



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

TESIS

ESTUDIO DEL EFECTO
ANTIINFLAMATORIO DEL ANÁLOGO
SINTÉTICO DE LA GnRH, ACETATO DE
LEUPROLIDA, EN RATA

PRESENTA

Angélica Marlene Vieyra Márquez

PARA OBTENER EL GRADO EN LA MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN EL ÁREA DE TOXICOLOGÍA

TUTORES

Dra. Eva María Salinas Miralles

Dr. José Luis Quintanar Stephano

ASESOR

Dra. Mariela Jiménez Vargas

Aguascalientes, Ags, Noviembre del 2016



ANGÉLICA MARLENE VIEYRA MÁRQUEZ
MAESTRÍA EN CIENCIAS ÁREA TOXICOLOGÍA
PRESENTE.

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "**Efecto Antiinflamatorio del análogo sintético de la GnRH, Acetato de Leuprolida, en rata**", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

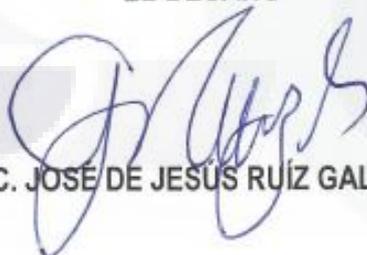
Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 22 de noviembre de 2016

"Se lumen proferre"

EL DECANO



M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como asesor designado del estudiante **ANGÉLICA MARLENE VIEYRA MÁRQUEZ** con ID 130393 quien realizó la tesis titulada **ESTUDIO DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL ANÁLOGO SINTÉTICO DE LA GnRH, ACETATO DE LEUPROLIDA, EN RATA**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 15 de Noviembre de 2016

Dra. Mariela Jiménez Vargas
Comité tutorial

c.c.p.- Angélica Marlene Vieyra Márquez
c.c.p.- Dr. Juan Jáuregui Rincón - Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Dr. Martín Gerardo Rodríguez - Consejero Académico para Área terminal Toxicología
c.c.p.- Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch - Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **ANGÉLICA MARLENE VIEYRA MÁRQUEZ** con ID 130393 quien realizó la tesis titulada **ESTUDIO DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL ANÁLOGO SINTÉTICO DE LA GnRH, ACETATO DE LEUPROLIDA, EN RATA**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

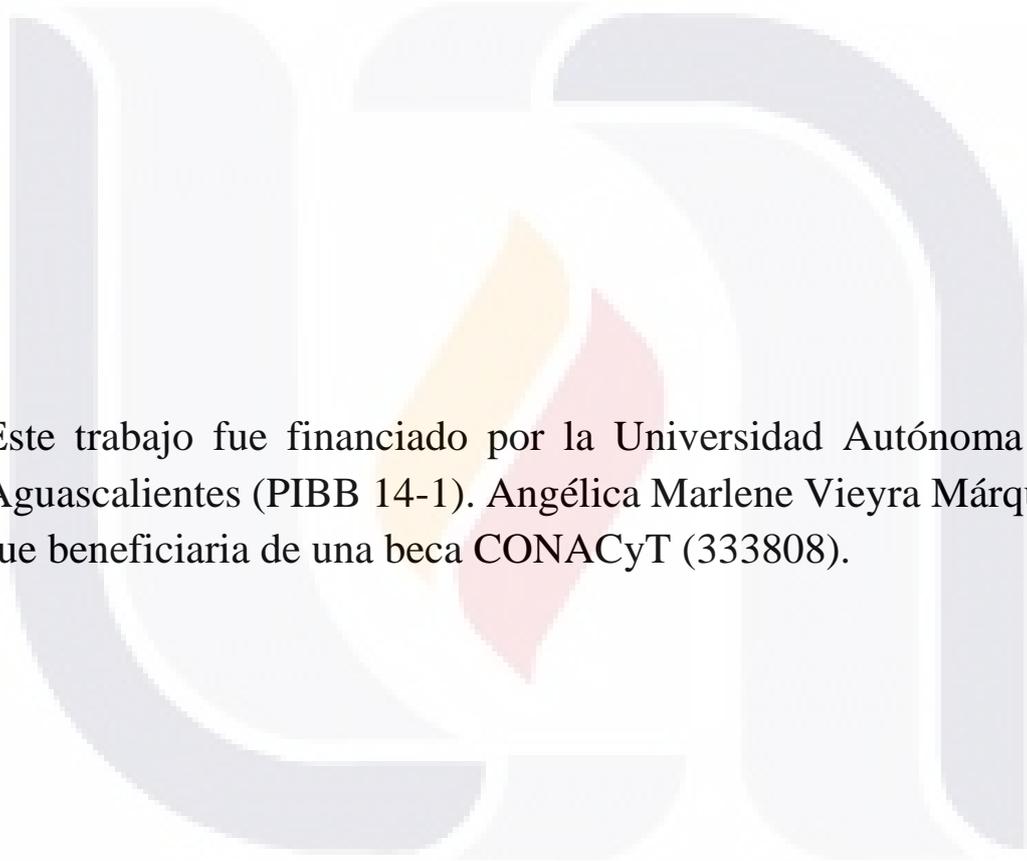
Aguascalientes, Ags., a 15 de Noviembre de 2016

Dr. José Luis Quintanar Stephano
Tutor de tesis

Dra. Eva María Salinas Miralles
Tutora de tesis

c.c.p.- Angélica Marlene Vieyra Márquez
c.c.p.- Dr. Juan Jáuregui Rincón - Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Dr. Martín Gerardo Rodríguez - Consejero Académico para área terminal Toxicología
c.c.p.- Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch - Secretario Técnico

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



Este trabajo fue financiado por la Universidad Autónoma de Aguascalientes (PIBB 14-1). Angélica Marlene Vieyra Márquez fue beneficiaria de una beca CONACyT (333808).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas, que me apoyaron de diferentes maneras a lo largo de mi proyecto y estuvieron a mi lado compartiendo tantas horas de trabajo. Especialmente a:

A mi madre, que fue dura conmigo y que nunca me permitió mantener una postura derrotista y me hizo ver lo afortunada que era por tener la oportunidad de vivir esta experiencia.

A mi hermana mayor, quien escuchó con paciencia mis inquietudes y me dio los mejores consejos que me llevaron a continuar y a seguir caminando siempre hacia adelante.

A mi hermana menor, por quien soy responsable y pretendo ser un ejemplo, así como lo fue mi hermana mayor para mí en su momento.

A la Dra. Eva Salinas, una persona por la que siento un profundo respeto y admiración y quien ciertamente me mostró sin vacilar que es lo que se necesita no sólo para ser un buen investigador, sino para ser bueno en cualquier ámbito de la vida.

Al Dr. José Luis Quintanar, que me enseñó que si pongo atención a todo lo que me rodea, en especial a los detalles más pequeños, viviré sorprendida.

A la Dra. Mariela Jiménez, quien se desveló conmigo, estuvo ahí en todo momento, sin importar que tan difícil fuera y quien me forjó carácter.

A Carolina Muñoz, mi vecina de escritorio, mi compañera de dulces y de galletas y ahora una gran amiga.

Al Dr. Daniel Cervantes, una persona amable que admiro y respeto tanto, ya que es alguien que siempre está dispuesto a ayudar y a enseñar a quien lo necesite.

A Oscar Ortega, Pamela Gallegos, Berenice Barrón, Irma Alejandra y Eugenio Pérez, quienes trajeron a mi vida gratos momentos.

DEDICATORIAS

Quiero dedicar este trabajo a:

A mi padre, José de Jesús Vieyra Durán. Tengo que decir, que si bien no nos conocimos a fondo, dejaste aquí en la tierra tu recuerdo y todo el amor que profesaste por tu familia en vida.

A mi abuela Graciela Quezada Muñoz, una amiga inusual, que me enseñó que en la vida, rendirse jamás será una opción, que creyó en mí cuando nadie más lo hacía y que me dio todo el amor que una abuela puede dar. Sé que en alguna parte continúas viéndome y prometo hacerte sentir orgullosa y jamás rendirme, porque tú fuiste un claro ejemplo de lucha constante.



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE.....	1-2
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ACRÓNIMOS.....	4-7
RESUMEN.....	8-9
ABSTRACT.....	10-11
1. INTRODUCCIÓN.....	12-35
1.1. Inflamación.....	12
1.1.1. Datos epidemiológicos de la inflamación	13-16
1.1.1.2. Mortalidad y morbilidad relacionadas con enfermedades con inflamación aguda.....	13-14
1.1.1.3. Mortalidad y morbilidad relacionadas con enfermedades de inflamación crónica.....	14-16
1.1.2 Generalidades de la inflamación.....	16
1.1.2.1. Tipos de inflamación.....	17
1.1.2. Mecanismos de la respuesta inflamatoria.....	17-22
1.1.2.2.1. Fase 1. Reconocimiento de daño y detección de patógenos.....	17-18
1.1.2.2.2. Fase 2. Transcripción de mediadores de la inflamación... ..	18-19
1.1.2.2.3. Fase 3. Cambios en la permeabilidad vascular y migración leucocitaria a los tejidos	19-20
1.1.2.2.4. Fase 4. Resolución de la inflamación.....	20-21
1.1.2.2.4.1. Restauración de la homeostasis y reparación tisular a partir de macrófagos.....	21-22
1.1.3. Progresión de inflamación aguda a crónica.....	23-25
1.1.3.1 Inflamación crónica ligada a una respuesta subnormal....	25-26
1.1.3.2. Inflamación crónica ligada a una respuesta por debajo de lo normal.....	26-27
1.1.4. Modelos de inflamación.....	27-30
1.1.5. Terapias antiinflamatorias.....	31-32
1.2.1 Acetato de leuprolida.....	32-34

1.2.1.2. Propiedades farmacocinéticas del acetato de leuprolida.....34-35

1.2.1.3. Metabolismo.....35-36

2. ANTECEDENTES.....36-40

3. JUSTIFICACIÓN.....41-42

4. HIPÓTESIS.....43

5. OBJETIVOS.....44

6. METODOLOGÍA.....45-57

6.1. Animales.....45

6.2. Pruebas de toxicidad del acetato de leuprolida en mastocitos.....45-49

6.2.1. Cultivo de mastocitos.....45-46

6.2.2 Determinación de la viabilidad celular.....47

6.2.3. Determinación de la viabilidad celular por MTT.....48-49

6.3. Grupos de animales y tratamientos en los ensayos *in vivo*.....50

6.4. Diseño experimental e inducción del edema plantar por acción de la carragenina (modelo de inflamación aguda).....50-52

6.5. Diseño experimental e inducción de granuloma por pastilla de algodón (modelo de inflamación crónica).....53-56

6.6. Análisis estadístico.....57

7. RESULTADOS.....58-70

7.1 Efecto tóxico del acetato de leuprolida sobre mastocitos.....58-62

7.2. Efecto antiinflamatorio del acetato de leuprolida sobre un modelo experimental de inflamación aguda.....63-68

7.3. Efecto antiinflamatorio del acetato de leuprolida sobre un modelo experimental de inflamación crónica.....69-70

8. DISCUSIONES.....71-80

9. CONCLUSIONES.....81

10. BIBLIOGRAFÍA.....82-95

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.....	22
FIGURA 2.....	30
FIGURA 3.....	33
FIGURA 4.....	46
FIGURA 5.....	47
FIGURA 6.....	48
FIGURA 7.....	49
FFIGURA 8.....	50
FIGURA 9.....	51
FIGURA 10.....	51
FIGURA 11.....	52
FIGURA 12.....	53
FIGURA 13.....	53
FIGURA 14.....	54
FIGURA 15.....	55
FIGURA 16.....	56
FIGURA 17.....	58
FIGURA 18.....	60
FIGURA 19.....	62
FIGURA 20.....	64
FIGURA 21.....	66
FIGURA 22.....	67
FIGURA 23.....	68
FIGURA 24.....	69
FIGURA 25.....	70

ACRÓNIMOS

Ag	Antígeno
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AL	Acetato de leuprolida
CD4 ⁺	Grupo de diferenciación 4: Marcador fenotípico de membrana de Linfocito T cooperador
CGD	Enfermedad granulomatosa crónica
COX ₂	Ciclooxigenasa tipo 2
CRF	Factor liberador de corticotropina
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
EAE	Encefalomiелitis autoinmune experimental
ECM	Matriz Extracelular
ENT	Enfermedades no transmisibles
FSH	Hormona folículo estimulante
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

GMPc

Guanosín monofosfato cíclico

GnRH

Hormona liberadora de gonadotropina

HPG

Eje hipotálamo pituitario gonadal

Ig

Inmunoglobulina

IL

Interleucina

IM

Intramuscular

IMID

Enfermedades autoinmunes mediadas por un proceso inflamatorio

Inos

Óxido nítrico sintetaza

IV

Intravenosa

kDa

KiloDalton

LDL

Lipoproteínas de baja densidad

LH

Hormona luteinizante

LPS

Lipopolisacáridos

LTh

Linfocitos T cooperadores

LXR

Receptores X del hígado

MBP

Proteína básica de mielina

MHC

Complejo principal de histocompatibilidad

MMP

Metalopeptidasa de matriz

NADPH oxidasa 4

Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 4

NF-Kb

Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activas

NFS

Proteínas que conforman los neurofilamentos

NK

Células asesinas naturales

NLRs

Receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótido

NO

Óxido nítrico

OMS

Organización mundial de la salud

PAMPs

Patrones moleculares asociados a patógenos

PDGF

Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PG

Prostaglandinas

PGE₂

Prostaglandina tipo 2

PGH₂

Prostaglandina H₂

PKC

Proteínas quinasa C

PMN

Neutrófilos polimorfonucleares

ROI

Especies reactivas de oxígeno

RXR

Receptor retinoide X

S.E.M.

Media del error estándar

SC

Subcutáneo

SRIS

Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

S.S.F

Solución salina fisiológica 0.9%

TCR

Receptor de la célula T

TGF- β

Factor transformador del crecimiento Beta

TLC

Linfocito T Citotóxico

TLRs

Receptores tipo Toll

TNF- α

Factor de necrosis tumoral alfa

TNF- γ

Interferon gamma

TRPA1

Canal iónico proinflamatorio

Treg

Linfocito T regulador

VEGF

Factor estimulante de los vasos sanguíneos

VO

Vía oral

RESUMEN

La inflamación, es una respuesta de tejidos vascularizados frente a una agresión local o sistémica. Ésta, a su vez, se divide en inflamación aguda y crónica: la primera se caracteriza por la presencia de cambios vasculares, la infiltración de leucocitos (principalmente neutrófilos polimorfonucleares) y la participación de mediadores inflamatorios. Con el tiempo, la inflamación aguda desaparece a partir de la remoción del estímulo agresor, la reparación del tejido dañado y se presenta la restauración de la homeostasis. Cuando la inflamación aguda no se resuelve y se prolonga por bastante tiempo, ésta progresa a inflamación crónica. Este tipo de inflamación, se caracteriza por presencia de angiogénesis, infiltrado de células mononucleares (principalmente macrófagos), fibrosis y una pérdida progresiva de la estructura y funcionalidad del órgano o tejido.

Debido a que los medicamentos actuales producen efectos adversos importantes, se decidió probar el efecto antiinflamatorio (de tipo agudo y crónico) del análogo sintético de la GnRH, acetato de leuprolida (AL), en ratas Wistar macho. Este análogo de la GnRH, es considerado como un compuesto muy seguro y tolerable y estudios recientes han reportado que presenta una actividad inmunomoduladora (Guzmán *et al.*, 2015). Así mismo, también se analizó su toxicidad sobre células de la respuesta inflamatoria, a concentraciones crecientes que iban de 0.1 a 500 nM.

Las pruebas de toxicidad con AL, se llevaron a cabo en mastocitos, los cuales se sometieron a una concentración de 0.1, 38, 50, 80 y 500 nM, durante 24 h de incubación, a una presión y temperatura constantes, dentro de una cámara húmeda de CO₂. La viabilidad celular se obtuvo por medio de una prueba de MTT (sales de tetrazolio), las cuales son metabolizadas por enzimas deshidrogenasas o con capacidad óxido reductasa, en células vivas o metabólicamente activas. De acuerdo al porcentaje de viabilidad celular obtenido a partir de la lectura arrojada por el espectrofotómetro, el AL no presentó actividad citotóxica a ninguna concentración. Por el contrario, se obtuvo un incremento de la viabilidad celular, a la dosis más alta (500 nM).

El efecto antiinflamatorio del AL, se analizó por medio de un modelo de inflamación aguda y crónica. Las dosis de AL se tomaron en base al protocolo de Díaz-

Galindo y colaboradores (2015). En ambos modelos se utilizaron 3 grupos: Controles (C), a los cuales se les administró 100 µl de solución salina fisiológica al 0.9% (S.S.F) vía intramuscular (IM); Indometacina (I), tratados con 5 mg de indometacina, por Kg de peso corporal del animal, disuelta en S. S. F y administrada por vía oral (VO) y Tratados (T), los cuales recibieron como tratamiento, 10µg de AL por Kg de peso corporal del animal, disuelto en S. S. F, vía IM.

En el modelo agudo de inducción de edema plantar por inyección de carragenina (CA) al 1%, se administró S.S.F o AL, como tratamientos profilácticos de 12 y de 3 días, antes de la inducción del edema plantar y cada tercer día. En otro ensayo se administró S. S. F, AL e I, 30 minutos previos a la inducción del edema plantar. Para la inducción de este último, se inyectaron 100 µl de CA al 1 % , en la zona plantar de la pata derecha de cada una de las ratas y 100 µl de S. S. F en la zona plantar de la pata izquierda. El volumen de cada una de las patas se midió con ayuda de un vernier digital, a las 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h de haber inyectado la CA. Únicamente se observó un efecto inhibitorio de la formación del edema por parte del AL administrado como tratamiento profiláctico de 3 días, el cual fue significativo respecto al control, a las 2 h de haber inducido el edema. A partir de ahí, ya no se apreció efecto alguno.

En el modelo crónico de inducción de granuloma por pastilla de algodón, se administró S.S.F o AL, como tratamientos profilácticos de 12 y de 3 días antes de la inducción del granuloma y cada tercer día, hasta el día 8 de la extracción del mismo. En otro ensayo se administró S.S.F, AL e I, un día después de la inducción del granuloma y cada tercer día (a excepción de la I que se administró diariamente) hasta el día 8 de la extracción del granuloma. Para el desarrollo de este modelo, se les colocaron a nivel subcutáneo, 4 pastillas de algodón estériles de 10 mg en las zonas axilares e inguinales de cada una de las ratas. Al día 8 las ratas fueron sacrificadas y se removieron quirúrgicamente los granulomas ya formados. Los granulomas se dejaron secar en una estufa a 57°C hasta obtener un peso seco constante (al tercer día) y a partir de éste, se calculó el porcentaje de inhibición de la formación del granuloma. Cabe señalar que en este modelo, no se observó un efecto de inhibición de la formación del granuloma que fuera estadísticamente significativo respecto al control, por parte del AL, ya sea como tratamiento profiláctico o terapéutico.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ABSTRACT

Inflammation is a response of vascularized tissues by a local or systemic aggression. This, at the same time, is divided into acute and chronic inflammation: the first is characterized by the presence of vascular changes, the infiltration of leukocytes (mainly polymorphonuclear neutrophils) and the involvement of inflammatory mediators. With the time, acute inflammation disappears from the removal of the aggressor stimulus, the repair of damaged tissue and the restoration of homeostasis. When acute inflammation does not resolve and lasts for a long time, it progresses to chronic inflammation. This type of inflammation is characterized by the presence of angiogenesis, mononuclear cell infiltration (mainly macrophages), fibrosis, and a progressive loss of structure and function of the organ or tissue.

Due to medications produce significant adverse effects, it was decided to test the anti-inflammatory (acute and chronic) effect of the synthetic analogue of GnRH, leuprolide acetate (AL), in male Wistar rats. This GnRH analogue is considered to be a very safe and tolerable compound and recent studies have reported that it has an immunomodulatory activity (Guzmán *et al.*, 2015). Also, their toxicity was analyzed on cells of the inflammatory response, at increasing concentrations ranging from 0.1 to 500 nM.

AL toxicity tests were performed on mast cells, which were subjected to a concentration of 0.1, 38, 50, 80 and 500 nM for 24 h of incubation at constant pressure and temperature within a chamber Wet CO₂. Cell viability was obtained by MTT (tetrazolium salts), which are metabolized by dehydrogenase enzymes or with an oxidase reductase capacity in living or metabolically active cells. According to the percentage of cell viability obtained from the reading thrown by the spectrophotometer, the LA showed no cytotoxic activity at any concentration. In contrast, an increase in cell viability was obtained at the highest dose (500 nM).

