los hechos de que la secuencia genética del pentapéptido aparezca en una molécula adaptadora del proceso de cicatrización y de que el FILM afecte la expresión de más genes en las células fibroblásticas MRC-5 que en las monocíticas U-937 también son consistentes con un efecto directo sobre la cicatrización. Este hipotético segundo efecto del FILM sobre la cicatrización también sería consistente con la observación de la curación del AHA donde la regeneración es prácticamente perfecta, sin cicatrización, a pesar de que, en el borde del absceso, aunque lejos de las amibas, se forma un anillo de infiltrado mononuclear que, en principio, debería inducir la encapsulación del absceso.

En conjunto los resultados *in vivo* y las observaciones de la patología humana sugieren que el FILM, más que un efecto “*de novo*”, lo que haga sea

modular las cascadas de señales propias del huésped a niveles intra y extracelulares. ¿Dónde? Eso es todavía un misterio, a nivel intracelular las vías de NF- $\kappa$ B y MAPK parecen ser fundamentales. A nivel extracelular, TGF- $\beta$  parece ser un buen candidato.

### **Efectos intracelulares moleculares y genéticos**

El FILM participa en una multiplicidad de efectos a distintos niveles del fenómeno inflamatorio, esto sugiere que su acción biológica es diversa y altera la expresión de señales pro y antiinflamatorias de las células que participan en el proceso.

El FILM induce la translocación del homodímero p50/p50, que abate la transcripción de genes inflamatorios en el sistema NF- $\kappa$ B, y regula la síntesis de IL-1 $\beta$  en las vías ERK, JNK, y NF- $\kappa$ B con mayor participación de la p38, por lo que se considera que el FILM actúa a través de estas vías de señalización (52).

Los fibroblastos participan en los procesos inflamatorio y cicatricial, intervienen en la respuesta inmune y secretan TGF- $\beta$ , GM-CSF, TNF, interferón  $\beta$ , y las interleucinas IL-1, IL-5, IL-6, IL-8, IL-11 (19) además de mediadores lipídicos.

El TGF- $\beta$  inhibe la degradación de la colágena, es quimiotáctico para los fibroblastos y los induce a sintetizar proteínas de la matriz extracelular incluyendo colágenas tipos I y III, fibronectina, vitronectina, tenascina y proteoglicanos (53).

Se ha demostrado que el FILM altera en fibroblastos de la línea celular MRC-5 diferentes grupos de genes, entre otros, factores de crecimiento, genes involucrados en angiogénesis, proliferación y diferenciación celular, síntesis y

degradación de matriz extracelular y del desarrollo de tejidos, todos ellos participan en las etapas finales del proceso de remodelación y cicatrización (54). Entre los genes que mostraron una disminución de expresión en células MRC-5 tratadas con FILM, y que pertenecen a la familia de TGF se encuentran BMP-RIA, BMP-7. Entre los que aumentaron su expresión están Activin B, Activin RIB y Activin RIA, los cuales también pertenecen a la familia TGF- $\beta$ . La mayor parte de los genes afectados en estas células participan en la vía de señalización NF- $\kappa$ B.

Los valores obtenidos de TGF- $\beta$  en las células MRC-5 (sólo con MME), muestran que la producción constitutiva de la citocina es superior a la encontrada en las otras líneas celulares estudiadas. El FILM y el PMA aumentaron su producción.

Las células de la línea celular U-937 y los monocitos de sangre periférica produjeron cantidades similares de TGF- $\beta$  en respuesta a la exposición con el FILM. Esta producción es mayor si se compara con la producción constitutiva de estas células (sólo con RPMI), lo que puede ayudar a que disminuya la inflamación y la secuela cicatricial en pacientes con absceso hepático amibiano tratados, ya que se ha demostrado que el aumento en los niveles de TGF- $\beta$  se asocia con el proceso reparativo normal y sólo cantidades muy elevadas y persistentemente producidas inducen fibrosis.

El efecto que tiene el FILM sobre la expresión de genes que participan en la síntesis/degradación de matriz extracelular, vasculogénesis y angiogénesis, sugiere que los fibroblastos experimentan una continua remodelación y tienen un papel importante durante la reparación (55,56), el FILM ejerce un equilibrio en estos procesos de proliferación/remodelación de los fibroblastos y quizás otros tipos celulares que participan en el proceso de cicatrización.

Otros estudios han mostrado la producción constitutiva de TGF- $\beta$  en algunas líneas celulares (RBL-2H3, MLA-144). Cuando estas líneas celulares se estimularon con PMA más ionóforo de calcio, solamente se liberó una pequeña cantidad adicional de TGF- $\beta$  (57).

Las vías que participan en la transcripción de TGF- $\beta$  son P38 MAPK, ERK y JNK, mientras que la translación requiere la activación de Rho GTPasa, P13K y Akt (58). Para la producción y liberación de citocinas existen la vía constitutiva y la inducible, sin embargo ésta última se puede suprimir selectivamente por agentes farmacológicos (57). Los resultados de nuestro estudio sugieren que la producción constitutiva de TGF- $\beta$  se conservó cuando las células de las tres líneas celulares se estimularon con FILM o con PMA. A este respecto, podemos suponer que el mecanismo involucrado en la producción de TGF- $\beta$  es estrechamente regulado, por esta razón ni la dosis usada de PMA, ni la de FILM fueron capaces de estimular su producción. Al respecto, otros estudios han mostrado que la producción de TGF- $\beta$  en diversas circunstancias es muy estable (59).

En pacientes que curan de absceso hepático amibiano, es probable que la cantidad de proteínas de la matriz (fibrina, colágena) disponible sea suficiente para la regeneración del tejido, pero no para que se forme una cicatriz, el FILM producido por la amiba puede actuar sobre estas proteínas aumentando su destrucción, o bien regulando la producción de TGF- $\beta$  para disminuir la cicatrización. Sabemos que el FILM participa en las vías de señalización NF- $\kappa$ B y MAPKs con lo cual puede alterar la expresión y producción de moléculas involucradas en la respuesta inmune (inflamación, cicatrización, quimiotaxis). Existen además datos que sugieren una polarización hacia Th2 en la respuesta celular (45).

Se ha sugerido que los macrófagos juegan un papel importante en la regeneración óptima del hígado en estudios *in vivo*. En estadios tempranos e intermedios del absceso hepático amibiano se secreta abundante TGF- $\beta$  lo que promueve la proliferación de hepatocitos y de otras células no parenquimatosas, a su vez la baja producción en los estadios tardíos puede disminuir su efecto estimulador sobre las células productoras de fibras de colágena, lo que le permite tener un papel regulatorio en el proceso de regeneración hepática (60).

Los monocitos son células clave en el proceso de inflamación tardía y participan en la cicatrización (61), el FILM, al actuar sobre ellos puede reducir la intensidad de las señales de activación enviadas a los fibroblastos, células que participan importantemente en la regulación de la cicatrización. Experimentos en paralelo en un modelo en jerbos (43) mostraron que el FILM inhibió parcialmente la respuesta inflamatoria cicatricial en peritoneo, inducida por la inyección intraperitoneal de AF. Este cambio morfológico fue visto aún ocho semanas después del reto y se manifestó como depósitos de material blanco-amarillento, que podían formar nódulos y algunas adherencias. Este fenómeno tuvo menor intensidad al inyectar el AF simultáneamente con el FILM.

La reacción peritoneal al AF y su atenuación inducida por el FILM también se ha observado en cobayos en condiciones experimentales equivalentes. En este estudio, con el modelo de rata, el aumento *in vivo* del TGF- $\beta$  inducido por el FILM correlaciona con los experimentos *in vitro* en donde también hubo un aumento de la citocina en las tres estirpes celulares estimuladas con el FILM.

En el grupo tratado con AF el proceso inflamatorio y fibroso fue más severo que en los otros grupos estudiados, probablemente debido al potente efecto inflamatorio del adyuvante, estos cambios inflamatorios se originaron en etapas tempranas, y aún ocho semanas después la producción de TGF- $\beta$  sérico fue similar a la del grupo control, cuya respuesta inflamatoria fue mínima y sin alteraciones vasculares o cicatriciales. En los grupos con FILM y AF + FILM también hubo cambios inflamatorios y fibrosos pero en menor grado, en estos dos grupos los niveles de TGF- $\beta$  encontrados podrían suprimir la inflamación a través de las citocinas inflamatorias y promover entre otros los procesos de cicatrización, fibrosis y angiogénesis, algunos de los cuales estuvieron presentes en el área afectada.

Se han señalado varias vías intracelulares sobre las cuales el FILM ejerce su acción originando su efecto antiinflamatorio. Son necesarios más estudios para conocer exactamente el papel regulatorio del TGF- $\beta$  en el proceso de la regeneración hepática y conocer si el FILM participa en la señalización intracelular a través de otras vías como la Smad involucrada en la producción del TGF- $\beta$ .