The anti-inflammatory effect of LA was analyzed through a model of acute and chronic inflammation. The doses of LA were taken based on the protocol of Díaz-Galindo *et al.* (2015). In both models, 3 groups were used: Controls (C), which were administered 100 µl of 0.9% physiological saline solution (S.S.F) intramuscularly

(IM); Indomethacin (I), treated with 5 mg of indomethacin per kg body weight of the animal, dissolved in S.S.F. and administered orally (VO) and treated (T), which received as treatment 10 µg AL per kg Body weight of the animal, dissolved in S.S F, via IM.

In the acute model of plantar edema induction by injection of 1% carrageenan (CA), S.S.F or AL were given as prophylactic treatments of 12 or 3 days, prior to induction of plantar edema and every third day. In another trial, S.S.F, AL and I were administered 30 minutes prior to induction of plantar edema. For the induction of the latter, 100 µl of 1% CA were injected into the plantar area of the right foot of each of the rats and 100 µl of S.S.F in the plantar area of the left paw. The volume of each of the legs was measured using a digital vernier at 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 24 h after have injected CA. Only an inhibitory effect of the edema formation on the part of the AL administered as a 3-day prophylactic treatment was observed, which was significant regarding the control, at 2 h after inducing the edema. From then on, no effect was seen.

In the chronic model of granuloma induction by cotton pellet, S.S.F or AL were given as prophylactic treatments 12 or 3 days before granuloma induction and every third day until day 8 of the granuloma induction. In another trial, S.S.F, AL and I were given one day after induction of the granuloma and every third day (except for I, which was administered daily) until day 8 of granuloma withdrawal. For the development of this model, 4 sterile of 10 mg cotton pellets were placed at the subcutaneous level in the axillary and groin areas of each of the rats. At day 8, the rats were sacrificed and the granulomas already formed were removed surgically. The granulomas were allowed to dry in an oven at 57 ° C until a constant dry weight (on the third day) was obtained and from this, the percentage of inhibition of granuloma formation was calculated. It should be noted, that in this model, there was no inhibitory effect of granuloma formation that was statistically significant with respect to AL control either as a prophylactic or therapeutic treatment.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Inflamación

La raíz etimológica de la palabra inflamación proviene del latín *inflammare* o *inflammatio*, que significa encender fuego. El romano Cornelius Celsus, es el primero en describir los cuatro signos cardinales de la inflamación: enrojecimiento y tumefacción con calor y dolor (Scott *et al.*, 2004). Clásicamente, la inflamación se define como una respuesta adaptada de los tejidos vivos vascularizados, que se activa ante la presencia de un agente patógeno o una lesión (Medzhitov, 2008). En Inmunología, la inflamación es un proceso que ocurre en los tejidos, el cual involucra el reclutamiento de productos derivados de la sangre, como proteínas plasmáticas, fluidos y leucocitos, en el tejido afectado. Esta migración, a su vez es facilitada por la alteración en la vasculatura local, debido a un incremento en la vasodilatación y la permeabilidad vascular y a un aumento del flujo sanguíneo (Ashley *et al.*, 2012). Las principales funciones de la inflamación son las de contener, aislar y destruir el agente inflamatorio, remover el tejido dañado y restaurar la homeostasis de la zona afectada (Soehnlein & Lindbon, 2010).

Macroscópicamente, la inflamación se caracteriza por la aparición de 5 signos cardinales, gracias a que Virchow agregó uno a los ya establecidos anteriormente por Cornelius Celsus en el siglo primero. El primer signo es el rubor, que se produce por una mayor irrigación sanguínea (incremento en la concentración de eritrocitos) de la zona donde se está dando el estímulo inflamatorio; el segundo signo es dolor, producto de la acción de diferentes mediadores, como las prostaglandinas, bradiquininas y sustancia P, las cuales actúan sobre los nociceptores; el tercer signo corresponde al calor, que se genera por el aumento de la actividad metabólica de la zona, a un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROI) y a la llegada de sangre caliente; el cuarto signo es la tumefacción, que se produce por la extravasación de líquido del torrente sanguíneo hacia la zona afectada, debido un incremento de la permeabilidad vascular de los vasos sanguíneos que rodean el tejido; y finalmente, el quinto signo o signo de Virchow, corresponde a disminución de la función del órgano o tejido afectado (Alessandri *et al.*, 2013).

1.1.1. Datos epidemiológicos de la inflamación

1.1.1.2. Morbilidad y mortalidad relacionados con enfermedades con inflamación aguda

La inflamación aguda, es una pieza clave en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), considerada como una entidad clínica siempre secundaria a una patología subyacente, la cual debe ser identificada para establecer el tratamiento adecuado. Las causas del SRIS son diversas. Éste se puede dar por infecciones (sepsis, endotoxina circulante, tuberculosis), enfermedad tromboembólica, enfermedades autoinmunes, anafilaxia, agentes físicos (radiaciones, quemaduras extensas), agentes químicos (drogas, pesticidas), pancreatitis aguda, infarto al miocardio, politraumatismo, cáncer, cirugía invasiva, shock de cualquier etiología, síndrome hemofagocítico, hemodializados crónicos y picadura de escorpiones, arañas y serpientes (Horeczko *et al.*, 2014)

La prevalencia de SRIS es muy alta, afecta a un tercio de los pacientes en el hospital y representa más del 50% de los pacientes en terapia intensiva y más del 80% de los pacientes sometidos a una intervención quirúrgica. Los pacientes con trauma, son especialmente susceptibles a padecer SRIS, sin que haya presencia de infecciones. Aproximadamente, un tercio de los pacientes con SRIS, tienden o desarrollan sepsis (respuesta sistémica y potencialmente mortal ante una infección). La sepsis ocurre en el 25% de pacientes que se encuentran en cuidados intensivos y en el 10% de bacteremias (Brun, 2000).

Cuando la sepsis evoluciona a choque séptico y disfunción orgánica múltiple, su mortalidad llega a ser de 27% a 59%, con estancias hospitalarias prolongadas y elevados costos (Carrillo *et al.*, 2009). Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que la sepsis es uno de los principales motivos de ingreso a la unidad de terapia intensiva y representa un problema de salud pública. Angus y colaboradores (2002), analizaron 6 millones de altas hospitalarias en Estados Unidos de Norteamérica: encontraron 751 mil casos de sepsis por año, con una tasa de mortalidad de 26.6 %.

La pancreatitis aguda (proceso inflamatorio agudo del páncreas), es otra enfermedad con un proceso inflamatorio agudo a considerar. Se ha reportado a nivel

mundial, que la tasa de mortalidad generada por pancreatitis aguda, oscila entre el 2 y el 9% con una media del 5%, incrementándose hasta el 62% en aquellos pacientes con pancreatitis necrosantes e infectadas (Otsuki, 2006).

Y así como la pancreatitis aguda o la sepsis, existen varias enfermedades donde se presenta el SRIS, el cual, al no controlarse debidamente, aumenta porcentaje de riesgo, así como los costos y reduce la esperanza de vida en un 50% durante los primeros 5 años después de haberse presentado (Brun, 2000).

1.1.1.3. Morbilidad y mortalidad relacionados con enfermedades con inflamación crónica

Las enfermedades crónicas, también conocidas como enfermedades no transmisibles (ENT), se originan a partir de la inflamación aguda no resuelta (que se ha prolongado por un largo tiempo) y se caracterizan por progresar lentamente. Según la Organización Mundial de la Salud [OMS] (2015), éstas se clasifican en 4 tipos principales: enfermedades cardiovasculares (infartos y accidentes cerebrovasculares), cáncer, enfermedades respiratorias crónicas (enfermedad pulmonar obstructiva crónica y asma) y diabetes.

Las ENT afectan principalmente países de ingresos bajos y medios, en donde se ha registrado que el 75% (28 millones) de las muertes, son por ENT. Estas enfermedades, están asociadas a grupos de edad avanzada, sin embargo, más de 16 millones de las muertes atribuidas a las ENT, se producen en personas menores de 70 años, en donde, el 82% de estas muertes, ocurren en países de segundo y tercer mundo (OMS, 2003).

Estas enfermedades están asociadas a determinados factores, como el envejecimiento, la urbanización mal planificada y hábitos poco saludables, tales como las dietas malsanas, el tabaquismo y una vida sedentaria (Lim *et al.*, 2014)

Las ENT tienen un impacto económico importante y variable en diversos países. Los países de segundo y tercer mundo, son los más afectados en este rubro. El incremento de la incidencia de estas enfermedades, se cree que frenará el progreso económico y la reducción de la pobreza en los países de ingresos bajos, debido a un incremento en los gastos familiares por atención sanitaria. Así mismo, para el 2020, se

proyecta que las ENT serán la causa de muerte de tres cuartos de la población humana. De estas muertes, se estima que el 60% serán en países en vías de desarrollo, en donde, el 71% será debido a enfermedades isquémicas del corazón, el 75% a ataques cardíacos y el 70% a diabetes (OMS, 2003).

Un nuevo rubro que ha surgido recientemente, corresponde a las enfermedades de tipo autoinmune, las cuales están mediadas por un proceso inflamatorio (IMID, por sus siglas en inglés “immune-mediated inflammatory disease”), se caracterizan por presentar episodios de inflamación crónica (principalmente), aguda (exagerada) o ambas. Este grupo incluye enfermedades como la espondilitis anquilosante, la psoriasis, la artritis psoriática, la artritis reumatoide y la enfermedad del intestino inflamado. Investigaciones recientes han incluido en este grupo de enfermedades inflamatorias del intestino, a la enfermedad de Crohn y a la colitis ulcerativa (Gabalaway *et al.*, 2014). Varios estudios han demostrado que la vida media de las personas que padecen alguna de estas enfermedades, se reduce considerablemente en comparación con el resto de la población que no las padece. Por ejemplo, la esperanza de vida de una persona con artritis reumatoide, (considerada como una de las principales causas de muerte a temprana edad en el mundo), se reduce de 3 a 10 años, dependiendo de la gravedad de la enfermedad y de su grado de avance (Gabriel *et al.*, 2003). Estudios similares postularon que las cuatro principales causas de muerte en la artritis psoriática, son por enfermedades circulatorias en un 36.2%, por enfermedades respiratorias en un 21.3%, neoplasias malignas en un 17% y por daños o envenenamientos en un 14.9%. La proporción estandarizada de mortalidad en Toronto, tuvo un cohorte de 1.50 para la población femenina y un corte de 1.65 para la población masculina, indicando que la proporción de mortalidad aumentaba entre un 59% y 65%. Además, se ha comprobado que el 95% de los pacientes con esta enfermedad mueren de 3.5 a 4.4 años más jóvenes, en comparación con aquellos individuos que no padecen esta enfermedad (Wong *et al.*, 1997). Por otro lado, la muerte por el padecimiento de alguna enfermedad correspondiente al grupo de enfermedades inflamatorias del intestino, es poco común, de hecho, sus niveles de mortalidad han ido disminuyendo considerablemente (Loftus, 2003).

A pesar de que cada una de estas enfermedades tiene una patología y epidemiología únicas, tienen en común el desbalance de citocinas inflamatorias como punto central de su desarrollo (Gabalaway *et al.*, 2014). Varios estudios enfocados a

este tipo de enfermedades, han reportado que existe una importante variación en su incidencia en las diferentes poblaciones. Algunas IMID, como la psoriasis, tienen una prevalencia similar entre hombres y mujeres (Jacobson *et al.*, 1997), se puede presentar a cualquier edad, aunque es más común que el primer brote ocurra entre los 15 y 20 años y el segundo brote entre los 55 y 60 años (Henseler *et al.*, 1985). A diferencia de la psoriasis, otras enfermedades se expresan usualmente en uno u otro sexo, por ejemplo, la artritis reumatoide, tiene una mayor prevalencia en mujeres que en hombres.

De manera general, las IMID suelen afectar más a las poblaciones pertenecientes a países subdesarrollados, con un porcentaje de prevalencia del 0.5% y una media anual de incidencia que va del 0.02% al 0.05%. También se ha encontrado que la población femenina (debido a las hormonas sexuales) se ve más afectada que la población masculina (Castagnetta *et al.*, 2002).

1.1.2. Generalidades de la inflamación

La inflamación es una respuesta benéfica del organismo considerada como inespecífica. Se produce por la presencia de organismos patogénicos, por una alteración en el sistema inmune o por un daño físico y su fin es restaurar la homeostasis. Básicamente consiste en cuatro fases: la primera es el reconocimiento del estímulo inflamatorio, seguido de un incremento de la permeabilidad vascular, después se da la migración leucocitaria al tejido donde se presenta el estímulo inflamatorio y finalmente la resolución de la inflamación (Alessandri *et al.*, 2013).

A pesar de que la inflamación es un mecanismo fisiológico y benéfico principalmente, los procesos implicados en la inflamación no resuelta (crónica), pueden evolucionar y progresar en varias enfermedades, incluyendo el asma, aterosclerosis, artritis reumatoide, rinitis, enfermedad obstructiva pulmonar, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa (Nathan & Ding, 2010) y diversos tipos de cáncer (Mantovani *et al.*, 2008).

1.1.2.1. Tipos de inflamación

La inflamación se divide en aguda o crónica. La inflamación aguda es una respuesta de corta duración que generalmente conduce a la reparación del daño y a la restauración de la homeostasis (Barton, 2008). Se caracteriza por el reclutamiento de leucocitos, principalmente de neutrófilos polimorfonucleares (PMN), seguido de monocitos (los cuales se diferencian localmente en macrófagos), daño en la región, remoción del estímulo inflamatorio y la reparación del tejido (Karin *et al.*, 2006). La inflamación crónica, en cambio, es una respuesta prolongada. Se observa una expresión continua de citocinas y quimiocinas, lo cual conlleva a un incremento en tamaño y peso de los órganos linfoides secundarios, debido a un aumento de la celularidad y del flujo sanguíneo y linfático (Drayton *et al.*, 2006). En ella participan las células mononucleares, principalmente macrófagos. A diferencia de la inflamación aguda, ésta se caracteriza por no estar regulada y por ser una respuesta inadaptada, ya que involucra un proceso inflamatorio activo, lo cual conduce a la destrucción y pérdida progresiva de la estructura (fibrosis) y funcionalidad del órgano o tejido (Weiss, 2008).

1.1.2.2. Mecanismos de la respuesta inflamatoria

1.1.2.2.1. Fase 1. Reconocimiento de daño y detección de patógenos

La inflamación está estrechamente regulada por una cascada de procesos inmunológicos, fisiológicos y etológicos (principalmente hábitos alimenticios), que están dirigidos por moléculas solubles de señalización inmune llamadas citocinas. El primer paso de la cascada inflamatoria es el reconocimiento de un agente patógeno o de una lesión. Esto se logra, en primera instancia, por la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los cuales son moléculas expresadas por patógenos y que son esenciales para la supervivencia de los mismos. En segunda instancia, también se reconocen patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Éstas son moléculas endógenas que se expresan cuando hay daño o necrosis y también son reconocidas por el sistema inmune (fig. 1-A). El objetivo de ambos mecanismos de reconocimiento es minimizar el ataque a las células del hospedero (Arrese *et al.*,

2015). A diferencia de la inmunidad adaptativa, el sistema inmune innato carece de la capacidad de reconocer diferentes cepas patogénicas (McFall, 2007).

Estas señales, PAMPs o DAMPs son reconocidas por receptores codificados en la línea germinal, como los receptores tipo Toll (Toll-like receptor o TLRs) o los receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótido (NOD-like receptor o NLRs), ambos receptores ricos en repeticiones de leucina que presentan un bajo grado de polimorfismo interindividual y reconocen moléculas altamente conservadas de microorganismos (Fernandes *et al.*, 2015).

1.1.2.2.2. Fase 2. Transcripción de mediadores inflamatorios

Una vez que se lleva a cabo el reconocimiento por parte de los macrófagos y mastocitos residentes a través de estos receptores, se activa toda una cascada de señalización en donde se producen mediadores inflamatorios. Los TLRs ponen en marcha una vía común de señalización que lleva a la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B). Éste es un importante factor de transcripción que se encuentra en todos los tipos de células (Gosh *et al.*, 1998). En estado inactivo, el NF- κ B es secuestrado en el citoplasma como un heterodímero que consiste de las subunidades p50, p65 e I κ B. Ante la activación de la subunidad p65 por fosforilación, el NF- κ B se libera de la subunidad I κ B, se transloca al núcleo y se une a secuencias específicas de ADN e induce su transcripción (Ali *et al.*, 2016). La transcripción y traducción de genes, conduce a la tercera fase de la cascada inflamatoria. Uno de los elementos para los cuales transcribe éste factor, son las proteínas quinasas, las cuales están integradas a varias funciones celulares, entre ellas, la división, la diferenciación y la muerte celular (Depamphilis *et al.*, 2012). Un miembro de este grupo es la proteína quinasa C (PKC), responsable de la activación de plaquetas a través de la vía intermediaria del óxido nítrico (NO) y el guanósín monofosfato cíclico (GMPc) (Signorello *et al.*, 2010). La PKC también es un factor importante en el reclutamiento de neutrófilos murinos ya que promueve su adhesión a las paredes de los vasos sanguíneos (Ali *et al.*, 2016). Por otro lado, el NF- κ B también transcribe para proteínas de bajo peso molecular, llamadas citocinas, encargadas de la proliferación y la diferenciación de determinadas células de la respuesta inmune, por ejemplo, la interleucina 2 (IL-2), que induce la proliferación de las células T, así como también la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

(GM-CSF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en macrófagos y granulocitos. Otras citocinas que se producen por esta vía son la IL-1, IL6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) por parte de los macrófagos. Estos factores son responsables de la activación de la respuesta inflamatoria aguda y de proteger las células sanas ante una infección viral. También se ha reportado que la señalización por citocinas induce la diferenciación de células B en células plasmáticas para la producción de anticuerpos (Gosh *et al.*, 1998).

1.1.2.2.3. Fase 3. Cambios en la permeabilidad vascular y migración leucocitaria a los tejidos

En resumen, el efecto principal e inmediato de la actividad conjunta de las citocinas o quimiocinas (compuestos quimioatrayentes) y de varias moléculas coestimuladoras, es generar un exudado local, el cual es rico en proteínas plasmáticas, macrófagos y leucocitos (principalmente neutrófilos). Éstos últimos, normalmente están restringidos a los vasos sanguíneos; sin embargo, durante el proceso inflamatorio, el endotelio activado por las aminas vasoactivas producidos por los mastocitos (histamina), permite su extravasación selectiva y evita a su vez, la salida de los eritrocitos. Dicha selectividad está dada por la unión inducida de las integrinas de los leucocitos con sus ligandos en las células endoteliales, mediado por los receptores de las quimiocinas presentes en los leucocitos. Los neutrófilos se van a adherir a las paredes de los vasos sanguíneos y a los espacios generados entre las células endoteliales (donde se deposita nuevamente proteínas plasmáticas que conforman una matriz provisional para la unión de los leucocitos a las integrinas) por acción del NO (Pober & Sessa, 2007). Cuando los neutrófilos llegan a la zona afectada, se activan por contacto directo con el agente inflamatorio o por la acción de citocinas secretadas por las células residentes (macrófagos y mastocitos), creando un ambiente citotóxico constituido por especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno, proteasas tipo 3, catepsina G y elastasa (fig. 1-B). Estos compuestos son destructivos tanto para los patógenos como para las células del hospedero y esencialmente inducen la licuefacción del tejido rodeado para evitar la metástasis del agente inflamatorio (Nathan, 2002). Por lo tanto, para minimizar los efectos adversos

secundarios que ocasionan estos compuestos, la inflamación debe estar estrictamente regulada.

1.1.2.2.4. Fase 4. Resolución de la inflamación

Una respuesta inflamatoria aguda exitosa, culmina en la eliminación del agente inflamatorio, seguido de una fase de reparación y resolución, la cual es crítica, ya que reduce los daños colaterales que se generan en el organismo (Serhan & Savill, 2005). Después de algunas horas de haberse desencadenado la respuesta inflamatoria, un programa coordinado de resolución se pone en marcha en el tejido afectado. Este sistema incluye el reclutamiento de macrófagos y monocitos, que son las principales células que llevan a cabo esta última fase de la inflamación. Existen algunos otros mecanismos que favorecen la recuperación de la homeostasis, como es la apoptosis de neutrófilos (fig. 1-C).

1.1.2.2.4.1. Restauración de la homeostasis y reparación tisular a partir de neutrófilos

Los neutrófilos, por sí mismos, pueden producir señales que activan diversas vías para disminuir sus números en el tejido afectado. Una vía, involucra la liberación de anexina A1 (liberada por macrófagos y neutrófilos apoptóticos), que lleva a cabo la regulación negativa de su migración transendotelial (Perretti & D'Aquisto, 2009) y promoción de su apoptosis (Perretti *et al.*, 1996), actuando sobre los macrófagos, promoviendo la fagocitosis y remoción de neutrófilos muertos (Scannel *et al.*, 2007). A su vez, durante la apoptosis se libera lactoferrina producida *de novo* por células apoptóticas de diversos linajes celulares. Esta glicoproteína de 80 kDa inhibe específicamente el reclutamiento de neutrófilos pero no de células mononucleares fagocíticas (Bournazou *et al.*, 2009).