En cuanto a la recuperación motriz se ha demostrado que la administración directa en el sitio de la lesión de algunos fármaco propuestos como neuroprotectores como el ácido propionico-4-alfa-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol/keinato (AMPA/Kainato) y el N-metil-D-aspartato (NMDA), pueden atenuar el daño ocasionado por una lesión. La aplicación directa del FILM favoreció esta recuperación, lo que posiblemente indica que hubo una regeneración del tejido neural. El FILM tiene un efecto neuroprotector, promueve la expresión de TGF- $\beta$ , ayuda a la remodelación celular y a su conservación, como puede verse por los datos de la recuperación motriz.

En experimentos previos, aplicando el FILM en el sitio de la lesión, se demostró la inhibición de adherencias pericárdicas y de peritoneo así como disminución de la hipersensibilidad retardada en cobayos.

Algunos estudios han tratado de dilucidar el efecto neuroprotector del TGF- $\beta$  que incluyen los fenómenos de neurogénesis y sinaptogénesis, los cuales se han descrito en la reorganización de la vascularización cerebral después de la isquemia (30). Nuestros resultados mostraron que en el grupo tratado con FILM el TGF-  $\beta$  aumenta significativamente en comparación con los animales tratados con PBS.

## **CONCLUSIONES**

El uso del FILM en modelos inflamatorios *in vivo* muestra que los efectos encontrados *in vitro* sobre leucocitos, y destacadamente en la movilidad de los monocitos, pero también en las cascadas moleculares inmunológicas son de magnitud suficiente como para inhibir la respuesta inflamatoria como un todo, al menos en forma localizada.

En la piel El FILM retrasa la cicatrización cutánea (en el esquema utilizado) sin impedir su desarrollo hasta el cierre de las heridas. En peritoneo, el FILM reduce parcialmente la formación de adherencias peritoneales y sus consecuencias. Aunque está por determinarse si impide la transición de inflamación a cicatrización o si inhibe la fase proliferativa o incluso si estimula la fase de reabsorción. En pericardio, el FILM reduce, parcialmente, la formación de adherencias pericárdicas, con lo que ayuda a reducir la inflamación en el periodo postpericardiotomía temprano y la formación de adherencias residuales gruesas a largo plazo.

En sistema nervioso, el FILM promueve la expresión de TGF- $\beta$ , citocina que puede generar un efecto neuroprotector en este tipo de lesión, por lo que representa una estrategia farmacológica para disminuir los daños ocasionados por una LTME.

### **Relevancia del FILM en la amibiasis y como fármaco potencial.**

El conocimiento de los fenómenos producidos por el FILM, permite considerarlo como un elemento relevante en la patología de la amibiasis, y consecuentemente en sus tratamientos. Sus propiedades permiten explicar la pobre respuesta inflamatoria tardía, la ausencia de leucocitos mononucleares enfrentando a la amiba, y el desarrollo progresivo del absceso hepático. También es posible explicar a través de él y sus efectos la ausencia de cicatrización, que permite al hígado, recuperarse por regeneración sin el obstáculo de cicatrización excesiva como es el caso desafortunado de algunas hepatitis virales.

El FILM visto como medicamento también presenta un potencial múltiple:

El efecto modulador de la inflamación del FILM, particularmente intenso sobre los monocitos, pero que no mata a los leucocitos ni genera inmunosupresión sistémica, permite proponerlo como un inmunorregulador de la respuesta inflamatoria inmunológica. Por otra parte, al retrasar la retracción de las heridas, el FILM convierte en un potencial regulador de la cicatrización cutánea excesiva por ejemplo en quemaduras.

Al reducir las adherencias peritoneales sin impedir la cicatrización podría ser un mecanismo auxiliar para evitar esta complicación de la cirugía. Ese mismo efecto, en pericardio, permitiría atenuar la intensidad de la reacción pospericardiotomía, que es una complicación temporal pero grave. Además de reducir la dureza y/o grosor de las adherencias pericárdicas lo cual

facilitaría las cirugías cardíacas que deban realizarse a más de un tiempo quirúrgico.

La aplicación del FILM en las lesiones de médula espinal en el momento adecuado podría coadyuvar a la reducción del daño y eventualmente a una recuperación más exitosa de las estructuras directa o indirectamente dañadas por la lesión medular.

También cabe considerar que su pequeño peso molecular, su composición y su capacidad de prevenir la respuesta contra el mismo, hacen poco probable la generación de anticuerpos, inmunidad, o reacciones contra él.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen al Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (FIS-IMSS), México (No. FIS/IMSS/PROT/G09/742, FIS /IMSS/PROT/C2007/082, IMSS FP 2003/11, IMSS FP 2004-432) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México (No. 2008-785-064, 35060M) por el apoyo proporcionado. Así mismo expresan su agradecimiento a los alumnos que con proyectos dentro de estas líneas de investigación se titularon de Maestría y/o Licenciatura. En forma destacada: Edna Elisa García Vences, María del Rayo Garrido Ortega, Gabriela Elizabeth Bermeo Gómez, Ofelia Marín Sánchez.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Councilman WT, Lafleur HA. Amoebic dysentery. Johns Hopkins Hosp Rep 1891; 2:395.
- 2.- Pérez-Tamayo R, Brandt H. Amebiasis In: Pathology of protozoan and helminthic disease. Ed Marcial Rojas. Williams and Wilkins. Baltimore. 1971:145-188.
- 3.- Kretschmer R, Collado ML, Pacheco M, Salinas M, López-Osuna M, Leucona M, Castro EM, Arellano J. Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. Parasite Immunol 1985; 7:527-43.
- 4.- Kretschmer R, Rico G, Giménez JA. A novel anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 2001; 112(2):201-209.
- 5.- Bonnaud P, Marzetta P, Ask K, Flanders K, Gould J, Kolb M. TGF beta and Smad 3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. J. Immunol 2005; 175:5390-5395.
- 6.- Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. New Eng J Med 1999; 341(10):738-46.
- 7.- Gurtner GC, Werner S, Barrandan Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. Nature 2008; 453:314-321
- 8.- Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VII a. Blood Rev 2003; 17 (Supl 1): S1-S5.
- 9.- Vega-Robledo G. Inflamación. Rev. Fac. Med. UNAM 2008; 51(5): 220-222.
- 10.- Robbins S, Cotran R, Kumar V. Pathologic basis of disease. Ed WB Saunders Company. USA. 1994; 51-92.
- 11.- Ming O, Flavell R. Contextual regulation of inflammation. A duet by transforming growth factor and interleukin.10. Immunity 2008; 28:468-476.

- 12.- Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:593-623.
- 13.- Luscinskas FW, Gimbrone MA. Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leucocyte recruitment. *Annu Rev Med* 1996; 47:413-21.
- 14.- Adams DH, Lloyd AR. Chemokines: leucocytes recruitment and activation cytokines. *Lancet* 1997; 349:490-5.
- 15.- Maganto GE, Bux D, Tarrío M, Alcalde P, Newton G, Griffin G, Croce LK, Luscinkas F, Lichtman A, Grabie M. FoxP3- inducible regulatory T cells suppress endothelial activation and leukocyte recruitment. *J Immunol* 2011; 87 (7):3521-9.
- 16.- Santoro M, Gaudino G- Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Experimental Cell Research* 2005; 304819:274-286.
- 17.- Lie M, Favel R. TGF-beta: A master of all T cell trades. *Cell* 2008; 134:392-404.
- 18.- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:99-146.
- 19.- Letterio J, Roberts A. Regulation of immune response by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:137-140.
- 20.- Kelley J, Fabisiak J, Hawes K, Asdher M. Cytokine signaling in the lung: Transforming growth factor beta secretion by lung fibroblasts. *Am J Physiol* 1991; 260:L123-128.
- 21.- Velnar T, Bailey T, Smorkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 2009; 37:1528-1542.
- 22.- Giménez-Scherer JA, Cárdenas MG, López-Osuna M, Velázquez JR, Rico-Rosillo G, Isibasi A, Maldonado MC, Morales ME, Fernández-Díez J,

Kretschmer RR. Immunization with a tetramer derived of an anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica* protects gerbils (*Meriones unguiculatus*) against experimental amoebic abscess of the liver. *Parasit Immunol* 2004; 26:343-349.

23.- Hallenbeck JM, Jacobs TP, Faden AI. Combined PGI<sub>2</sub>, indomethacin and heparin improves neurological recovery after spinal trauma in cats. *J Neurosurg* 1983; 58:749-754.

24.- Popovich PG, Jones TB. Anipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: back to basics. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24:13-17.

25.- Mueller CA, Schluesener HJ, Conrad S, Meyermann R, Schwab JM. Spinal cord injury induces lesional expression of the proinflammatory and antiangiogenic cytokine EMAP II. *J Neurotrauma* 2003; 20:1007-1015.