Finalmente, uno de los mecanismos más eficientes, es la regulación de la granulopoyesis (proceso que permite la generación de los neutrófilos, basófilos y eosinófilos). Este mecanismo sugiere que la granulopoyesis dirigida por la cascada de citocinas comienza con la secreción de IL-23. IL-23, promueve la producción de IL-

17 a partir de células T, generando un incremento en los niveles de G-CSF y el reclutamiento de neutrófilos. Sin embargo, los neutrófilos apoptóticos que son fagocitados por macrófagos, conduce a una regulación negativa en la secreción de IL-23. Generando como consecuencia, disminución en la producción de IL-17 y de G-CSF (Stark *et al.*, 2005).

A su vez, la fagocitosis de neutrófilos muertos puede estimular a los macrófagos, a liberar mediadores que suprimen la respuesta inflamatoria. Estudios recientes han demostrado que la incubación de monocitos activados por lipopolisacáridos (LPS) con linfocitos apoptóticos, disminuye los niveles de TNF- α , incrementado a su vez, la producción de citocinas antiinflamatorias, factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) e IL-10 (Fadok *et al.*, 1998).

Por otro lado, la lipoxina 4A es otro mediador que se produce durante este proceso de reparación tisular y funcional. Esta, puede inducir la producción de TGF- β en exudados que promueven la resolución de la inflamación y la fibrosis en tejidos (Soehnle & Lindbom, 2010).

1.1.2.2.4.1. Restauración de la homeostasis y reparación tisular a partir de macrófagos

Hay que recordar, que durante la inflamación aguda, estas células producen prostaglandinas proinflamatorias y leucotrienos, pero durante la restauración de la homeostasis, cambian rápidamente a la producción de lipoxinas, las cuales presentan actividad antiinflamatoria, bloqueando el reclutamiento de neutrófilos y favoreciendo la infiltración de monocitos, que son las células responsables de remover las células muertas y de la remodelación del tejido (Serhan & Savill, 2005). Las resolvinas y las protectinas, las cuales constituyen otra clase de mediadores lipídicos, así como el TGF- β y los factores de crecimiento producidos por los macrófagos, también tienen un papel importante en la resolución de la inflamación, incluyendo la iniciación de la reparación tisular (Soehnle & Lindbom., 2010).

La fagocitosis de células muertas no sólo protege a los macrófagos de ser atacados por las células asesinas naturales (Natural killers o NK) que residen en el tejido, sino que también activa la producción del factor de crecimiento de los vasos

endoteliales (VEGF, por sus siglas en inglés: Vascular Endothelial Growth Factor), otro factor de crecimiento que es crucial para la generación de vasos sanguíneos *de novo* en este proceso de reparación (fig.1-C). Sin embargo, a pesar de que la liberación de TGF- β , IL-10 y prostaglandinas tipo 2 (PGE₂) contribuyen a restaurar la homeostasis, también merman la eficiencia de los mecanismos antibacteriales y promueve la persistencia de parásitos debido a una cierta inmunosupresión (Freire de Lima *et al.*, 2000). Por lo tanto, regular el proceso de reparación es importante en el sentido de que si la resolución de la inflamación ocurre rápido, se puede prolongar la infección microbiana (Soehnle & Lindbom, 2010).

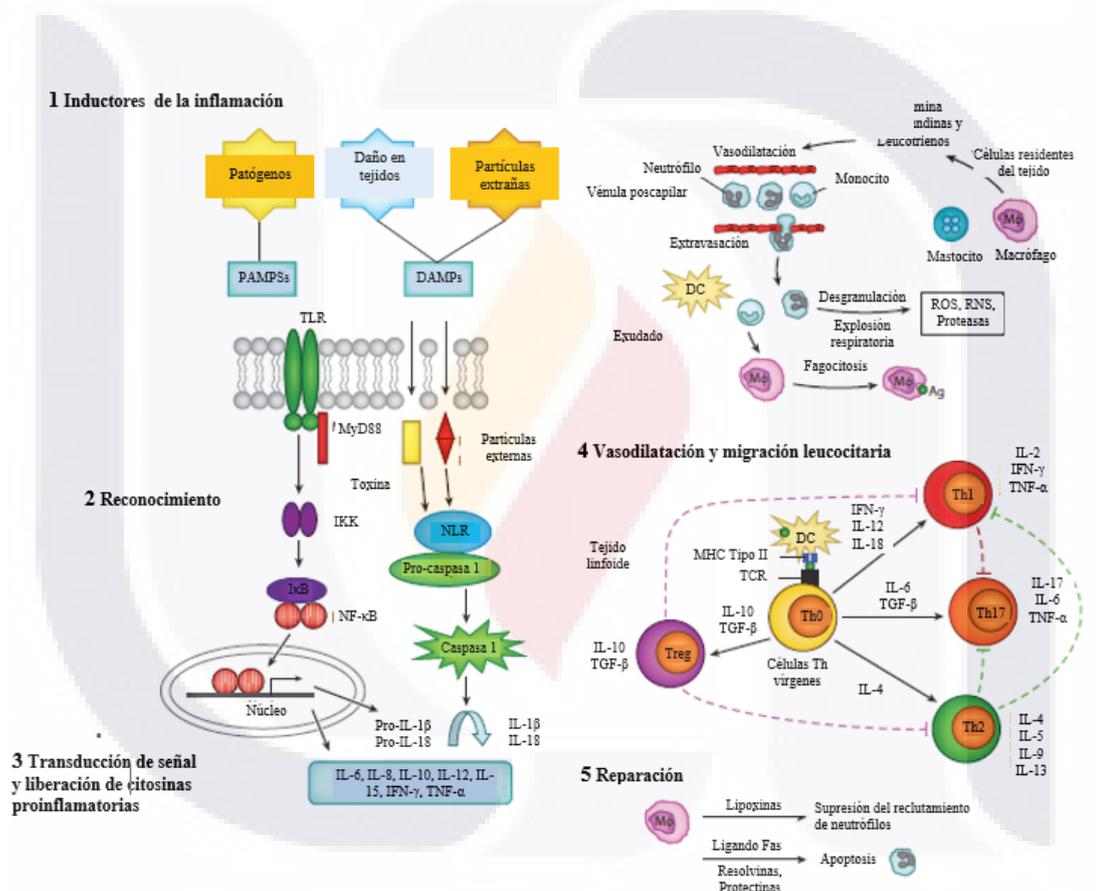


FIGURA 1. En esta figura se muestran los 4 pasos de la inflamación: reconocimiento de daño, transcripción de mediadores de la inflamación, vasodilatación y migración leucocitaria y reparación (Ashley *et al.*, 2012).

1.1.3. Progresión de inflamación aguda a crónica

La inflamación, en algunas ocasiones puede progresar de aguda a crónica cuando esta no se resuelve y se prolonga por un largo periodo de tiempo, sin embargo, algunos signos de la inflamación aguda, como la acumulación de neutrófilos, pueden reaparecer. Un considerable número de enfermedades involucra a la inflamación no resuelta, que aparenta ser crónica desde el comienzo. En dicho caso, los signos celulares de la inflamación que se ven involucrados, es la infiltración de monocitos, células dendríticas y macrófagos al tejido (Nathan & Ding, 2010).

Se ha demostrado que la inflamación aguda y crónica coexisten por periodos prolongados de tiempo, implicando una continua reiniciación. Algunas enfermedades que ejemplifican este fenómeno, son la artritis reumatoide, el asma, la esclerosis múltiple y algunos tipos de cáncer. Por ejemplo, en el caso de la artritis reumatoide, en el espacio sinovial se muestran rasgos impresionantes de inflamación crónica, con un infiltrado compuesto por macrófagos y linfocitos, en conjunta activación de sinoviocitos. En contraste, el fluido sinovial está repleto de neutrófilos (Balkwill & Mantovani, 2011).

La reparación exitosa postinflamatoria de un tejido, necesita de una restauración coordinada de diferentes tipos de células y estructuras en donde no sólo se restituyen células epiteliales y mesenquiales, sino también la matriz extracelular y la vasculatura (Strieter *et al.*, 2007). Sin una apropiada restitución de la vasculatura, la oxigenación del tejido se ve alterada, lo cual interfiere con una reparación normal, lo que resulta en una atrofia (pérdida de células del parénquima). La atrofia, siempre va acompañada de una expansión de los elementos que constituyen el tejido extracelular, particularmente colágeno, resultando en una fibrosis, es decir, una deposición de tejido conectivo en exceso. Claramente, en ocasiones la atrofia puede promover la fibrosis y viceversa, pero también cada una puede ocurrir de manera independiente (Nathan & Ding, 2010).

La interferencia funcional de un órgano por fibrosis, es uno de los mayores problemas médicos. Tal interferencia se da, por ejemplo, después de la inflamación de arterias causada por la acumulación de colesterol, la inflamación del hígado (por virus, alcohol, toxinas o infecciones), la inflamación de pulmones asociada al asma, entre otras, y las cuales se resuelven generalmente con cirugía. La fibrosis aumenta por un

incremento del número, así como de la actividad y tiempo de vida de ciertas células, como los fibroblastos activados productores de colágeno, células epiteliales que cambian su fenotipo a células mesenquimales, células hepáticas que generan miofibroblastos, y fibrocitos derivados de la médula ósea roja, que entran y afectan al órgano desde la circulación. Existen varias quimiocinas que atraen a los fibrocitos hasta el sitio de la inflamación, en donde el TGF- β promueve su diferenciación (Abe *et al.*, 2001). Los factores que dirigen la apoptosis de las células productoras de colágeno son muy importantes en el proceso de la resolución de la inflamación (Nathan & Ding, 2010).

Entre las citocinas que juegan un papel importante en promover la fibrosis se incluyen el TGF- β , IL-13, IL-4, IL-6 e IL-21. Ya sea de manera directa o a través de la influencia de la expresión de quimiocinas, estas citocinas pueden reclutar y aumentar la proliferación de fibrocitos, fibroblastos y miofibroblastos, además de estimular su producción de colágeno (Wilson & Wynn, 2009). La IL-4 induce a los macrófagos a expresar TGF- β , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y arginasa. La ornitina, un producto de la arginasa, es una fuente de prolina e hidroxiprolina, que en conjunto representan al menos un cuarto de los residuos de arginina. La actividad del TGF- β es regulada transicionalmente por la liberación de una proteína en estado de latencia asociado generalmente con la proteólisis. Por esta y otras razones, es esencial mantener el balance entre las proteasas y anti proteasas (las cuales están reguladas por intermediarios reactivos de oxígeno, o ROI), que pueden disminuir la fibrosis e inflamación. El TGF- β induce a las células mesenquimales a expresar nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (4NADPH oxidasa 4), una coenzima que interviene en numerosas vías anabólicas y cuya producción de mediadores ROI, impulsa la diferenciación de miofibroblastos dependientes de TGF- β y la producción de matriz extracelular (ECM) (Hecker *et al.*, 2009). La IL-13 promueve tanto la producción de TGF- β por macrófagos, así como la activación de la proteólisis, aunque también es capaz de promover la fibrosis independientemente de la vía de señalización TGF- β /Smad. La angiotensina II, derivada de los macrófagos y fibroblastos, es otro estímulo profibrótico que funciona en parte, al incrementar los niveles de TGF- β . La regulación del TGF- β es controlada por la expresión de proteínas de la matriz extracelular que lo mantienen en un estado inactivo. Los antagonistas

endógenos de la fibrosis incluyen al interferón gama (INF- γ), IL-12, IL-10 y finalmente IL-13 α R2, como receptores señuelo (Nathan & Ding, 2010).

En resumen, el tejido que está en un proceso de restauración, tiene características en común con un tejido en desarrollo. El tejido en proceso de restauración requiere de un retroceso de los elementos preexistentes en el tejido mismo. Sin embargo, diversos factores interfieren cuando el tejido preexistente ha sido dañado y se encuentra bajo un proceso inflamatorio. No sólo se trata de la expresión o disminución de la expresión de determinados mediadores considerados como críticos, sino también de la organización de su sucesión (Nathan & Ding, 2010).

1.1.3.1. Inflamación crónica ligada a una respuesta subnormal

Como ya se mencionó en la sección anterior, cualquier factor molecular puede provocar un retraso en la resolución de la inflamación cuando este se produce por mucho tiempo y en altos niveles.

La producción excesiva de ROIs juega un papel muy importante en la patogénesis de varias enfermedades de tipo crónico o autoinmunes y sus mecanismos son muy variados. Por ejemplo, en las enfermedades granulomatosas crónicas, las células espumosas que se generan por la endocitosis y acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas, terminan por promover el progreso de la enfermedad (Russel *et al.*, 2009).

Las ROIs se producen a partir de tres fuentes intracelulares: en la cadena transportadora de electrones que se encuentra en la mitocondria, en el retículo endoplásmico y por la NAPDH oxidasa.

Un mecanismo por el cual las ROIs promueven la inflamación, es mediante la producción de 4-OH-trans-2-nonenal, un lípido aldehído que activa el canal iónico proinflamatorio (TRPA1). El 4-OH-trans-2-nonenal también reacciona con el glutatión, mientras que la aldosa reductasa actúa sobre el aducto, generando glutatiónil-1,4-dihydroxynonane, el cual tiene la capacidad de estimular la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-6, y quimiocinas en los macrófagos (Yadav *et al.*, 2009). Los macrófagos acumulan adipocitos necrosados. Las citoquinas inflamatorias que surgen

en tejido adiposo visceral, al circular afectan negativamente a otros tejidos, entre ellos el tejido vascular y nervioso, donde se regula el apetito (Nathan, 2008).

1.3.1.2. Inflamación crónica ligada a una respuesta por debajo de lo normal

Una respuesta inflamatoria por debajo de lo normal puede engendrar una respuesta prolongada. Hay tres ejemplos representativos que ilustran este efecto: la enfermedad de Crohn, cuya base genética aún se desconoce en la mayoría de los casos; la enfermedad granulomatosa crónica (CGD), causada por la deficiencia genética en NADPH oxidasa; y la influenza de tipo A en ratones, con una deficiencia en la generación de IL1- β e IL-18 (Nathan & Ding, 2010).

En la enfermedad de Crohn se ha sugerido que un defecto fundamental en los macrófagos de pacientes con esta enfermedad (con o sin mutaciones NOD2), puede llevar a una dirección errónea de determinadas citocinas, que abarca desde las vías de secreción hasta la degradación lisosomal (Smith *et al.*, 2009). La incapacidad de los macrófagos para liberar citocinas quimioatrayentes de neutrófilos, cuando se enfrentan a un gran número de bacterias intestinales, conduce a una migración deficiente de neutrófilos en los sitios de penetración bacteriana en la mucosa del intestino, lo cual conlleva a un estímulo inflamatorio más fuerte. Por lo tanto, en estas circunstancias patológicas, la inflamación subclínica se hace recurrente, crónica y patológica (Nathan & Ding, 2010).

En la CGD, un defecto en el estallido respiratorio de neutrófilos, monocitos y macrófagos, conlleva a una infección persistente y se transforma posteriormente en inflamación granulomatosa. Tanto en la enfermedad de Crohn como en la CGD, la relación entre la infección y la inflamación no resuelta, es más compleja, ya que los granulomas (acumulaciones nodulares de los fagocitos y linfocitos, con o sin un reborde fibroso) suelen ser microbiológicamente estériles. Por otro lado, también está claro que además del exceso de ROI, la deficiencia de los mismos también contribuye a la inflamación crónica, aun cuando no hay infección. En un modelo de CGD en ratón, esto fue demostrado por una respuesta inflamatoria no resuelta para productos microbianos no viables (Morgenstern *et al.*, 1997). Algunos mecanismos

antinflamatorios de ROI, han sido identificados recientemente. ROI activa al factor de transcripción Nrf2. Las enzimas dependientes de la regulación positiva de Nrf2, sintetizan glutatión (tripéptido antioxidante), que es esencial para la resolución de la inflamación y la reparación de tejido dañado (Reddy *et al.*, 2009). Las ROI oxidan el colesterol a una forma que activa los receptores X del hígado (LXR), los cuales se heterodimerizan con el receptor retinoide X (RXR), lo que genera un bloqueo de la expresión de la ciclooxigenasa tipo 2 (COX2), de la óxido nítrico sintasa (iNOS), y de la IL-6. Por otro lado, la NADPH oxidasa, es un cofactor para la enzima indolamina dioxigenasa (productora de quinurenina), la cual se ha demostrado ser esencial para la disminución de la producción de IL-17 y la inflamación (Romani *et al.*, 2008).

Finalmente, se ha confirmado que los ratones que carecen NLRP3 o caspasa 1, son deficientes en la producción de IL-1 β e IL-18, en respuesta al virus que ocasiona la influenza tipo A y por lo tanto, son más lentos para reclutar neutrófilos y monocitos en el pulmón, produciendo cantidades más bajas de TNF- α y IL-6, en comparación con la cepa control. En este estudio, se observó que a pesar de que estos ratones lograron controlar el virus al igual que los ratones control, sufrieron necrosis epitelial, desarrollaron fibrosis y aumentó el índice de mortalidad (Thomas *et al.*, 2009).

1.1.4. Modelos de inflamación

Para el comprender los mecanismos de la inflamación y la generación de nuevos tratamientos, se han diseñado diversos modelos experimentales *in vivo*. Por 80 años, se han utilizado animales para el desarrollo de modelos con el fin de estudiar enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Con el tiempo, se ha llegado a la conclusión de que, a pesar de que el uso de modelos semejantes es importante y necesario para entender las enfermedades humanas, es inevitable que exhiban diferencias significativas con éstas mismas (Webb, 2013). Sin embargo, dichos modelos siguen siendo indispensables para el desarrollo de estrategias terapéuticas y el descubrimiento de tratamientos para tratar patologías humanas con carácter de urgencia, como sería la inflamación (Inagaki & Nagai, 2009).

Un modelo ampliamente utilizado para evaluar el efecto antiinflamatorio de determinados compuestos sobre la respuesta inflamatoria aguda, es el de inducción de edema plantar por inyección de carragenina, el cual fue desarrollado por Winter y

colaboradores en el año de 1962 tanto en rata como en ratón. La carragenina, carragenano o también conocido como carragenanos (CA), es una mezcla de varios polisacáridos compuestos por secuencias de monómeros de galactosa que se encuentra rellenando los huecos en la estructura de celulosa de las paredes celulares de algunas algas de varias familias de *Rhodophyceae* (algas rojas). La especie de alga de la cual se suele producir la carragenina en primera instancia, es la especie *Chondrus crispus*, también conocida como "musgo irlandés", es de pequeño tamaño, y vive en aguas frías, estando distribuida en las costas del Atlántico Norte (Luo *et al.*, 2010).

Los signos cardinales en la inflamación producida por la CA, son edema, hiperalgesia y eritema. El proceso inflamatorio se desarrolla inmediatamente después de la inyección subcutánea, lo que resulta de la acción de agentes proinflamatorios como la bradicinina, histamina, taquicininas, complementada por especies reactivas del oxígeno y de nitrógeno. Tales agentes se ha visto que se pueden generar *in situ*, en el sitio de contacto o por células infiltradas. En este modelo, los neutrófilos migran fácilmente a los sitios de inflamación, generando inmediatamente, agentes proinflamatorios, inicialmente ROIs y especies reactivas de nitrógeno. La respuesta inflamatoria de este modelo, se cuantifica normalmente por aumento en el grosor de la zona plantar de la pata (edema), el cual es máximo alrededor de 5 h después de la inyección de carragenina. A su vez, la inflamación se encuentra modulada por moléculas inhibitoras específicas dentro de la cascada inflamatoria. El fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), indometacina, es un ejemplo clínicamente útil para evaluar la acción de diferentes fármacos en desarrollo dentro de este modelo (Morris, 2003).

Otro modelo de inflamación, que ha sido utilizado para evaluar el efecto antiinflamatorio de determinados compuestos en la inflamación de tipo crónica, es el de inducción de granuloma por una pastilla de algodón estéril. Este modelo fue desarrollado por primera vez por Winter y Porter en el año de 1975. Establecieron que el incremento en el peso seco de las pastillas de algodón es considerado como una medida de la formación del granuloma. En el desarrollo del granuloma, la formación de pequeños vasos sanguíneos, así como la proliferación de fibroblastos, son algunas características distintivas de esta patología, ya que son los procesos de la fase de reparación en la inflamación crónica. Dicha proliferación de células penetra en el exudado, produciendo de esta manera una masa rojiza altamente vascularizada

conocida como tejido de granulación (Swingle, 1974). Generalmente, en este modelo se propone que cuando un compuesto de prueba reduce significativamente la formación del granuloma (representado por la diferencia del peso seco del granuloma menos el peso de la pastilla), esto sugiere que su actividad antiinflamatoria reside principalmente en la fase proliferativa del proceso inflamatorio (Panda *et al.*, 2011).

Independientemente del tipo de granuloma, es sólo cuestión de segundos o minutos después de que un organismo se ha expuesto a un antígeno (Ag), para que las células residentes inicien el reclutamiento celular. En este proceso, el TNF almacenado es liberado por los mastocitos. Este factor se encarga de reclutar neutrófilos, que en torno a la señal activan los monocitos circulantes. El IFN- γ es producido por las células asesinas naturales (NK) que se encuentran en la zona. Por otro lado, las células T $\gamma\delta$ activan más histiocitos tisulares residentes y las células dendríticas. Estas últimas células, liberan una serie de quimiocinas y TNF, que alteran el medio ambiente de la microcirculación local y facilitan el tráfico celular en el tejido. Pasados unos minutos o incluso horas, las células dendríticas cargadas con el Ag activadas migran a los ganglios linfáticos periféricos a través de los canales linfáticos. Enseguida, se ha observado que las células dendríticas cargadas con Ag viajan a los ganglios linfáticos locales e inician una respuesta linfocítica. Las células dendríticas producen IL-12 y presentan el Ag a las células T CD4⁺ vírgenes. Bajo la influencia de la IL-12, las células vírgenes CD4⁺ se diferencian en células cooperadoras Th1. Las células Th1 CD4⁺ activadas secretan IL-2, la cual promueve la supervivencia de las células T y la proliferación, lo que conduce a la expansión de la población de células Th1 específicas de Ag. En cuestión de horas o días después de la exposición al Ag, células Th1 CD4⁺ activas se movilizan de manera preferencial a sitios en los que la microcirculación ha sido alterada por el TNF y quimiocinas producidas por células residentes. Si la fuente de Ag no se erradica, la inflamación persiste. La interacción entre las células Th1 CD4⁺ y macrófagos activados conduce a la producción de IFN- γ y TNF, lo que resulta en mayor maduración de los macrófagos. En el transcurso de varios días a semanas se forma un granuloma maduro (fig. 2). Otras células, incluyendo, neutrófilos y las células B, se encuentran en diferentes proporciones en el granuloma maduro (Sneller, 2000).

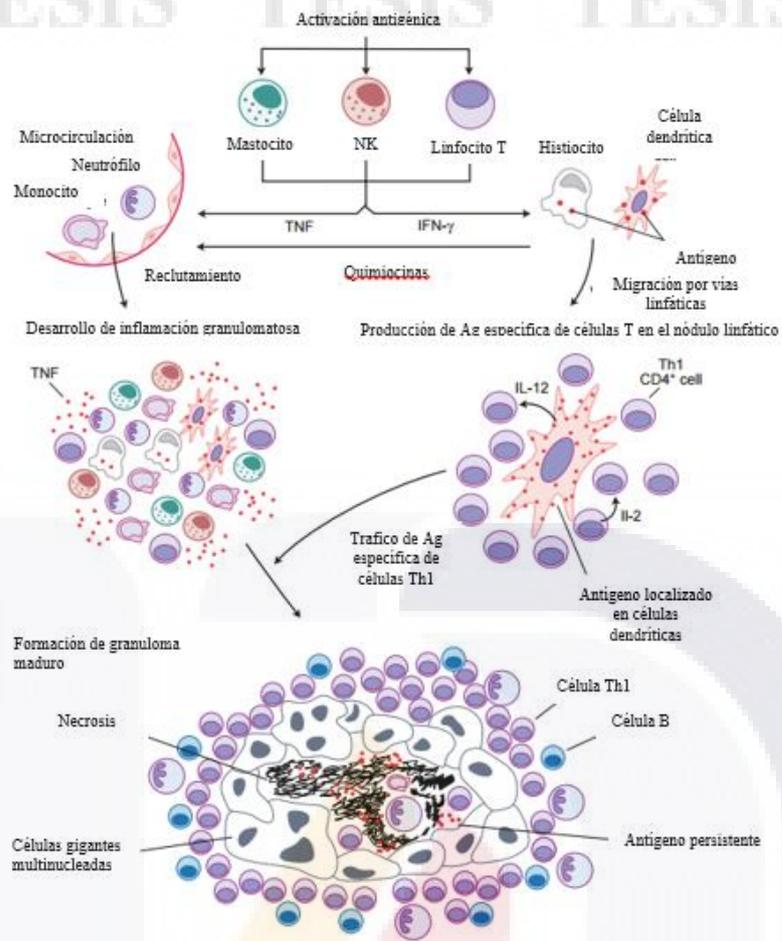


FIGURA 2. Fases que conforman el proceso de formación de un granuloma (Sneller, 2000).

Un aspecto importante en esta patología, es que la fibrosis en cantidades considerables puede diferenciarse perfectamente en el granuloma y se denomina sarcoidosis. Esta enfermedad afecta principalmente al pulmón, ganglios linfáticos, piel, conjuntiva, riñón, entre otros. En otros casos se pueden formar espacios con gas; también pueden aparecer cristales de ácido úrico, que se depositan formando el granuloma y se da por ejemplo la enfermedad de la gota. Desafortunadamente, hay tantas formas atípicas de los granulomas que siempre es necesario identificar el agente patógeno por otros métodos como las tinciones específicas, los cultivos celulares, por técnicas moleculares (PCR) o por estudios serológicos.

1.1.5. Terapias antiinflamatorias

Actualmente, los fármacos que se emplean para tratar la inflamación se dividen en tres categorías: los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), los antiinflamatorios esteroideos (glucocorticoides) y los inhibidores de la calcineurina.

Los AINEs, selectivos y no selectivos de la COX-1 y -2, son un grupo variado con propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas, por lo que se usan para atenuar los síntomas de la inflamación, el dolor y la fiebre respectivamente. Todos ejercen sus efectos por acción de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa, sin embargo, los efectos biológicos de estos compuestos, pueden diferir, dependiendo del grado de selectividad que presenten para las dos isoenzimas (COX-1 y COX-2), de la variación que exhiben en la distribución en los tejidos y de las enzimas que convierten la prostaglandina H₂ (PGH₂) en prostanoides específicos.

Los glucocorticoides, por otro lado, al unirse a su receptor en el citoplasma, provoca que este se dimerice y se transloque al núcleo, en donde se une a secuencias específicas de ADN y da como resultado, un incremento en la expresión de genes que transcriben mediadores con actividad antiinflamatoria (Barnes, 1998). También se ha postulado que presenta una acción inhibitoria de determinadas citocinas y quimiocinas proinflamatorias, como la IL-1 β , TNF- α , G-CSF, IL-4, IL-5, IL-8 y eotaxina (citocina quimiotáctica de neutrófilos) (Payne & Adcock, 2001).

Los inhibidores de la calcineurina, como su nombre lo indica, inhiben a la calcineurina, que es una serina-treonina-fosfatasa dependiente del calcio y de la calmodulina, que regula positivamente las vías de transducción de señales en los linfocitos T. Estimula la expresión de genes que transcriben para diversas citocinas dependientes del factor nuclear de las células T activadas (NF-AT), entre las que se encuentran la IL-2, IL-3, IL-4 e IL-5, el GM-CSF, el TNF- α y el interferón gamma. Un ejemplo de estos compuestos, es la ciclosporina, la cual es un inmunomodulador de amplio uso, para prevenir el rechazo de trasplantes (Fonseca, 2002).

Desafortunadamente, el elevado precio de estos fármacos, en especial los inhibidores de la calcineurina, son un factor limitante para su utilización, sobre todo en tratamientos prolongados; sin mencionar que aún deben realizarse estudios de farmacovigilancia a largo plazo, para descartar un posible efecto carcinogénico (Reitao *et al.*, 2002)

Los costos de drogas antiinflamatorias (principalmente los AINEs), actualmente se estima en 5.8 billones de dólares por año en todo el mundo. El mayor consumo de estos fármacos se da en USA, con 1.8 billones de dólares. Sin embargo, todas estas drogas, principalmente los AINEs y los glucocorticoides, se ha demostrado que presentan efectos tóxicos, principalmente en el estómago y en el tracto gastrointestinal (Henry *et al.*, 1996; Lau *et al.*, 2004). También se ha postulado que los glucocorticoides están asociados a alteraciones en el sistema nervioso central, ocasionado efectos adversos a nivel psicológico, tanto en aspectos cognitivos, como de comportamiento (Judd *et al.*, 2014).

Un estimado del 34% al 46% de los pacientes tratados con AINEs, se ha visto que muestran efectos adversos en el tracto gastrointestinal. En USA, al menos 100,000 pacientes que toman AINEs, son hospitalizados al año, en donde el cuadro clínico menciona úlceras graves, perforaciones y sangrado estomacal (Fries, 1996). El 15% de estos pacientes muere en cuidados intensivos. Sin embargo, hay que mencionar que estas hospitalizaciones corresponden a casos de irritación gástrica extrema. Incluso el ibuprofeno, es considerado como un medicamento que ocasiona irritación en el tracto gastrointestinal, ocasionando efectos adversos considerables en los pacientes (Vane, 2000).

Debido a esto, hay una urgente necesidad de encontrar nuevos compuestos con actividad antiinflamatoria que no ocasionen efectos adversos de tal magnitud, como es el acetato de leuprolida (AL).

1.2.1. Acetato de leuprolida

El AL, es un nanopéptido sintético de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Este análogo sintético posee un mayor potencial que la hormona natural. Su nombre químico es 5-oxo-L-prolil-L-histidil-L-triptofil-L-seril-L-tirosil-D-leucil-L-leucil-L-arginil-N-Etil-L-Acetato de prolinamida (sal), el cual tiene la siguiente estructura (Chrisp & Sorkin, 1991) (fig.3):

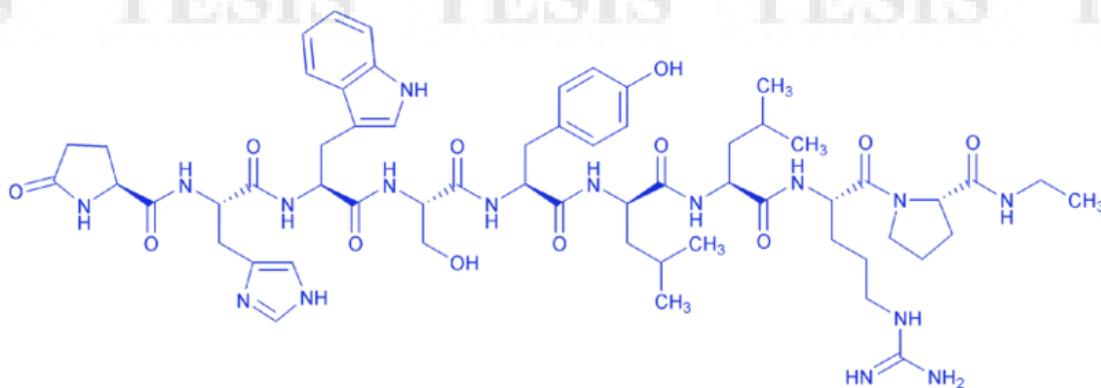


FIGURA 3. Estructura molecular del AL (Wilson *et al.*, 2007).

El AL presenta diversas aplicaciones clínicas, por ejemplo, se emplea como tratamiento para el cáncer de próstata, la endometriosis, la fibrosis uterina, la pubertad precoz central y la fertilización *in vitro*. Su mecanismo básico de acción, consiste en suprimir la secreción la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) por parte de las células gonadotropas y consecuentemente la secreción de esteroides sexuales. Aunado a esto, el AL también está siendo probado como un posible tratamiento para la enfermedad del alzheimer, el síndrome ovárico poliquístico, la enfermedad funcional del intestino, para la corta estatura, el síndrome premenstrual e incluso como un anticonceptivo alternativo. Una gran cantidad de evidencia sugiere que la supresión de gonadotropinas por parte del AL, podría ser la pieza clave para tratar las enfermedades mencionadas anteriormente. Además, la presencia de receptores de la GnRH (GnRHR) en una gran cantidad de tejidos no reproductivos, incluyendo su expresión en el hipocampo y en la corteza del cerebro humano, indica que los análogos de la GnRH, como el AL, podrían estar actuando directamente sobre los GnRHR, modulando de esta manera, su función. Así mismo, los mecanismos moleculares fundamentales que median el efecto terapéutico del AL en estas enfermedades, podría ser más complejo de lo que originalmente se habría pensado, lo que sugiere que aún hace falta llevar a cabo más investigaciones para analizar su efecto en los distintos tejidos (Wilson *et al.*, 2007).

En estudios recientes, se ha encontrado que la GnRH y su análogo (AL) presentan una actividad inmunomoduladora en enfermedades tales como la endometriosis, en la cual participa principalmente un proceso inflamatorio (Bayoglu *et al.*, 2015). Entre estos análogos de la GnRH, el AL es de especial interés en el presente

estudio para determinar un posible efecto antiinflamatorio en los procesos de inflamación aguda e inflamación de tipo crónica.

En un estudio llevado a cabo por Guzmán y col. (2012), se encontró que el tratamiento con AL reduce la severidad de los signos clínicos de la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE), mejora la locomoción de los animales, induce significativamente una mayor ganancia de peso corporal, aumenta la expresión de MBP (Proteínas Básicas de Mielina) y NFS (Proteínas que conforman los Neurofilamentos). Además incrementa el área axonal e infiltración celular en animales con EAE, el cual es un modelo para simular la esclerosis múltiple. Estos resultados sugieren el uso de este agonista como un enfoque terapéutico potencial para enfermedades de tipo autoinmune y en las cuales se presenta un proceso inflamatorio (Wilson *et al.*, 2007)

Estos estudios mencionan por primera vez que el tratamiento con AL podría inducir un efecto inmunomodulador. Se llegó a esta conclusión por medio de un análisis de la infiltración celular en la médula espinal de animales con EAE. Los resultados de dicho estudio mostraron que el tratamiento con AL aumenta el número de células infiltradas en la médula espinal aunque los signos clínicos disminuyen progresivamente (Guzmán *et al.*, 2012). Es posible que algunas de las células infiltradas corresponden a las células T reguladoras, sin embargo, si se hace mención de la presencia de células microgliales. En otros estudios se ha informado que la recuperación natural en ratas Lewis con EAE se caracteriza por una marcada disminución de Th1 y un aumento importante en las células T reguladoras que inducen una mejora de la actividad locomotora (Almolda *et al.*, 2011).

1.2.1.2. Propiedades fundamentales farmacocinéticas del acetato del leuprolida

El AL se administra preferentemente por vía subcutánea o IM, ya que por VO se degrada casi en su totalidad antes de pasar al torrente sanguíneo. El AL administrado por vía subcutánea o por vía IM se absorbe rápida y completamente con una biodisponibilidad del 94%. Después de una inyección IM, los niveles máximos se alcanzan a las 4 horas. En el caso de inyección con AL contenido en microesferas, cada semana se absorbe entre el 20 y el 25% de la dosis administrada. Una vez

absorbido el AL, este compuesto se encuentra en elevadas concentraciones en el hígado, la glándula pineal, los riñones y la hipófisis. Además, se ha reportado que la unión a las proteínas plasmáticas del ser humano "*in vitro*" es del 43-49% (Okada *et al.*, 1991).

1.2.1.3. Metabolismo

Aún no hay estudios suficientes acerca del metabolismo del AL, sin embargo, en un estudio llevado a cabo por Chrisp y Sorkin (1991), se observó que en varones sanos un bolo de 1 mg de AL, administrado en forma intravenosa (IV), reveló que la depuración sistémica media fue 7.6 L/h con una eliminación terminal de vida media de aproximadamente tres horas basado en un modelo de doble compartimento.

Estudios en animales han demostrado que el AL marcado con C₁₄, era metabolizado en un péptido inactivo menor, un pentapéptido (metabolito I), tripéptidos (metabolitos II y III) y un dipéptido (metabolito IV). Estos fragmentos pueden ser metabolizados posteriormente (Akaza *et al.*, 1990).

Las concentraciones plasmáticas de metabolito mayor (M-I) medidas en cinco pacientes con cáncer de próstata a los que se les dio AL, alcanzaron una concentración máxima dos a seis horas después de la dosis y fueron aproximadamente 6% de la concentración pico de droga madre. Una semana después de la dosis, las concentraciones medias plasmáticas M-I fueron aproximadamente 20% de las concentraciones medias del AL (Chrisp & Sorkin, 1991). Después de la administración de 3.75 mg de AL a tres pacientes, menos del 5% de la dosis fue recuperada como metabolito M-I y droga madre en la orina en 27 días (Akaza *et al.*, 1990).

Además, al igual que la GnRH, el AL es metabolizado en la glándula pituitaria anterior y en el hipotálamo. La diferencia entre el precursor original y el AL, radica en que la vida media de éste último es de 3 horas en comparación con GnRH que es de 3 a 5 minutos, debido a que resiste más la degradación llevada a cabo por parte de las endopeptidasas, sin mencionar que por su estructura molecular, el AL también presenta una mayor afinidad por los receptores de la GnRH (Chrisp & Sorkin, 1991).

2. ANTECEDENTES

El acetato de AL, considerado como un fármaco muy seguro y tolerable, se ha utilizado en diversas prácticas clínicas, entre ellas, la endometriosis, la fibrosis uterina, el alzheimer y la esclerosis múltiple, que tienen en común un proceso inflamatorio (Guzmán *et al.*, 2012).

La GnRH, tiene un papel inmunomodulador, en el cual participa en la modulación de las funciones de los macrófagos, ya que es capaz de inducir un incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} en macrófagos murinos de cavidad peritoneal, de inhibir la producción de NO e $INF-\gamma$ (producto de la exposición a LPS). También se reportó que los niveles de $I\kappa\beta$ (proteína que inhibe la activación del NF- κ B) que se veían disminuidos significativamente por LPS/ $INF-\gamma$, se recuperaban al incubar los macrófagos murinos con GnRH. Por lo tanto, al incrementar los niveles séricos del $I\kappa\beta$, automáticamente se veían disminuidos los niveles de expresión de NF- κ B. Este último mecanismo se ha postulado que podría ser una pieza central para explicar los efectos inmunomoduladores que presenta la GnRH y su análogo, el AL (Min *et al.*, 2009).

Para probar si los agonistas de la GnRH podían afectar *in vivo* las células del sistema inmune, Ho y colaboradores (1995), trataron a un grupo de pacientes infértiles con acetato de buserelina y analizaron células del sistema inmune y su efecto sobre el éxito de la gestación tras la implantación de embriones. A través de la técnica de citometría de flujo observaron que el agonista de la GnRH tenía un efecto inmunosupresor de forma transitoria en células CD4 +, CD25 + y CD69 +. Mientras que las células CD25 + y las células HLA-DR + T se activaron durante y después de la implantación exitosa. En cuanto a las células B, las células NK, las células T CD8 +, y las subpoblaciones de linfocitos T CD71 + no se encontraron cambios a lo largo de todo el curso del tratamiento. Ellos sugieren que la administración continua del agonista de la GnRH puede ocasionar una desensibilización de los receptores de la GnRH que se encuentran en las células del sistema inmune, dando como resultado, una regulación negativa de estos receptores y por lo tanto, una inmunosupresión.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Rao y colaboradores (1993) reportaron que en ratones a los cuales se les inyectaba 50 µg de AL vía IM (del cual se liberaba el 2.5% de las dosis a partir de microesferas, por día), el análisis mediante citometría de flujo de las subpoblaciones de linfocitos, revelaba que, tanto las células T como las células B se reducían drásticamente, e incluso, se observó una mayor reducción por parte de las células B. Por otro lado, no encontraron diferencia en la proporción de las subpoblaciones CD4/CD8, lo que indica que no hay una pérdida selectiva para células Th o células T citotóxicas, en la sangre periférica. Tampoco hubo diferencia en los porcentajes de linfocitos en los nódulos linfáticos, a excepción de las células B, cuya población se vio nuevamente reducida después de la administración de AL. También encontraron que estos resultados no tienen relación con los niveles de estradiol en la sangre, ya que éstos no cambiaron después de administrar el agonista de la GnRH, lo que sugiere que otras hormonas esteroideas diferentes del estradiol, podrían estar implicadas en este efecto inmunomodulador.

Meresman y colaboradores (2003), demostraron que los niveles de VEGF e IL-1β se redujeron considerablemente, en un medio condicionado, correspondiente a un cultivo de células del endometrio, expuestas a AL, en relación a aquellas células que se encontraban en condiciones basales. Estos resultados coinciden con los de Küpker y colaboradores (1998), que mostraron que después de la terapia con agonistas de la GnRH, los pacientes con endometriosis exhibían una disminución significativa en las concentraciones medias de VEGF en el peritoneo. Por lo tanto, se propone que los agonistas de la GnRH, posiblemente son capaces de regular la actividad angiogénica de las lesiones correspondientes a la endometriosis, mediante la modulación de la secreción de factores angiogénicos (Meresman *et al.*, 2003).