26.- Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Kushimoto S, Johno M, Naruo M, Okabe H, Takatsuki K. Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neurosci* 1997; 79:1177-1182.

27.- Popovich G, Wei P, Stokes BT. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol* 1997; 377:443-464.

28.- Lotan M, Schwartz M. Cross talk between the immune system and the nervous system in response to injury: implications for regeneration. *FASEB* 1994; 8:1026-1033.

29.- Rothwell NJ, Relton JK. Involvement of cytokines in acute neurodegeneration in the CNS. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17:217-227.

30.- Zhang Z, Krebs CJ, Guth L. Experimental analysis of progressive necrosis after spinal cord trauma in the rat: etiological role of the inflammatory response. *Exp Neurol* 1997; 143:141-152.

31.- Klempt ND, Sirimanne E, Gunn AJ, Klempt M, Singh K, Williams C, et al. Hypoxia-ischemia induces transforming growth factor beta 1 mRNA in the infant rat brain. *Brain Res Mol* 1992; 13: 3-101.

- 32.- Wiessner C, Gehrmann J, Lindholm D, Topper R, Kreutzberg GW, Hossmann KA. Expression of transforming growth factor beta 1 and interleukin-1 beta mRNA in rat brain following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 1993; 86:439-46.
- 33.- Lu YZ, Lin CH, Cheng FC, Hsueh CM. Molecular mechanisms responsible for microglia-derived protection of SpragueDawley rat brain cells during in vitro ischemia. *Neurosci Lett* 2005; 373: 159-64.
- 34.- Brea D, Sobrino T, Ramos-Cabrer P, Castillo J. Reorganización de la vascularización cerebral tras la isquemia. *Rev Neurol* 2009;49:645-54.
- 35.- 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; 145:652-5.
- 36.- Pérez-Tamayo, R. Pathology of Amebiasis. In: Amebiasis. Ed Martínez-Palomo A. Elsevier. Amsterdam. 1986; p 45.
- 37.- Tsutsumi V, Martínez-Palomo A. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *Am J Pathol* 1988; 130:112-115.
- 38.- Jervis HR, Takeuchi A. Amebic dysentery. Animal model: experimental *Entamoeba histolytica* infection in the germfree guinea pig. *Am J Pathol* 1979; 94:197-200.
- 39.- Silva García R, Rico Rosillo G, Espinosa Cantellano M, Castañon G, Giménez Scherer J, Kretschmer R. *Entamoeba dispar* does not produce monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol* 2003; 25:99-101.
- 40.- Rico G, Díaz-Guerra O, Giménez-Scherer JA, Kretschmer R. Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leukocytes. *Arch Med Res* 1992; 23:157-159.

- 41.- Rico G, Arellano J, Kretschmer RR. The human monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* does not inhibit the locomotion of human eosinophils. Parasitology Research 1998; 84:522-523.
- 42.- Giménez-Scherer JA, Rico G, Fernández J, Kretschmer R. Inhibition of contact cutaneous delayed hypersensitivity reactions to DNCB in guinea pigs by the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* Arch Med Res 1997; 28:237-238.
- 43.- Cárdenas MG, Garay A, Rico G, Giménez-Scherer JA, Kretschmer R. Reduction of peritoneal adhesions by the anti-inflammatory peptide produced by *E. histolytica* in gerbil model. Clin Immunol 2002; 103:34-35.
- 44.- Utrera-Barillas D, Velázquez JR, Enciso A, Muñoz Cruz S, Rico G, Curiel Quezada E, Terán LM, Kretschmer R. An anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica* down-regulates the expression of pro-inflammatory chemokines. Parasite Immunology 2003; 25:475-482.
- 45.- Silva-García R, Estrada-García I, Ramos-Payán R, Torres-Salazar A, Morales-Martínez ME, Arenas-Aranda D, Giménez-Scherer JA, Blanco-Favela F, Rico-Rosillo G. The effect of an anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica* on gene expression in the U-937 monocytic cell line. Inflamm Research 2008; 57 (4):145-150.
- 46.- Furuzawa-Carballeda J, Alcocer J, Rico G, Pérez C, Velázquez JR. Amebic peptide MLIF modulates the development of inflammatory process in a CIA mouse model. Congress of Immunology and 6<sup>th</sup> Annual Conference of FOCIS. San Francisco, California, 2006.
- 47.- Muñoz ML, Calderón J, Rojkind M. The collagenase of *Entamoeba histolytica*. J Exp Med 1987; 155:42-51.
- 48.- Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ed. Academia Nacional de Medicina. 1999.
- 49.- Norma Oficial Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. NOM. 062-Z00-1999.