En un estudio llevado a cabo por Guzmán y colaboradores (2012), se observó que al administrar AL en ratas ovariectomizadas y con EAE, el grado de fosforilación de la subunidad p65 del NF-κB, disminuía significativamente si se comparaba con las ratas ovariectomizadas con EAE cuyo tratamiento había sido solución salinas fisiológica (S. S. F) al 0.9%. Como ya se sabe, el NF-κB al estar fosforilado en su subunidad p65, adquiere la capacidad para trastocarse al núcleo e inducir la síntesis de ciertas citocinas que participan en el proceso inflamatorio, tales como IL-1β y TNF-α.

Como resultado de estos experimentos, se obtuvo una mejora en los signos clínicos de los animales con EAE (aumento de peso, recuperación de movilidad, apetito, incremento de neurofilamentos en la médula espinal y un mejor control de la micción), que habían sido tratados con 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AL, en comparación con aquellos animales que no habían sido tratados.

En un experimento desarrollado por Díaz-Galindo y colaboradores (2015), en donde se indujo un daño en la médula espinal - de ratas Wistar ovariectomizadas, se determinó que una administración de AL a una dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, promovía nuevamente el movimiento de las patas posteriores, un control sobre la micción, la recuperación de la morfología de la médula espinal y un incremento en el número de las células de la microglia en el sitio de lesión, en comparación con los animales control.

Se ha evaluado el efecto que presenta el AL sobre la actividad de células NK en pacientes con endometriosis, en dos trabajos independientes. El primero reporta un aumento en la actividad de las células NK en muestras de sangre periférica de pacientes con endometriosis, adenomiosis y leiomioma. Los resultados fueron determinados por un ensayo de liberación de ^{51}Cr , el cual es un marcador de células linfoides (Umesaki *et al.*, 1999). El segundo trabajo, a diferencia del primero, menciona que la citotoxicidad de células NK, en pacientes con endometriosis, se redujo significativamente con la administración de AL a una dosis de 0.25 ng/ml y 1.36 ng/ml. Estos autores sugieren que el efecto inmunomodulador del AL sobre estas células se debe a que presentan receptores para GnRH (Wong & Simon, 2004). Costa y colaboradores (1990), han reportado la presencia de receptores para GnRH en linfocitos de ratón, que eran inmunológicamente y estructuralmente similares a los receptores de la gonadotropina. Además, la presencia de receptores específicos para GnRH, fueron encontrados en cultivos de linfocitos porcinos (Standaert *et al.*, 1992). Estos resultados dejan claro que hay un papel inmunomodulador de este compuesto sobre la actividad de células NK, sin embargo, aún es necesario realizar más estudios para aclarar las discrepancias entre estos dos trabajos.

Se ha informado que el tratamiento con AL a una dosis de 50 μg , administrado en ratón y previo a un estrés restrictivo, previene significativamente su efecto

inhibitorio sobre las células del sistema inmune sobre los niveles de los títulos de anticuerpos, el recuento total de leucocitos y el peso del timo relativo, mostrando un aumento significativo de estos parámetros inmunológicos (Umathe *et al.*, 2008). Generalmente, la inmunosupresión inducida por el estrés es posterior a la activación de eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) y al aumento de los niveles sistémicos de glucocorticoides. La GnRH y el factor liberador de corticotropina (CRF), tienen perfiles de comportamiento fisiológicos totalmente opuestos, por lo que ambos pueden inhibirse mutuamente. Por otro lado, los agonistas de la GnRH elevan los niveles sistémicos de las hormonas sexuales. Estos esteroides sexuales son conocidos por estimular o inhibir el sistema inmunológico. Dicho efecto depende del tipo de esteroides sexuales y el parámetro inmunológico que está siendo afectado (Sakiani *et al.*, 2012). Por lo tanto, el efecto periférico inmunoestimulante del AL podría ser consecuente a la inhibición de la liberación del CRF y / o al efecto endócrino mediado por el eje hipotálamo-pituitario-gonadal HPG (Williamson *et al.*, 2005). Éstos resultados, a su vez, demuestran que existe una interacción entre las hormonas esteroideas y la síntesis de la GnRH. Además, la GnRH, en concentraciones normales, es decir, mínimas, también estimula la proliferación de linfocitos B y T, influye en los niveles de determinadas citocinas, en la formación de inmunoglobulina (Ig) G y afecta también las proporciones de CD4/CD8, lo cual es contradictorio a lo encontrado por Rao y colaboradores (1993). Nuevamente, estos experimentos demuestran un papel infalible de la GnRH y sus agonistas sobre el sistema inmune (Umathe *et al.*, 2008).

El efecto antiinflamatorio y antiangiogénico del AL ya ha sido comparado en un modelo de inducción de endometriosis en ratas Sprague Dawley, con una dosis única de 1 mg/kg (Bayoglu *et al.*, 2014). En este estudio, el efecto sistémico del AL también se relacionó con la disminución de los niveles de estrógenos endógenos. Dicho efecto local se ha demostrado por la reducción de la infiltración de macrófagos, la supresión de los niveles de citoquinas, y la disminución de los niveles de agentes quimiotácticos (Khan *et al.*, 2009). Por otra parte, la administración de AL disminuyó los niveles de citocinas en el plasma y en el líquido peritoneal y también suprimió la actividad angiogénica mediante la inhibición de VEGF, de metalopeptidasa de matriz (MMP)-2 y MMP-9.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Khan y colaboradores (2009), han propuesto que el mecanismo de acción por el cual el AL induce una acción inmunomoduladora sobre la respuesta inflamatoria, en el caso de mujeres con endometriosis uterina, podría deberse a una disminución de los niveles endógenos de estrógenos. También postularon que el decaimiento de la respuesta inflamatoria en los grupos tratados con AL, podría deberse a un efecto dual de la supresión sistémica y local de los estrógenos. Aunado a esto, se ha demostrado que el AL ocasiona un decaimiento de la expresión de la citocromo aromatasas P450 (enzima que participa en la biosíntesis de estrógenos) en el endometrio ectópico de mujeres con endometriosis, adenomiosis o leiomioma (Ishihara *et al.*, 2003).

Pese a que existen muchos aspectos desconocidos respecto al mecanismo de acción del AL, todos estos estudios sugieren que tiene un efecto en el sistema inmune y que dicho efecto puede estimular una respuesta o inhibirla, lo cual depende claramente de la dosis empleada y el tiempo por el cual se administre.

3. JUSTIFICACIÓN

Como ya se ha documentado con anterioridad, el AL, es un análogo sintético de la GnRH, que se considera como un fármaco muy seguro y tolerable y que presenta diversas aplicaciones clínicas, incluyendo el tratamiento de cáncer de próstata, endometriosis, fibrosis uterina, pubertad precoz central y en las técnicas de fertilización *in vitro*. En estudios recientes, se ha mencionado que el tratamiento con AL podría inducir un efecto inmunomodulador. Se llegó a esta conclusión al observar un aumento de células infiltradas (posiblemente células T_{reg}, que son células T supresoras) por medio de un análisis de infiltración celular en la médula espinal de los animales con EAE.

En otro estudio llevado a cabo por Guzmán y colaboradores (2013), se observó que al administrar AL en ratas ovariectomizadas y con EAE, el grado de fosforilación de la subunidad p65 del NF- κ B, disminuía considerablemente en comparación con las ratas ovariectomizadas, con EAE y a las cuales sólo se les había administrado S. S. F. Como ya se sabe, el NF- κ B al estar fosforilado en su subunidad p65, adquiere la capacidad para translocarse al núcleo e inducir la síntesis de ciertas citocinas que participan en el proceso inflamatorio, tales como IL-1 β , IL-17, IL-23 y TNF- α . Así mismo, en este mismo estudio, al revisar los niveles de dichas citocinas, se encontró que estos disminuían considerablemente en las ratas ovariectomizadas y con EAE que habían sido tratadas con AL.

Además, dado que los medicamentos antiinflamatorios tanto esteroideos como no esteroideos interfieren con las prostaglandinas, sus efectos adversos se relacionan con los procesos en que estas intervienen como es la citoprotección gástrica, la agregación plaquetaria, la autoregulación vascular renal y el mecanismo del parto. Por ejemplo, los fármacos inhibidores de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) pueden tener efectos cardiovasculares adversos incluso fatales en pacientes susceptibles, por lo cual algunos han sido retirados del mercado.

Los AINES generalmente producen irritación de la mucosa gástrica y son causa de úlcera péptica lógicamente, manifestándose estos efectos por dolor estomacal y acidez. También pueden producir hemorragias, vértigo, cefaleas, fatiga, sueño, y veces

ocasionan reacciones alérgicas de consideración. Rara vez producen alteración de las células sanguíneas, problemas renales o nefropatías y trastornos hepáticos. Se deben extremar las precauciones con las mujeres embarazadas.

Los corticoides pueden causar alteraciones de la secreción corticosuprarrenal llegando a producir el síndrome de Cushing, sin mencionar los episodios hemorrágicos digestivos y úlcera péptica (debido a que inhiben a las fosfolipasa A2), el efecto mineralcorticoide, el desarrollo de diabetes, cataratas, glaucoma y osteoporosis.

Por lo tanto, en base a lo mencionado anteriormente, en el presente estudio se pretende evaluar los efectos antiinflamatorios que presenta el AL, tanto en procesos de inflamación aguda, así como en procesos de inflamación crónica, en rata y tomando en cuenta que este fármaco únicamente produce una castración química temporal. Esto se hace con el fin de determinar si dicho compuesto podría considerarse también como un medicamento antiinflamatorio o como parte de un procedimiento médico para prevenir o disminuir la inflamación de los tejidos.

4. HIPÓTESIS

El AL, análogo sintético de la GnRH, posee un efecto antiinflamatorio sobre la respuesta inflamatoria aguda y crónica en la rata Wistar.



5. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del análogo sintético de la GnRH, AL, sobre la respuesta inflamatoria aguda y crónica en la rata Wistar.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto tóxico del AL sobre células de la respuesta inflamatoria *in vitro*.
- Analizar el efecto anti-inflamatorio del AL sobre la respuesta inflamatoria aguda.
- Estudiar el efecto anti-inflamatorio del AL sobre la respuesta inflamatoria crónica.

6. METODOLOGÍA

6.1. ANIMALES

Cada uno de los experimentos *in vivo*, se desarrollaron en ratas macho Wistar, con un peso corporal que oscilaba entre 180 y 250 gramos. Los animales se obtuvieron del bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes y se manejaron de acuerdo con las Normas Institucionales de los estándares de bienestar de dicha institución.

Durante los experimentos, los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (22-24 °C), con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno y una dieta de Rodent Laboratory Chow 5001 y agua *ad libitum*.

6.2. PRUEBAS DE TOXICIDAD DEL ACETATO DE LEUPROLIDA EN MASTOCITOS

6.2.1. Cultivo de Mastocitos

Los mastocitos se obtuvieron de ratas Wistar macho, con un peso que oscilaba entre 180 y 250 g. Los animales fueron sacrificados por sobredosis de éter, y posteriormente se les desinfectó el área abdominal con alcohol al 70%. Las ratas se colocaron en la mesa de cirugías en posición decúbito dorsal. Se retrajo la piel (fig. 4-1) y el músculo (fig. 4-2) hasta dejar expuesta la cavidad peritoneal (fig. 4-3), donde se vertieron 20 ml de solución de lavado a 4°C, HEPES-TIRODES con un pH de 7.4 (NaCl 137mM, KCl 2.7 mM, NaH₂PO₄ 0.4 mM, CaCl₂ 1mM, glucosa 5.6 mM y HEPES 12mM), con albúmina sérica bovina o BSA (Sigma-Aldrich, USA) al 1% (BHT-BSA) (fig. 4-4). Se recuperó el total de la suspensión celular del peritoneo (fig. 4-7) y se centrifugó a 180 x g por 6 min a 4 °C (fig. 4-8). Las células sedimentadas se resuspendieron sobre un gradiente de percol (Percoll™, GE Healthcare, Suiza) de 30-80 % (V/V), en el cual los mastocitos quedaron en la porción de percol que corresponde al 80%. Después se centrifugó a 220 x g, 20 min a 4°C. Los restos de percol se eliminaron mediante dos lavados con solución BHT-BSA. Las células se resuspendieron en 1 ml de RPMI-1640 sin rojo fenol (Sigma-Aldrich, USA)

suplementado con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) (Sigma-Aldrich; Toluca, México), cloruro de calcio (Cl_2Ca) (Sigma-Aldrich, USA), suero de ternera fetal (Invitrogen, NY, USA) al 5 % y penicilina-estreptomicina al 1 % (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA) (RPMI-S).

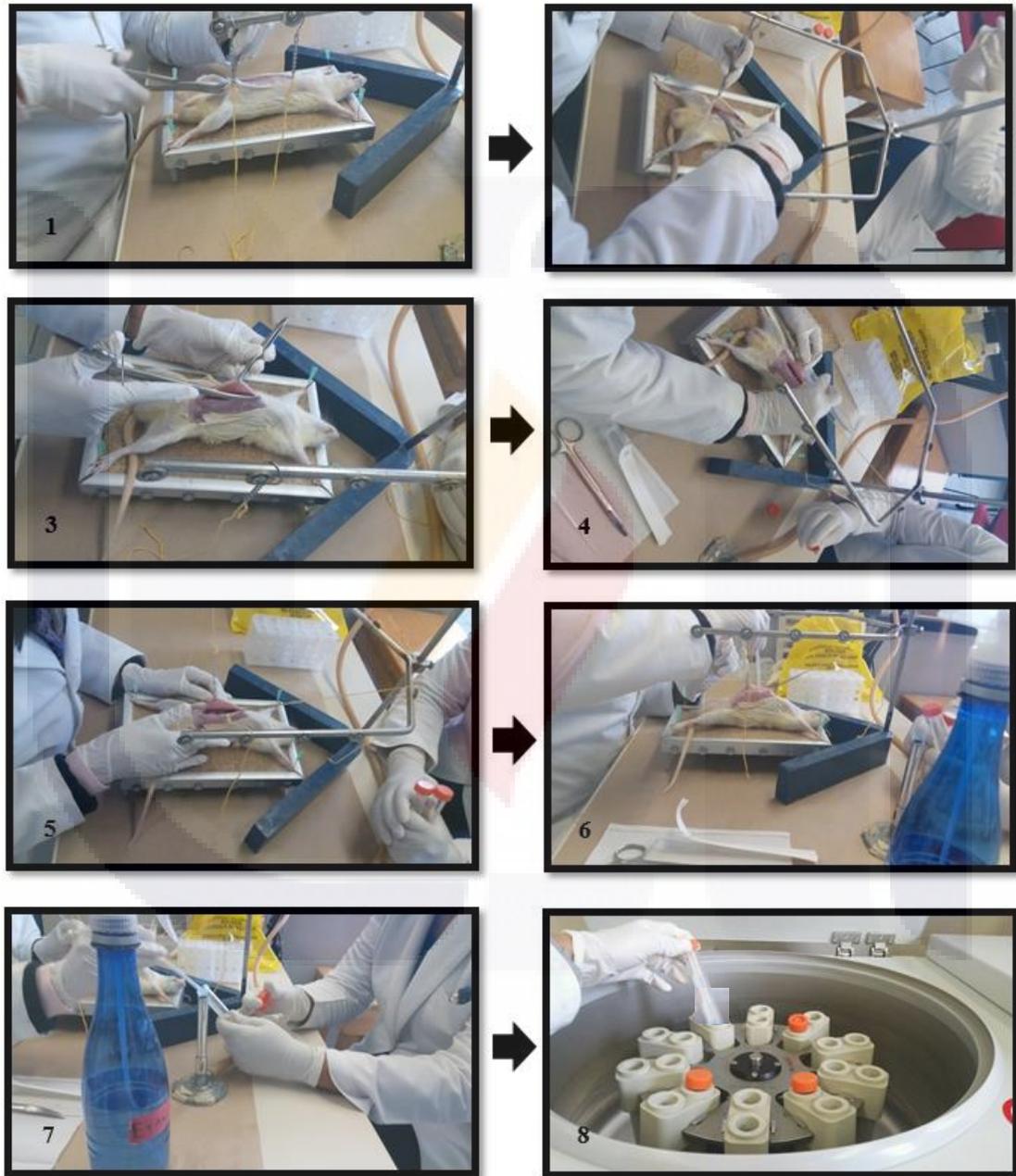


FIGURA 4. Procedimiento para la obtención de mastocitos de la cavidad peritoneal de rata Wistar macho.

5.2.2. Determinación de pureza y viabilidad celular

La viabilidad y pureza celular se determinó mediante la técnica del Azul Trypan al 0.9% (Sigma-Aldrich, USA) (fig. 5-1 y 5-2) en una cámara de Neubauer (fig. 5-3). Se contaron las células vivas (no teñidas) y muertas (teñidas) (fig. 5-5) de los cuatro cuadrantes externos (fig. 5-4). Finalmente, el rendimiento se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\frac{(\text{No. de células})(\text{Factor de la cámara})(\text{Factor de dilución})(\text{Vol. de suspensión celular})}{\text{No. de cuadrantes leídos}}$$

Los cultivos que se seleccionaron para los posteriores ensayos, fueron suspensiones celulares con viabilidad $\geq 97\%$ y pureza $\geq 95\%$.

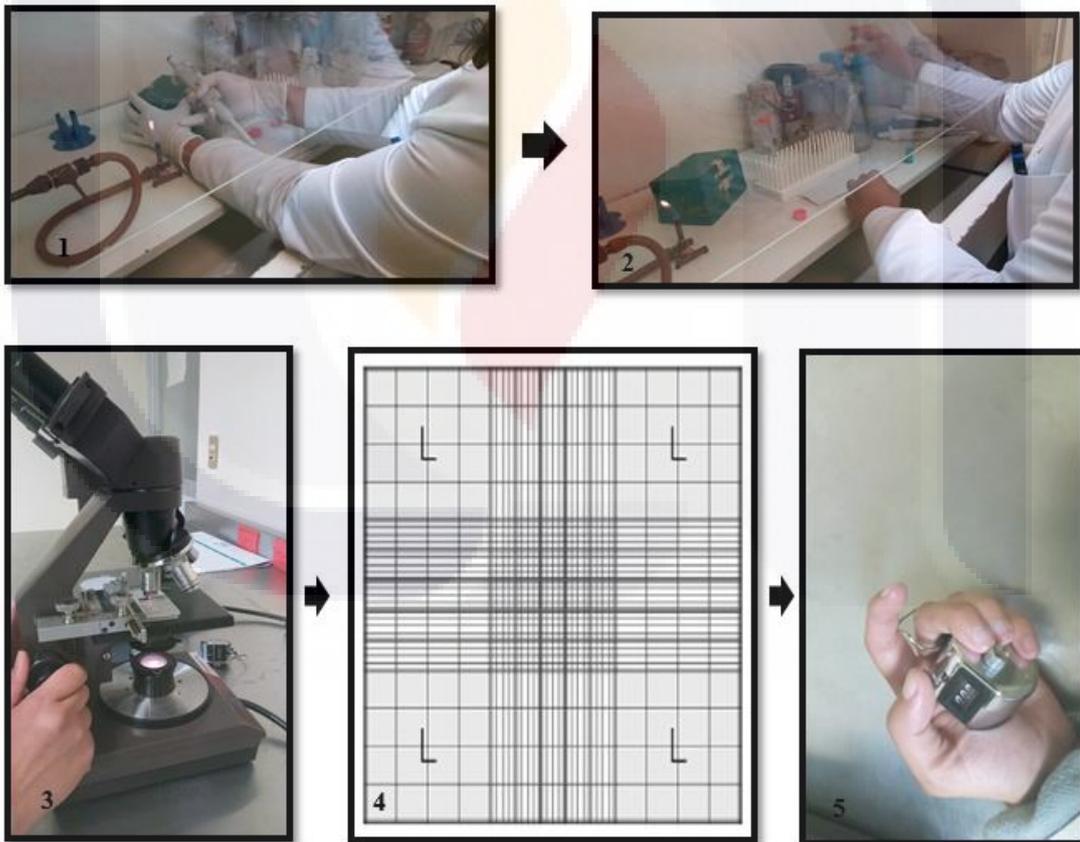


FIGURA 5. Cultivo de mastocitos y determinación de la pureza y viabilidad celular por medio de la técnica azul Trypan.

6.2.3. Determinación de viabilidad celular por MTT

La técnica del MTT de Mossman (1983), consiste en un ensayo colorimétrico con ((3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio de bromuro)), también llamadas sales de tetrazolio (Mosman, 1983), en una placa de microtitulación de 96 pocillos. La viabilidad celular por MTT se determinó en cultivos celulares de 1×10^5 células en 100 μl de medio, que en este caso era medio RPMI-S, AL (0.1, 38, 50, 80 y 500 nM) o DMSO al 5%, por pozo (fig. 6). Posteriormente, se incubaron a 37°C en una cámara húmeda con CO_2 al 5% durante 24 h (fig. 7-1). Pasadas 4 h se revisaron los cultivos celulares (fig. 7-2 y 7-3), se colocó MTT a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por pozo (fig. 7-4) y se incubó 4 h en una cámara de CO_2 a 37°C (fig. 7-5). Las sales fueron reducidas por acción de enzimas deshidrogenasas o con capacidad oxidorreductasa presentes en células metabólicamente activas, se transforman en 1,3,5-trifeniltetrazolio formazan, también llamados cristales de formazan, los cuales se caracterizan por tener una coloración azul (fig. 7-6). De tal forma, que los cristales de formazan se disolvieron con 100 μl de HCl 0.1 N en isopropanol absoluto por cada 100 μl de medio, cuidando que no estuvieran expuestos a la luz (fig. 7-7). Una vez ya disueltos los cristales, se llevó a cabo la lectura de los cultivos en el espectrofotómetro de microplaca (BIO-RAD iMARK™ microplate reader -Japón-2011) a una longitud de onda de 595 y 655 nm (fig. 7-8).