- 50.- Young W. Spinal cord regeneration Sci 1996; 273:451.
- 51.- Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest 1968; 97:77-89.
- 52.- 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; 14:64-67.
- 53.- Massague J. The transforming growth factor-beta family. Annu Rev Cell Biol 1990; 6:597-641.
- 54.- Silva-Garcia R. Efecto del pentapéptido anti-inflamatorio (FILM) producido por *Entamoeba histolytica* sobre la expresión de genes relacionados con la inflamación/cicatrización. Tesis de Doctorado, Instituto Politécnico Nacional, México, 2007.
- 55.- Mashasiro S, Masayuki K, Takefumi I, Akiko W, Noriko I, Masaki S, Manabu K, Takanobo S, Mamoru M. Differential regulation of metalloproteinase production, proliferation and chemotaxis of human lung fibroblasts by PDGF, interleukin-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . Mediators Inflamm 2000; 9:1551-60.
- 56.- Mehrnaz G, Sem HP. Role of cytokines and cytokine therapy in wound healing and fibrotic disease. Curr Pharm Desigs 2001; 7:1083-103.
- 57.- Baumgartner RA, Deramo VA, Beaven MA. Constitutive and inducible mechanisms for synthesis and release of cytokines in immune cell lines. J Immunol 1996; 157:4087-4093.
- 58.- Xiao YQ, Freire-de-Lima CG, Schiemann WP, Bratton DL, Vandivier RW, Henson PM. Transcriptional and translational regulation of TGF-beta production in response to apoptotic cells. J Immunol 2008; 181: 3575-3585.
- 59.- Rosas A, Valencia MP, Sánchez M, Bautista M, Rico G, Vega GB. Transforming growth factor beta and platelets in allergic rinitis and sinusitis. Rev Alergia Mex 2011; 58(2): 93-98.

60.- Shibayama M, Serrano-Luna J, Velázquez Jessica, Tsutsumi V. Role of transformer growth factor (TGF- $\beta$ ) during the regeneration of amoebic liver abscess. XVI Seminario sobre amibiasis and EMBO WORKSHOP. Guanajuato, México febrero del 2009.

61.- Chazaud B, Brigitte M, Yacoub H, Arnold L, Gherardi R, Sonnet C, Lafuste P, Chretien F. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc Sport Sci Rev* 2009; 37:18-22.

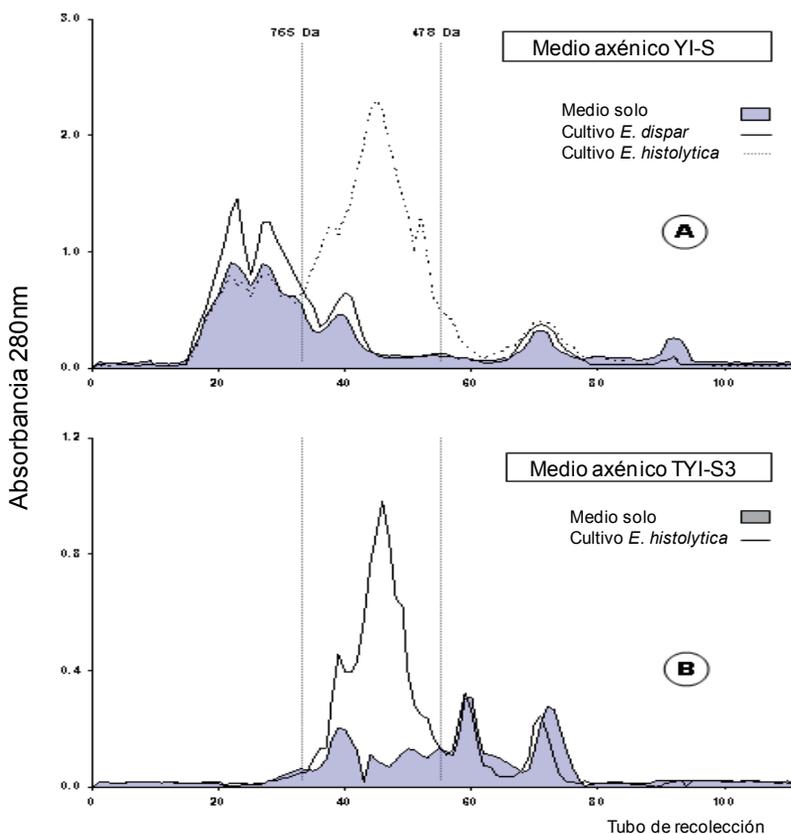


Figura 1. Cromatografía (Sephadex G-15) del sobrenadante de cultivos axénicos de *E. dispar* y *E. histolytica*, y su correspondiente medio axénico solo. (A) Cultivos en medio axénico YI-S. (B) Cultivo de *E. histolytica* en medio axénico TYI-S33. *E. dispar* no crece en este medio. Como resultado, este cultivo no puede ser probado para *E. dispar*.