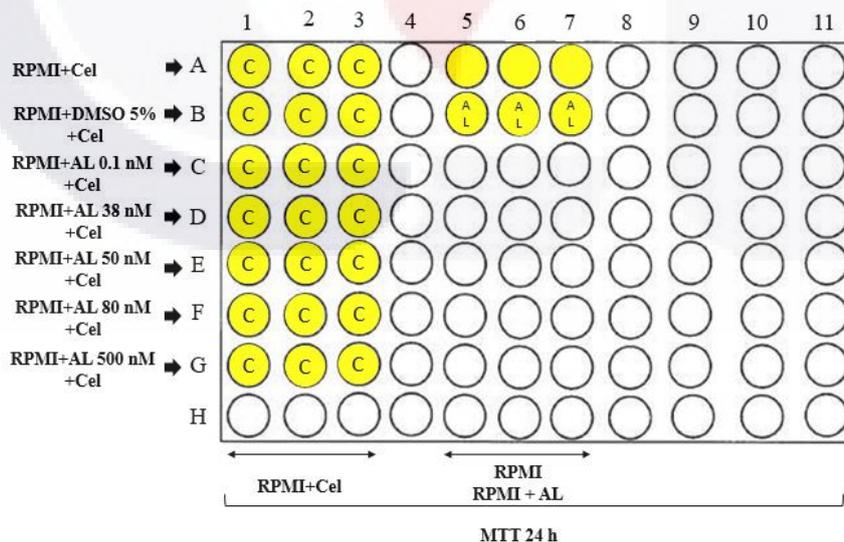


FIGURA 6. Diagrama de las pruebas de toxicidad del AL en mastocitos en una placa de ELISA, por medio de la técnica del MTT. ● corresponde al MTT y C a las células. A todos los pozos de prueba se les agregó medio RPMI.



FIGURA 7. Determinación del porcentaje de viabilidad en mastocitos por medio de la técnica del MTT.

6.3. GRUPOS DE ANIMALES Y TRATAMIENTOS EN LOS ENSAYOS *IN VIVO*

Para la evaluación del efecto del AL sobre la respuesta inflamatoria, los animales se clasificaron en 3 grupos:

- **Controles (C)**, tratados con 100 µl de S. S. F vía IM.
- **Indometacina (I)**, tratados con 5 mg de indometacina por Kg de peso corporal del animal, disuelta S. S. F VO.
- **Tratados (T)**, recibieron tratamiento con 10 µg de AL por Kg de peso corporal del animal, disuelto en S. S. F, vía IM.

6.4. DISEÑO EXPERIMENTAL E INDUCCIÓN DEL EDEMA PLANTAR POR ACCIÓN DE LA CARRAGENINA (MODELO DE INFLAMACIÓN AGUDA)

El tratamiento con AL o vehículo en los animales del grupo T y C respectivamente, se aplicó de manera profiláctica desde 12 (fig. 8) o 3 días (fig. 9) y cada 72 h hasta 30 minutos antes de la inducción del edema. Mientras que, como tratamiento terapéutico, el AL o la S. S. F se administraron solo media hora antes (fig. 10). En todos los casos la indometacina se administró 30 minutos antes de la inducción del granuloma.

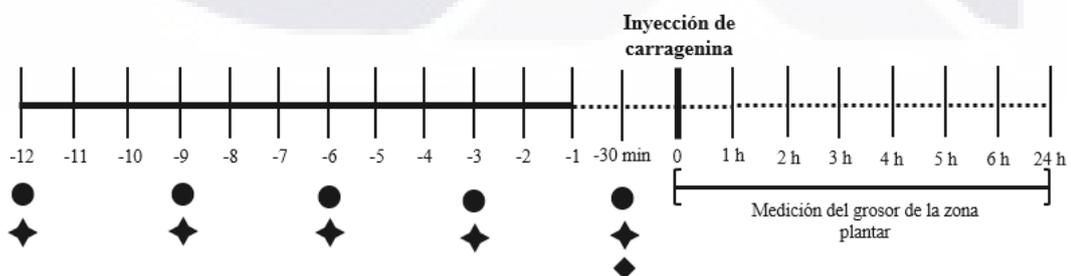


FIGURA 8. Diseño experimental del efecto del AL, al ser administrado como tratamiento profiláctico de 12 días antes de la inducción del edema plantar. Donde, ● corresponde a C; ★ a AL y ◆ a I.

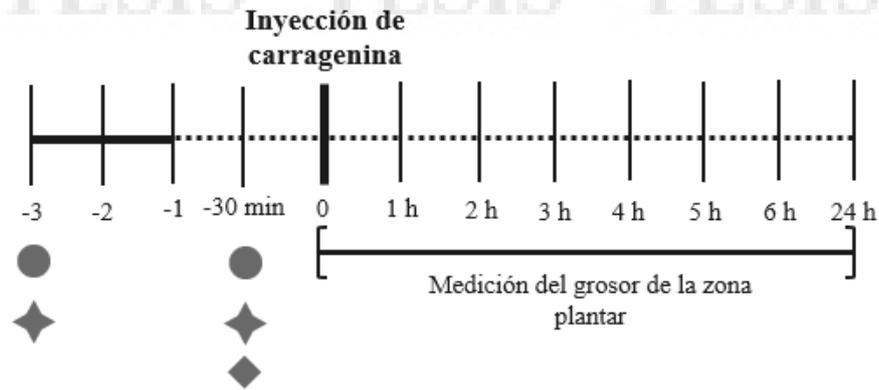


FIGURA 9. Diseño experimental del efecto del AL, al ser administrado como tratamiento profiláctico de 3 días antes de la inducción del edema plantar. Donde, ● corresponde a C; ◆ a AL; y ◆ a I.

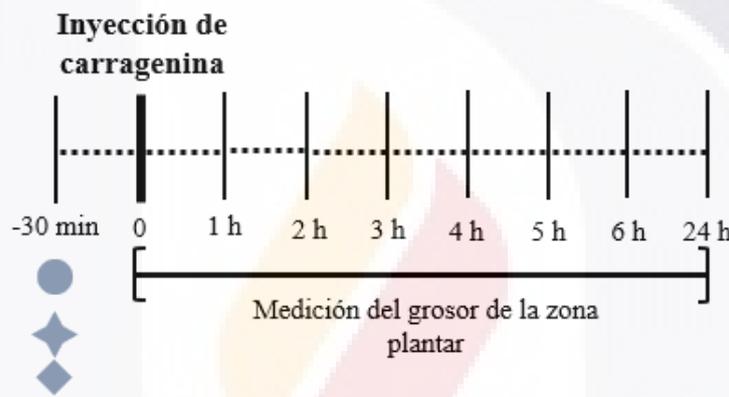


FIGURA 10. Diseño experimental del efecto del AL, al ser administrado como tratamiento terapéutico. Donde, ● corresponde a C; ◆ a AL y ◆ a I.

La inducción del edema en la región plantar, se hizo tras la inyección de 100 μ l (fig. 11-3) de carragenina λ (CA) al 1% (p/v) en S. S. F al 0.9% (fig. 11-1) en la pata trasera derecha. Mientras que a la pata trasera izquierda se inyectó el mismo volumen del vehículo con el objetivo de tener control interno. El grosor del edema en ambas patas se midió con un vernier digital eléctrico Powerfix® (Bedforshire, Inglaterra), previo a la inducción del edema (fig. 11-2), tras la inducción del edema que se consideró como la lectura a las 0 h y a 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h posteriores a la inducción (fig. 11-4 y 11-5). Después de haber obtenido todas las mediciones, los animales fueron sacrificados por sobredosis de éter. El grosor del edema plantar se obtuvo de restarle el grosor de la pata inyectada con SSF al grosor de la pata inyectada con CA.

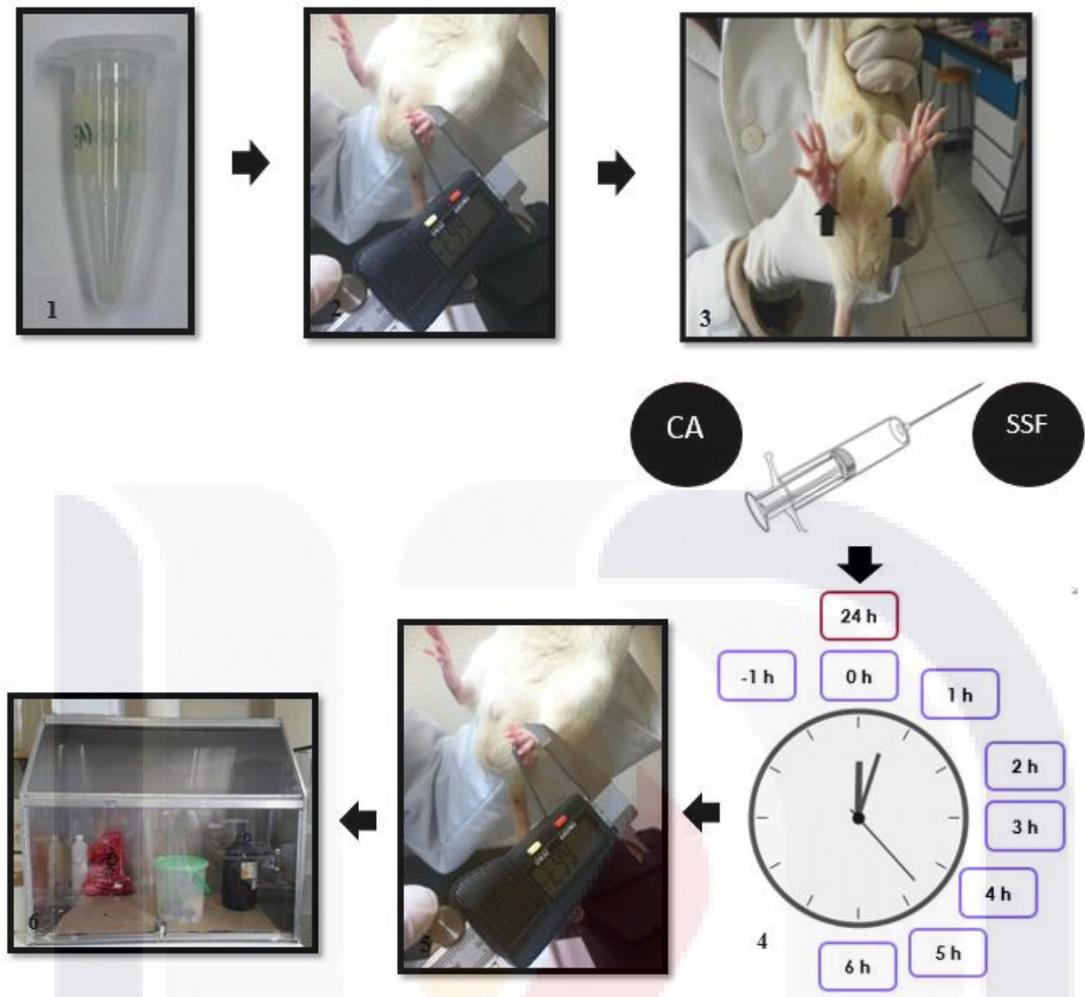


FIGURA 11. Inducción y medición de edema plantar por inyección de carragenina. Donde CA= Carragenina y S. F = Solución Salina Fisiológica al 0.9%.

6.5. INDUCCIÓN DE GRANULOMA POR PASTILLA DE ALGODÓN (MODELO DE INFLAMACIÓN CRÓNICA)

Al igual que los tratamientos en el modelo de inflamación aguda, los esquemas se siguieron de manera profiláctica y terapéutica. Los tratamientos profilácticos se administraron desde 12 (fig. 12) y 3 (fig. 13) días antes de la implantación de la pastilla de algodón y cada 72 h en los animales de los grupos T y C, según corresponda AL o S. S. F. Mientras que, los tratamientos terapéuticos (fig. 14) con AL o S. S. F se aplicaron desde 1 día después de la implantación del algodón en los animales de los grupos T e C, según corresponda y cada 72 h. La indometacina siempre se aplicó diariamente y a partir del día posterior a la implantación de la pastilla de algodón.

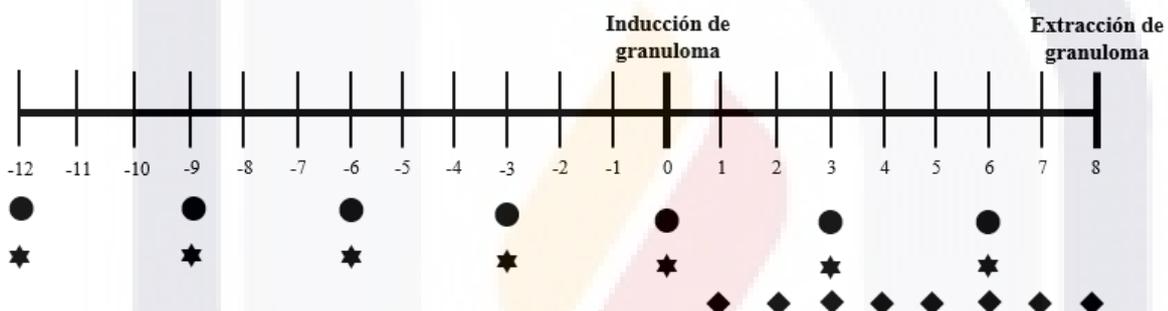


FIGURA 12. Diseño experimental del efecto del AL al ser administrado como tratamiento profiláctico de 12 días antes de la inducción de granuloma. Donde, ● corresponde a C; ★ a AL y ◆ a I.

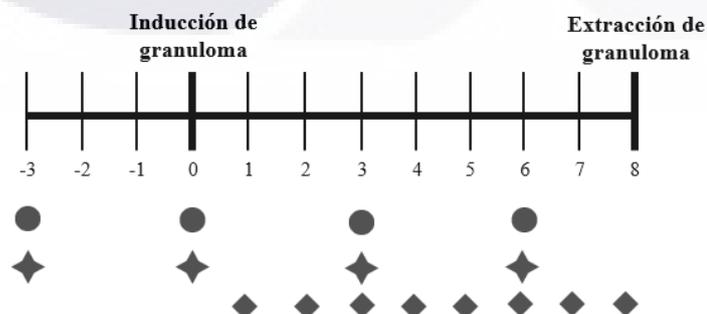


FIGURA 13. Diseño experimental del efecto del AL al ser administrado como tratamiento profiláctico de 3 días antes de la inducción de granuloma. Donde, ● corresponde a C; ◆ a AL; y ◆ a I.

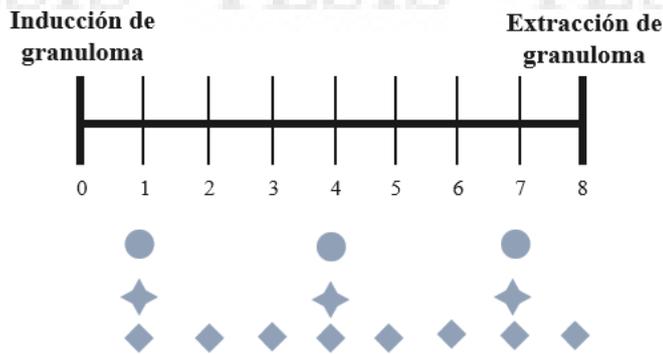


FIGURA 14. Diseño experimental del efecto del AL al ser administrado como tratamiento terapéutico. Donde, ● corresponde a C; ◆ a AL y ◆ a I.

Para la inducción del granuloma se implantaron pastillas de algodón vía subcutánea en axila o ingle. Para lo cual, las ratas se anestesiaron con éter y se rasuraron en la posición media de la zona ventral (fig. 15-6). Se realizó un pequeño corte en la zona transversal abdominal (fig. 15-7) y con la ayuda de fórceps romos se iniciaron cuatro túneles subcutáneos que terminaban en axilas (fig. 15-8) y/o ingles (fig. 15-10). Una vez hechos los túneles subcutáneos, se introdujeron las pastillas de algodón estéril con un peso constante, en axila y/o ingle (fig. 15-1). Se sacó el aire que quedó en los túneles y se procedió a suturar la herida (fig. 15-12 y 15-5). Al día 8 de la inducción del granuloma, las ratas fueron sacrificadas por sobredosis de éter (fig. 16-1) y los granulomas ya formados, se removieron quirúrgicamente (fig. 16-3). Se registró el peso húmedo de los granulomas (fig. 16-5) y se llevaron a su peso seco constante, introduciéndolos en una estufa eléctrica (marca INC-40, Chicago, Estados Unidos) a una temperatura de 56°C (fig. 16-6). El desarrollo del granuloma se definió como la diferencia del incremento del peso seco del granuloma con respecto al de la pastilla de algodón. El efecto del AL se estableció como el porcentaje de inhibición de la formación del granuloma, el cual resulta de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ De inhibición} = 1 - \left(\frac{GT}{GC}\right) 100$$

Dónde:

- GT: corresponde a la media de los granulomas de los animales T o I
- GC: corresponde a la media de los granulomas de los animales C

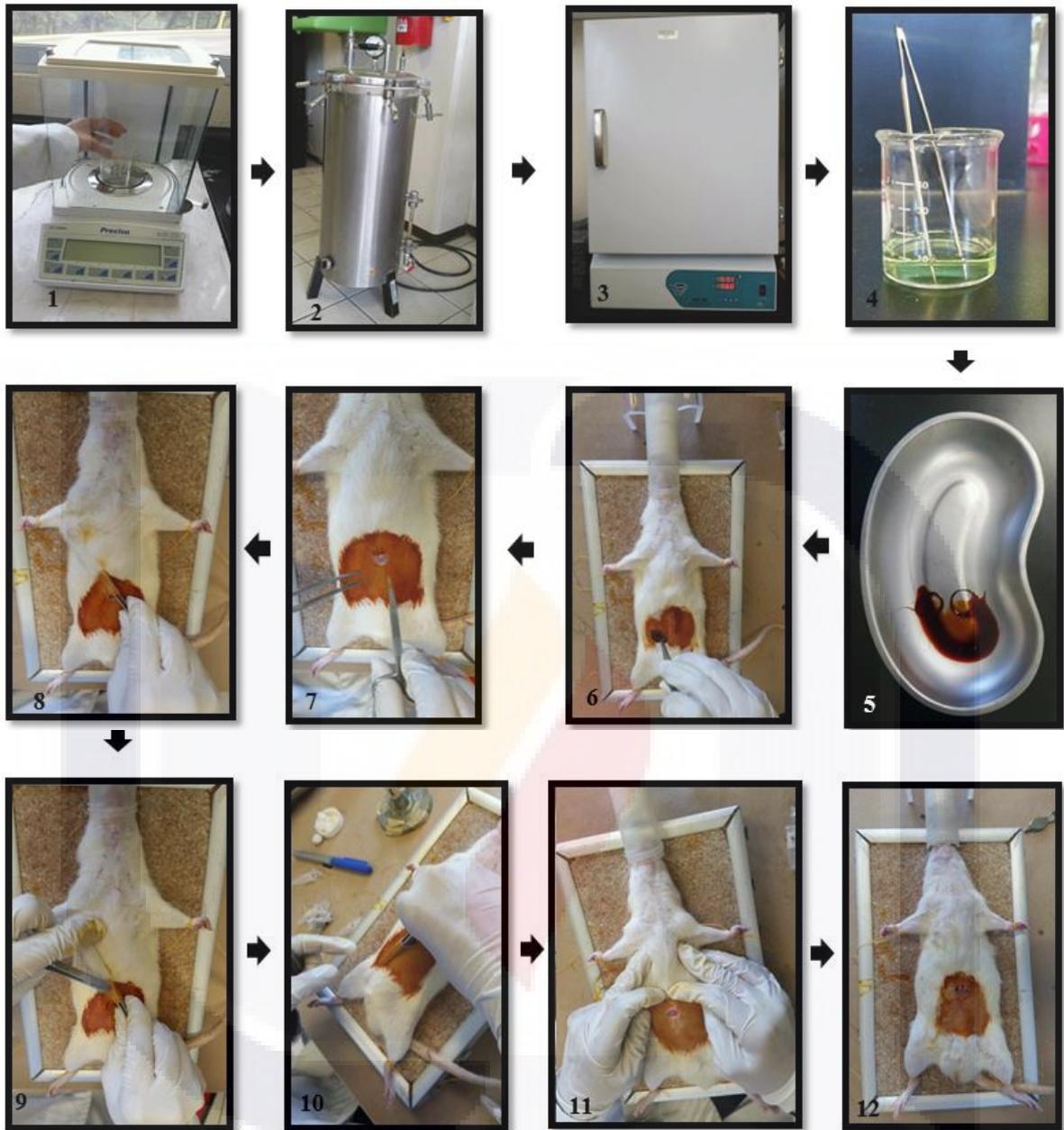


FIGURA 15. Procedimiento quirúrgico para la inducción de granuloma.

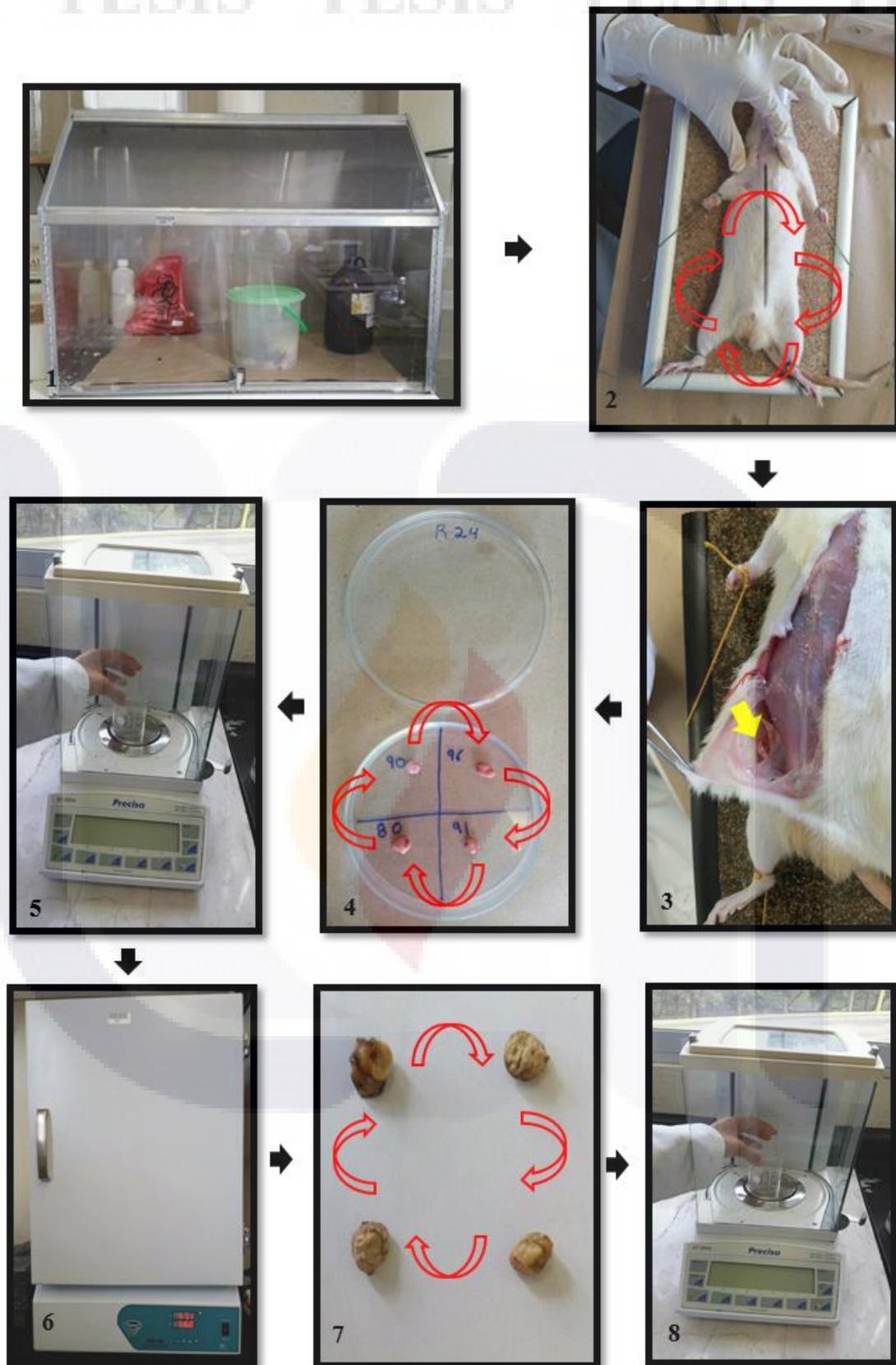


FIGURA 16. Procedimiento quirúrgico para la extracción de granuloma, obtención del peso húmedo y obtención del peso seco. Las flecha amarilla (3) indica un granuloma inguinal y las flechas rojas (2,4 y 7) indican el sentido en que se implantaron las pastillas de algodón y la manera en que se extrajeron.

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en este trabajo se presentan como la media de los valores \pm S. E. M. El análisis estadístico de cada uno de los modelos empleados se realizó mediante la prueba t de Student, utilizando el programa de GraphPad Prism 5.01. Las diferencias eran estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.



7. RESULTADOS

7.1. EFECTO TÓXICO DEL ACETATO DE LEUPROLIDA SOBRE MASTOCITOS.

El efecto del AL sobre la viabilidad de células efectoras de la respuesta inflamatoria se determinó mediante la técnica modificada del MTT (Mossman, 1983) en mastocitos. Se valoraron distintos tiempos de incubación por encima de las 24 h, con el fin de determinar a qué tiempo los mastocitos se mantenían estables y a qué tiempo empezaba a reducirse el porcentaje de viabilidad por agotamiento de nutrientes. De esta manera, se determinó que la viabilidad disminuyó significativamente a partir de las 48 h en un 62% (37.73 ± 4.82 vs 99.77 ± 11.52 ; $p < 0.01$). Caída que aumentó a las 72 h en un 90% (10.07 ± 1.06 vs 99.77 ± 11.52 ; $p < 0.01$) y a las 96 h en un 91% (8.68 ± 0.40 vs 99.77 ± 11.52 ; $p < 0.01$). Así, se definió que el tiempo óptimo de incubación fue de 24 h (89.35 ± 5.17 % de viabilidad), ya que no se encontraron diferencias significativas con el tiempo 0 (fig.17).

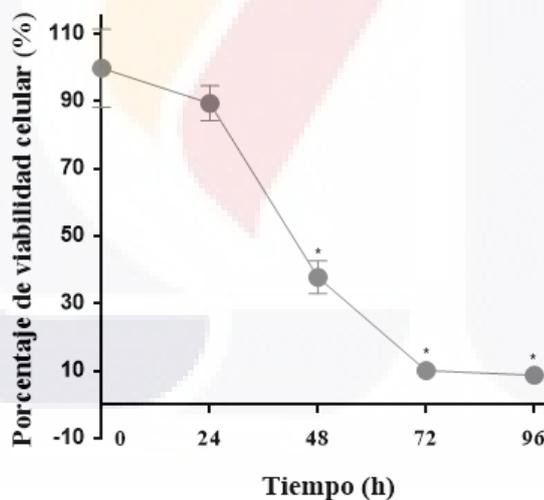


FIGURA 17. Determinación del tiempo de incubación óptimo de mastocitos peritoneales de rata Wistar. El porcentaje de viabilidad se obtuvo por medio de la técnica MTT cada 24 h, hasta las 96 h, partiendo de una población celular de 1×10^5 células en 100 μ l de medio. $n = 3$ (por triplicado); t-Student; donde* $p < 0.01$ vs 0 h.

Con la finalidad de definir al DMSO como control de citotoxicidad, se determinó el porcentaje al cual mueren el total de las células a través del % de

viabilidad. Las concentraciones probadas estuvieron en un rango del 1 al 20%. En la figura 18-A, se observa que la muerte celular se incrementó de manera progresiva conforme aumentó la concentración del DMSO. En un principio se observó que el DMSO al 1% no afectó la viabilidad celular de forma significativa con respecto a los animales controles ($92.94\% \pm 2.23$ vs $98.63\% \pm 6.25$). Sin embargo, al incrementar la concentración a 2.5%, este disminuyó la viabilidad celular a un $32.35\% \pm 1.64$ ($p < 0.001$); hasta alcanzar una máxima disminución al 5% ($17.25\% \pm 0.85$; $p < 0.001$). Efecto que permanece constante cuando se aumenta la concentración de DMSO al 10% ($19.80\% \pm 0.50$; $p < 0.001$), 15% ($15.69\% \pm 0.55$; $p < 0.001$) y 20% ($16.86\% \pm 0.93$; $p < 0.001$); valores semejantes al del control de cromógeno ($18.29\% \pm 0.90$; $p < 0.001$). El efecto del DMSO sobre los mastocitos se reflejó en la morfología de las células cuando se observaron en el microscopio óptico invertido; pues se observó, que al aumentar la concentración de éste, había una mayor activación de la desgranulación y/o disminución de las células viables por campo (fig. 18-B).

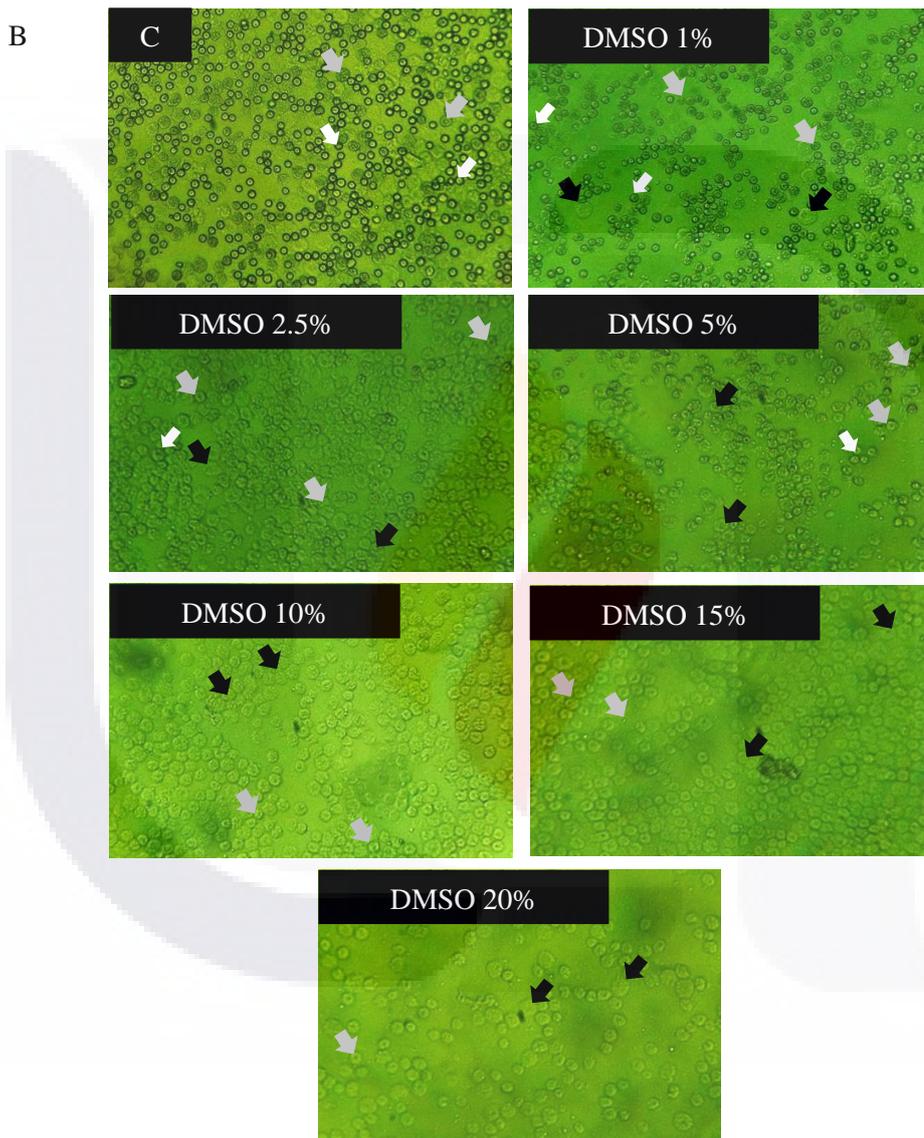
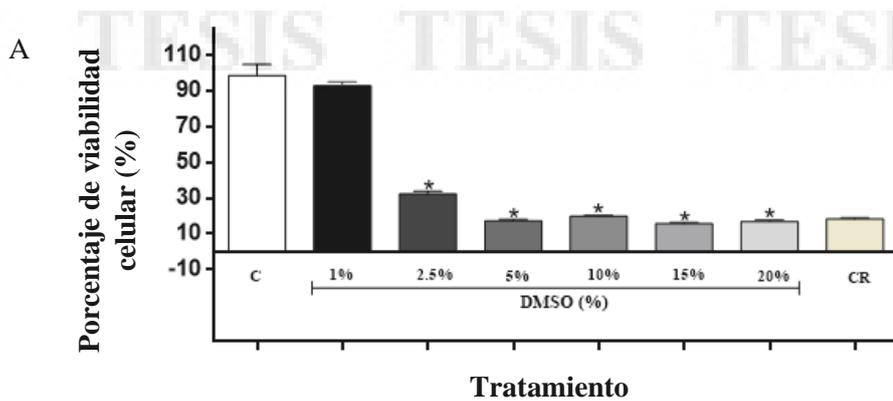


Figura 18. Porcentaje de viabilidad celular de mastocitos peritoneales de rata Wistar. A) En función del porcentaje de DMSO; dónde “C” corresponde a la viabilidad de células sin estímulo y “CR” al cromógeno. El porcentaje de viabilidad se obtuvo por medio de la técnica MTT a las 24 h, partiendo de una población celular de 1×10^5 mastocitos. $n = 3$ (por triplicado). t-Student; * $p < 0.001$ vs 0 h. B) Fotografías de los cultivos celulares bajo las diferentes condiciones de trabajo a 40X., las flechas blancas señalan células íntegras, las flechas grises células desgranuladas y las negras células muertas.

Una vez determinadas las condiciones óptimas para determinar la viabilidad de las células por la técnica de MTT, se determinó el efecto que ejerce el AL sobre la viabilidad de los mastocitos. En la figura 19-A, se observa cómo las células C alcanzan un porcentaje de viabilidad de 100.10 ± 3.31 ; mientras que las que se expusieron con DMSO al 5% disminuyeron significativamente este porcentaje a $21.41\% \pm 3.077$ ($p < 0.001$), lectura semejante a la del cromógeno ($22.54\% \pm 3.44$). Por otro lado, los mastocitos no exhibieron disminución significativa en el porcentaje de viabilidad celular cuando se expusieron con 0.1 nM ($95.80\% \pm 3.32$), 38 nM ($98.75\% \pm 3.53$) y 50 nM ($101.90\% \pm 3.62$) de AL. Fue a la concentración de 80 nM ($112.5\% \pm 8.97$ vs $100.10\% \pm 3.31$) en la que se observó un ligero incremento no significativo en la viabilidad celular, mismo que fue significativo a 500 nM ($113.3 \pm 1.70\%$ vs 100.10 ± 3.31 ; $p < 0.01$). Estos efectos se reflejaron al observar las células bajo las diferentes condiciones en microscopio invertido; tal como se muestra en la figura 19-B.

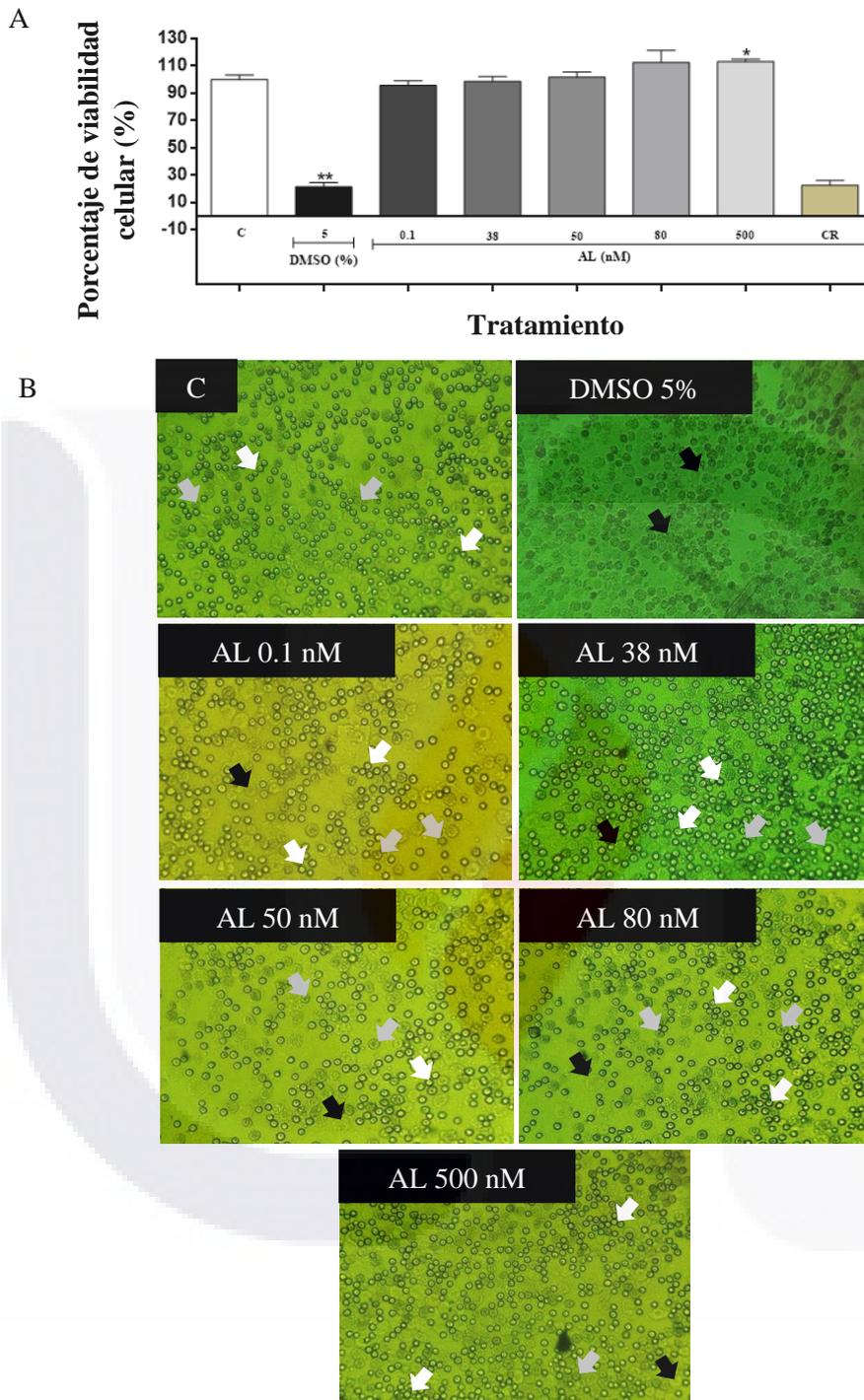


Figura 19. Porcentaje de viabilidad celular de mastocitos peritoneales al incubar con AL a las 24h. A) En función de la concentración de AL; dónde “C” corresponde a la viabilidad de células sin estímulo y “CR” al cromógeno. El porcentaje de viabilidad se obtuvo por medio de la técnica MTT a las 24 h, partiendo de una población celular de 1×10^5 mastocitos. $n=3$ (por triplicado). t-Student; * $p<0.01$ y ** $p<0.001$ vs C. B) Fotografías de los cultivos celulares bajo las diferentes condiciones de trabajo a 40X.; las flechas blancas señalan células íntegras, las flechas grises células desgranuladas y las negras células muertas.