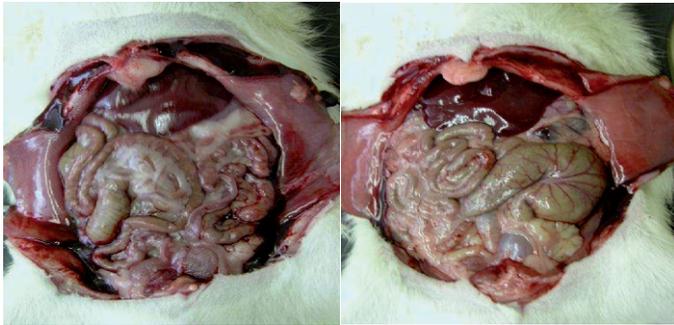


A

B

C

Figura 2. Regulación de las adherencias peritoneales por FILM. A) Peritoneo normal en jerbos: órganos libres y peritoneo lustroso y transparente. B) Respuesta a la aplicación de adyuvante de Freund: múltiples adherencias y reacción inflamatoria y cicatricial. C) Respuesta a la aplicación de adyuvante de Freund junto con FILM: la reacción es mucho más reducida.



A

B

Figura 3. Reacción intraperitoneal en cobayos. A) Respuesta a la aplicación de adyuvante de Freund: presencia de material adherente incluso con vasos neoformados. B) Respuesta a la aplicación de adyuvante de Freund junto con FILM: aspecto mucho más cercano a lo normal.

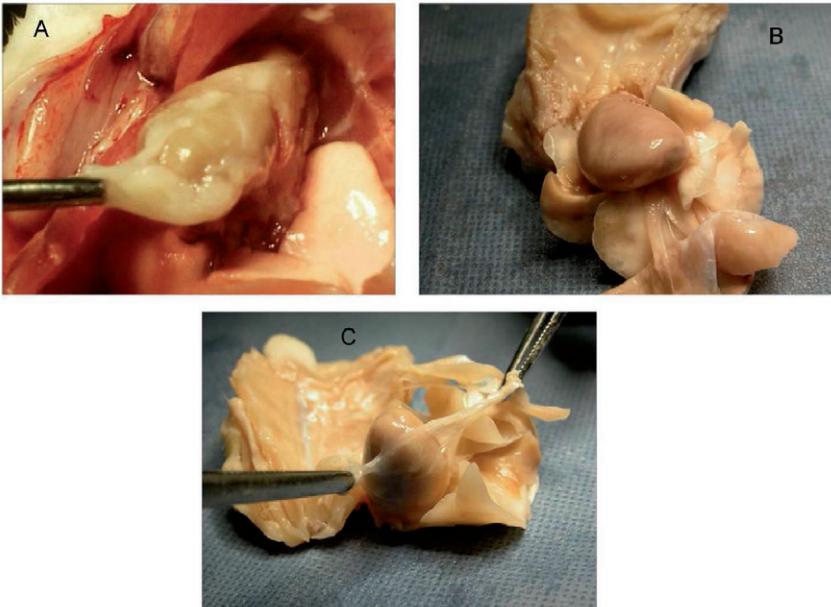


Figura 4. Inhibición de la reacción inflamatoria cicatricial en pericardio de rata. A) Testigo positivo, operación sin modificadores: hay una intensa reacción con múltiples adherencias. B) Efecto de la combinación de FILM y sello de fibrina: Las dos capas del pericardio aparecen totalmente limpias y libres. C) Efecto del FILM solo: el componente denso y grueso ha desaparecido, pero persisten membranas transparentes.

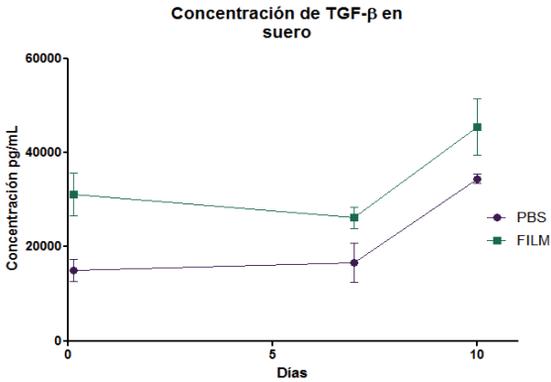


Figura 5. Determinación de la concentración de TGF- $\beta$  en el suero de animales con LTME y tratados con FILM (200 $\mu$ g) o PBS después de la lesión. La concentración de TGF- $\beta$  se midió en el suero a las 3 horas, 7 y 10 días. El TGF- $\beta$  fue mayor en animales tratados con FILM que en aquellos que se trataron con PBS, ( $p < 0.05$ ).

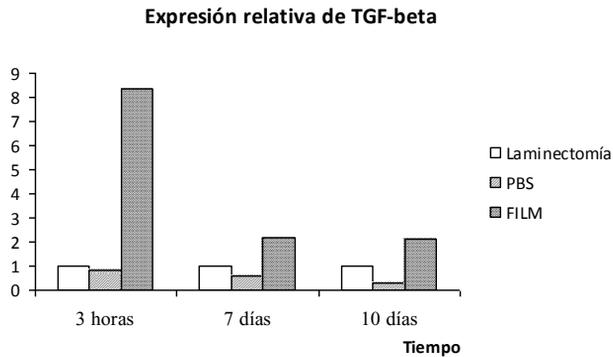


Figura 6. Expresión relativa por PCR Tiempo real de TGF- $\beta$ . Se determinó la expresión relativa por PCR-TR de TGF- $\beta$  en mRNA total de médula espinal a las 3 horas, 7 y 10 días después de una LTME moderada, la expresión relativa de TGF- $\beta$  en animales tratados con FILM, inmediatamente después de la lesión, tuvo una diferencia significativa, Kruskal- Wallis (\*\* $p < 0.01$  a las 3 h y \* $p < 0.05$  a los 7 y 10 días) en comparación con el grupo de PBS y el grupo basal.



Figura 7. Estudio macroscópico en el grupo con AF. Vasodilatación e inflamación intensa, peritoneo hemorrágico y adherencias.

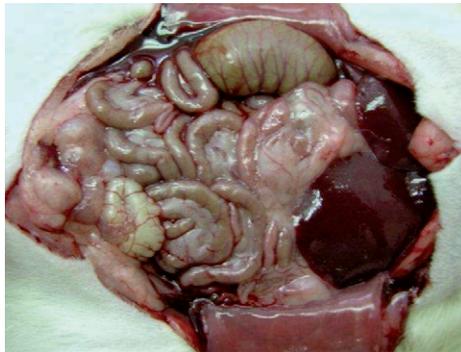


Figura 8. Estudio macroscópico en el grupo con FILM. Vasodilatación e inflamación menos intensa, fibras adherentes y formaciones neovasculares.

Tabla 1

**TGF- $\beta$  en el suero de ratas inmunizadas**

| <b>Inmunización</b>                     | <b>pg/ml</b> |
|---|--------------|
| PBS <sup>a</sup>                        | 7298         |
| Adyuvante de Freund <sup>b</sup>        | 8989         |
| FILM <sup>c</sup>                       | 13710        |
| Adyuvante de Freund + FILM <sup>d</sup> | 12666        |

<sup>a</sup> PBS (control), <sup>b</sup> Adyuvante de Freund,

<sup>c</sup> Factor inhibidor de la locomoción de monocitos

Análisis estadístico: NS no significativo (a vs b; c vs d);  
 $p < 0.02$  (a vs c; a vs d);  $p < 0.05$  (b vs c; b vs d)





MoreBooks!  
publishing



# yes i want morebooks!

Buy your books fast and straightforward online - at one of world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at

**[www.get-morebooks.com](http://www.get-morebooks.com)**

---

¡Compre sus libros rápido y directo en internet, en una de las librerías en línea con mayor crecimiento en el mundo! Producción que protege el medio ambiente a través de las tecnologías de impresión bajo demanda.

Compre sus libros online en

**[www.morebooks.es](http://www.morebooks.es)**



VDM Verlagsservicegesellschaft mbH

Heinrich-Böcking-Str. 6-8  
D - 66121 Saarbrücken

Telefon: +49 681 3720 174  
Telefax: +49 681 3720 1749

info@vdm-vsg.de  
www.vdm-vsg.de