7.2. EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL ACETATO DE LEUPROLIDA SOBRE UN MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMACIÓN AGUDA

Para evaluar el efecto de AL sobre un modelo de inflamación aguda, se caracterizó el modelo de la inducción de edema en la zona plantar de rata Wistar por CA. Para ello, se llevó a cabo un análisis de la cinética de inflamación de la CA a una concentración del 1%, inyectada en la pata derecha; comparada con la generada por la inyección de S. S. F en la pata izquierda. El registro se hizo cada h a partir de la inducción, durante las primeras 6 h y a las 24 h. Como se observa en la figura 20-A, la inyección de S. S. F genera un incremento en el volumen de la pata izquierda a la media h de haber sido inyectada con respecto al tiempo 0 ($5.50 \text{ mm} \pm 0.15$ vs $4.86 \text{ mm} \pm 0.08$; $p < 0.01$). Incremento que fue desapareciendo a partir de la hora ($5.07 \text{ mm} \pm 0.18$) y que se mantuvo constante a las 2 ($5.21 \text{ mm} \pm 0.19$), 3 ($4.95 \text{ mm} \pm 0.06$), 4 ($4.88 \text{ mm} \pm 0.08$), 5 ($4.58 \text{ mm} \pm 0.04$) y 6 ($4.58 \text{ mm} \pm 0.09$) h; recuperándose por completo a las 24 h ($4.56 \text{ mm} \pm 0.09$). Por otro lado, al administrar la CA, también se registró un incremento inmediato del volumen del edema plantar a la media h, respecto al tiempo 0 de la CA ($5.96 \text{ mm} \pm 0.20$ vs $4.82 \text{ mm} \pm 0.13$; $p < 0.01$). Sin embargo, este incremento se mantuvo constante de la 1 a las 6 h, mientras que a las 24 h ($4.71 \text{ mm} \pm 0.11$) de haber inyectado la CA, se alcanzaron los niveles basales; por lo tanto el edema plantar inducido por la CA fue significativamente mayor al generado por la inyección de S. S. F a 1 ($5.99 \text{ mm} \pm 0.14$ vs 5.07 ± 0.18 ; $p < 0.01$), 2 ($6.08 \text{ mm} \pm 0.08$ vs 5.21 ± 0.19 ; $p < 0.001$), 3 ($6.05 \text{ mm} \pm 0.04$ vs 4.95 ± 0.06 ; $p < 0.001$), 4 ($6.15 \text{ mm} \pm 0.06$ vs 4.88 ± 0.08 ; $p < 0.001$), 5 ($6.16 \text{ mm} \pm 0.05$ vs 4.58 ± 0.04 ; $p < 0.001$) y 6 ($6.08 \text{ mm} \pm 0.07$ vs 4.58 ± 0.09 ; $p < 0.001$) h. En la figura 20-B, se muestra el edema desde un ángulo lateral y frontal, en ambas patas, al término de 6 h de haber inyectado la S. S. F y la CA al 1%.

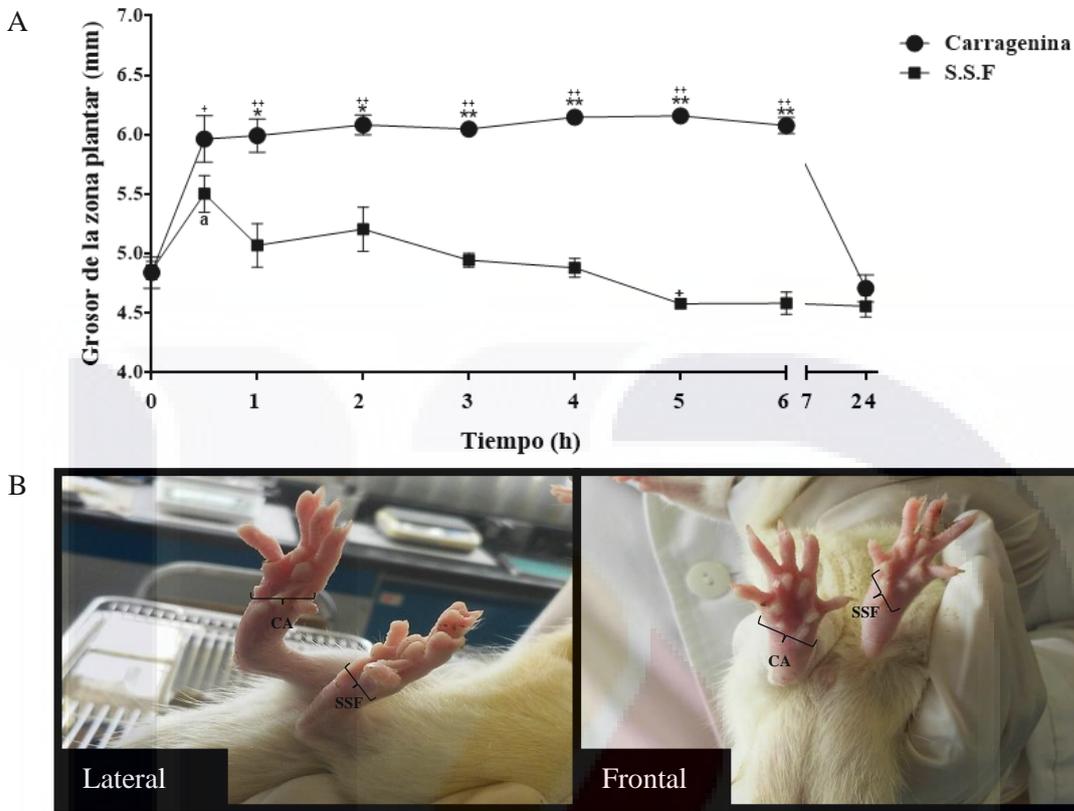


FIGURA 20. Cinética de inflamación del edema plantar inducido por la inyección de CA al 1%. A) Grosor del edema plantar en función del tiempo tras la inyección de CA o S. S. F. n= 5, t-Student; *p<0.01 vs S.S.F; **p<0.001 vs S.S.F; a p<0.01 vs al tiempo 0; + p<0.01++ p<0.001 vs CA al tiempo 0. **B)** Imágenes de las patas con edema plantar generado por la inyección de CA (pata derecha) o SSF (pata izquierda), en una vista lateral y frontal.

Una vez establecida la estandarización del modelo de inducción de edema por acción de la CA, se llevó a cabo la evaluación del efecto antiinflamatorio del AL, como tratamiento profiláctico administrado desde 12 ó 3 días previos a la inducción del edema o como tratamiento terapéutico, administrado hasta el día de la inducción del modelo de inflamación aguda. Este efecto, fue comparado con el efecto generado por la administración de 5mg/Kg del peso del animal de indometacina, 30 minutos antes de la inducción del edema. Para comparar el efecto de los diferentes tratamientos los resultados se normalizaron, restando el volumen de la pata izquierda generado por la

inyección de S. S. F, al volumen generado en la pata derecha tras la inyección de CA en cada uno de los animales a los diferentes tiempo analizados.

Los resultados graficados en la figura 21-A en relación al efecto del AL como tratamiento profiláctico de 12 días, mostraron nuevamente que solo la administración de CA (grupo C) induce la formación de edema a partir de los primeros 30 minutos, y que este se ve incrementado a la hora, manteniéndose constante en las siguientes horas de evaluación, para finalmente regresar a su estado basal a las 24 h. El incremento del edema plantar se vio reducido de un 43 a 48% tras la administración de la indometacina en los animales del grupo I; sin embargo, solo fue estadísticamente significativo a 1 (0.68 ± 0.18 vs 1.31 ± 0.19 ; $p < 0.05$), 2 (0.71 ± 0.17 vs 1.39 ± 0.22 ; $p < 0.05$), 5 (0.66 ± 0.22 vs 0.71 ± 0.14 ; $p < 0.01$) y 6 (0.71 ± 0.14 vs 0.27 ± 0.07 ; $p < 0.05$) h de haber inducido el modelo inflamatorio, alcanzando nuevamente su estado basal a las 24 (0.21 ± 0.10 vs 0.27 ± 0.07) h. Sin embargo, no se observó un efecto protector por parte del AL en ninguno de los tiempos evaluados, 0.5 (0.36 ± 0.17 vs 0.67 ± 0.14), 1 (1.32 ± 0.15 vs 1.31 ± 0.19), 2 (1.23 ± 0.21 vs 1.39 ± 0.22), 3 (1.23 ± 0.19 vs 1.32 ± 0.22), 4 (1.01 ± 0.31 vs 1.42 ± 0.29), 5 (1.26 ± 0.28 vs 1.54 ± 0.16) y 6 (1.25 ± 0.26 vs 1.43 ± 0.23) h, hasta desaparecer el proceso inflamatorio a las 24 (0.55 ± 0.11 vs 0.27 ± 0.07) h como en los otros grupos.

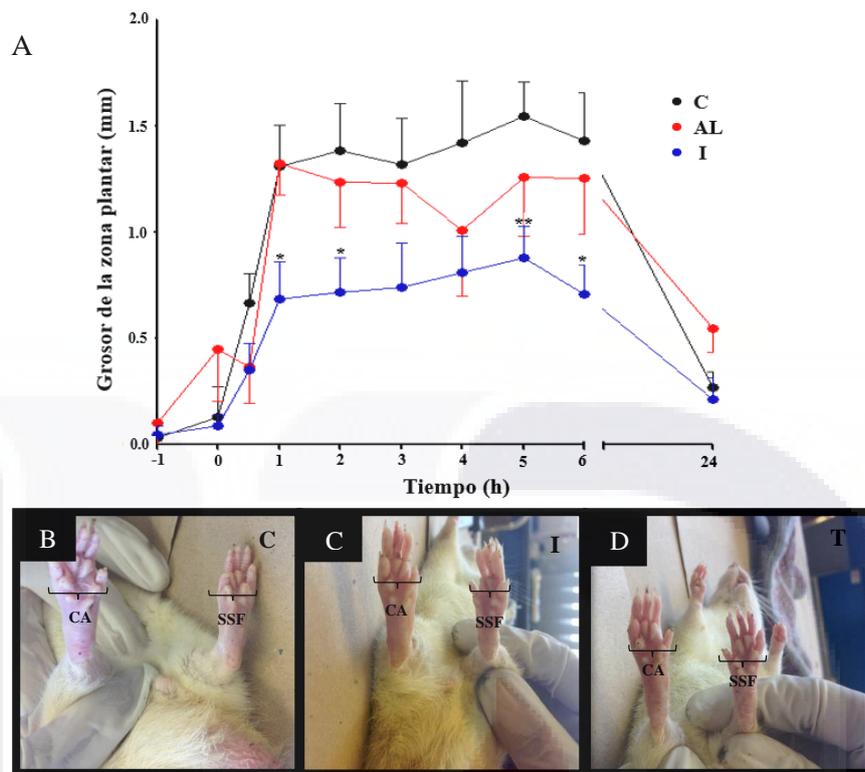


FIGURA 21. Efecto del AL como tratamiento profiláctico de 12 días. A) Incremento del grosor del edema plantar inducido por la inyección de CA en función del tiempo. t-Student * $p < 0.05$ vs C y ** $p < 0.01$ vs C; $n = 5$. Ejemplo de procesos inflamatorios generados por la administración de CA en la zona plantar de la pata derecha en ratas: B) sin tratamiento, C) tratadas con indometacina (I) y D) tratadas con AL desde 12 días previos a la inducción del modelo de inflamación aguda.

Al igual que el tratamiento anterior, se observó que el tratamiento profiláctico de 3 días (fig. 22) tampoco ejerce un efecto protector definido sobre la formación de edema plantar inducido por CA a las 0.5 (0.91 ± 0.11 vs 0.67 ± 0.14), 1 (0.82 ± 0.17 vs 1.31 ± 0.19), 3 (1.02 ± 0.21 vs 1.32 ± 0.22), 4 (0.93 ± 0.28 vs 1.42 ± 0.29), 5 (1.10 ± 0.26 vs 1.54 ± 0.16) y 6 (1.16 ± 0.24 vs 1.43 ± 0.23) h con respecto al formado por los animales del grupo C. Aunque cabe indicar que se presentó una fuerte disminución, estadísticamente significativa, en el grosor del edema a las 2 h, caída que fue de 74 % ($0.35 \text{ mm} \pm 0.29$ vs $1.92 \text{ mm} \pm 0.24$, $p < 0.05$), aunque esta fue momentánea. Finalmente, las ratas del grupo T alcanzaron su grosor basal a las 24 h (0.19 ± 0.09 vs 0.27 ± 0.07). En cuanto a la indometacina, se observó que esta mantuvo su efecto antiinflamatorio, como se mostró en el protocolo antes mencionado en la figura 21.

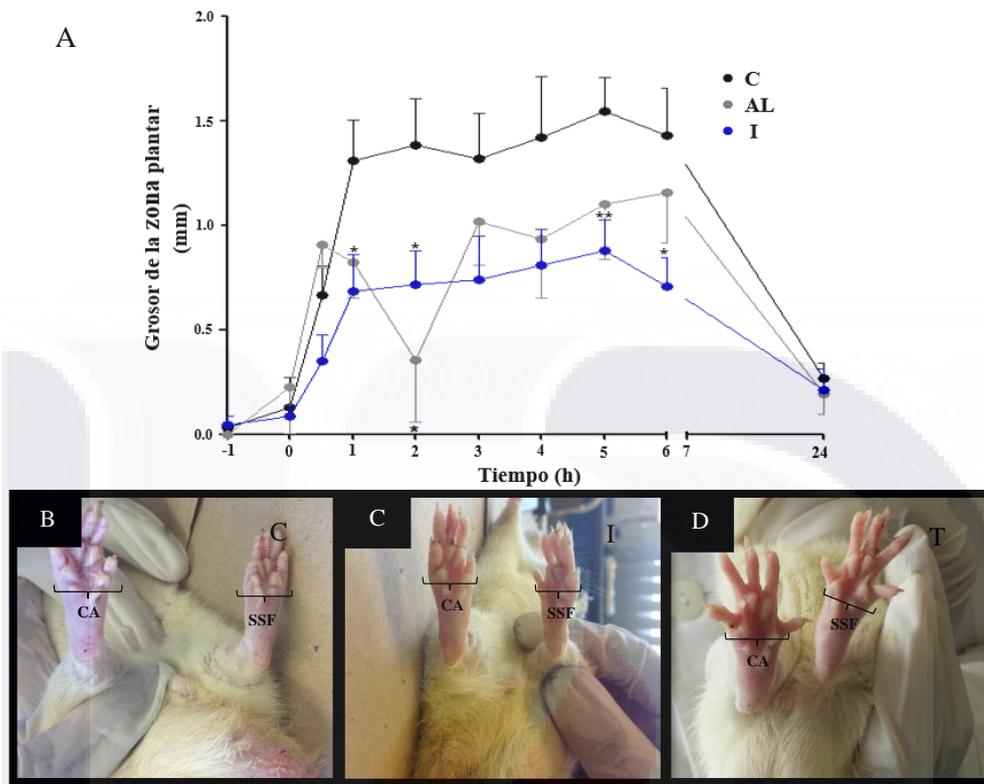


FIGURA 22. Efecto antiinflamatorio del AL como tratamiento profiláctico de 3 días. A) Incremento del grosor del edema plantar inducido por la inyección de CA en función del tiempo. t-Student * $p < 0.05$ vs C y ** $p < 0.01$ vs C; $n = 5$. Ejemplo de procesos inflamatorios generados por la administración de CA en la zona plantar de la pata derecha en ratas: B) sin tratamiento, C) tratadas con indometacina (I) y D) tratadas con AL desde 3 días previos a la inducción del modelo de inflamación agudo.

Al comparar el grupo tratado con AL profiláctico de 3 días y el grupo tratado con AL profiláctico de 12 días, se observa una diferencia en la tendencia antiinflamatoria de ambos tratamientos. Se puede advertir, que el grupo de AL profiláctico de 3 días, parece tener una mayor tendencia antiinflamatoria que el grupo de AL profiláctico de 12 días. Este fenómeno se puede apreciar a todos los tiempos en los que se monitoreó el tamaño del edema, siendo más pronunciado a las 2 h, en donde el edema que se formó en el grupo de AL profiláctico de 3 días, fue de 0.35 ± 0.21 mm, mientras que en el grupo de AL profiláctico de 12 días, se formó un edema que medía 1.23 ± 0.21 mm.

El tratamiento terapéutico con AL no ejerció efecto antiinflamatorio en el modelo de inflamación aguda, en ninguno de los tiempos evaluados con respecto a los edemas formados por los animales del grupo C; es decir, 0.5 (0.32 ± 0.09 vs 0.330 ± 0.11), 1 (0.83 ± 0.18 vs 0.94 ± 0.14), 2 (0.97 ± 0.21 vs 0.06 ± 0.16), 3 (1.28 ± 0.26 vs 1.27 ± 0.17), 4 (1.27 ± 0.24 vs 1.46 ± 0.13), 5 (1.27 ± 0.16 vs 1.59 ± 0.11) y 6 (1.19 ± 0.19 vs 1.33 ± 0.14) h. Resaltándose nuevamente el efecto antiinflamatorio de la indometacina en los animales del grupo I a las 4 (0.81 ± 0.17 vs 1.46 ± 0.13 ; $p < 0.01$), 5 (0.88 ± 0.15 vs 1.59 ± 0.11 ; $p < 0.01$) y 6 (0.71 ± 0.14 vs 1.33 ± 0.14 ; $p < 0.01$) h (fig. 23).

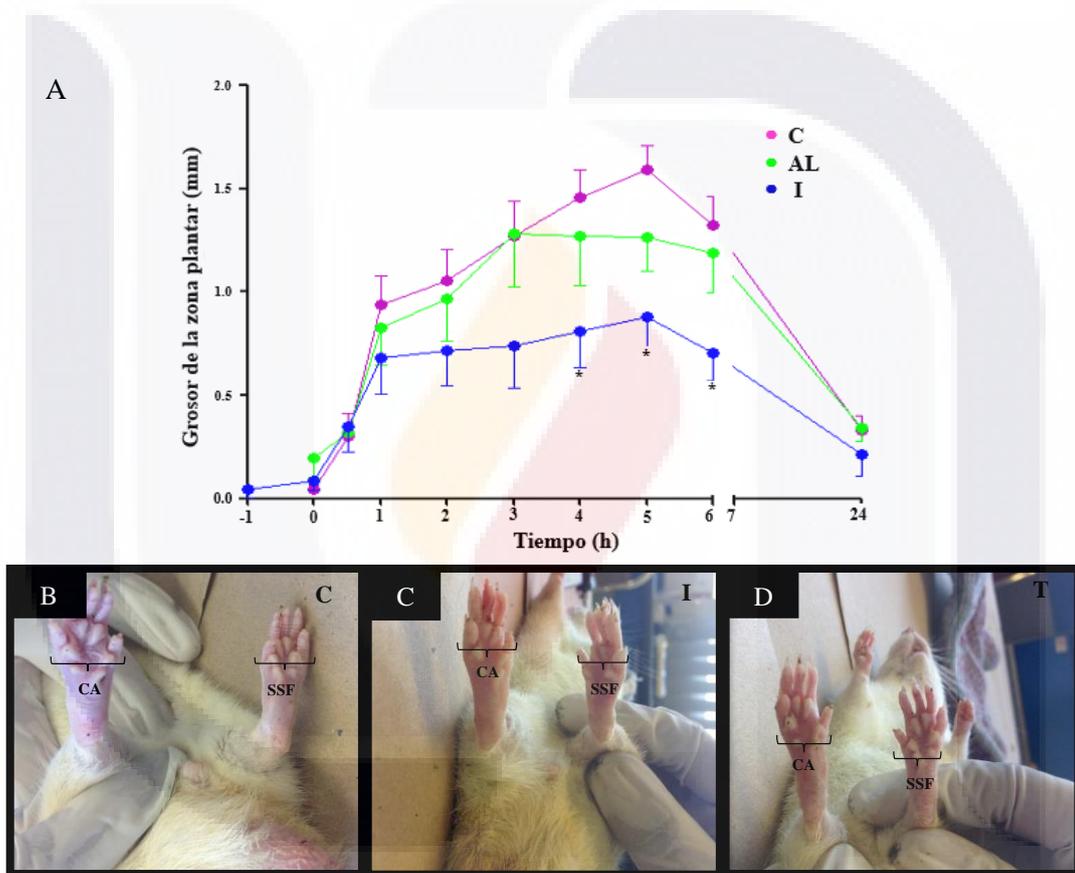


FIGURA 23. Efecto antiinflamatorio del AL como tratamiento terapéutico. A) Incremento del grosor del edema plantar inducido por la inyección de CA en función del tiempo. t-Student; * $p < 0.01$ vs C; $n = 5$. Ejemplo de procesos inflamatorios generados por la administración de CA en la zona plantar de la pata derecha en ratas: B) sin tratamiento, C) tratadas con indometacina (I) y D) tratadas con AL el mismo día de inducción del edema.

7.3. EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL ACETATO DE LEUPROLIDA SOBRE UN MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMACIÓN CRÓNICA

Para determinar el efecto antiinflamatorio del AL sobre un modelo de inflamación crónica primeramente se estandarizó el modelo de inducción de granuloma por pastilla de algodón en rata Wistar (fig. 24-A). Para esto, se implantaron subcutáneamente, pastillas de algodón de 10 y 50 mg, tanto en axila como en ingle. Como se observa en la figura 24, en ambos casos se desarrollaron los granulomas, aunque estos presentaron un mayor tamaño en las pastillas de 50 mg respecto a las de 10 mg tanto en axila (97.37 ± 13.53 vs 28.99 ± 4.97 ; $p < 0.001$) como en las ingles (123.03 ± 29.63 vs 23.48 ± 3.83 ; $p < 0.05$). Sin embargo, los granulomas de 50 mg, ocasionaron pequeñas hemorragias en los animales, mayor estrés y una mayor propensión a las infecciones. La formación del granuloma con ambos tamaños de pastilla fue evidente, con un mayor error estándar en las pastillas de 50 mg, tanto para ingle como en axila. Por lo que se seleccionaron las pastillas de 10 mg para el desarrollo del modelo crónico (fig. 24-B).

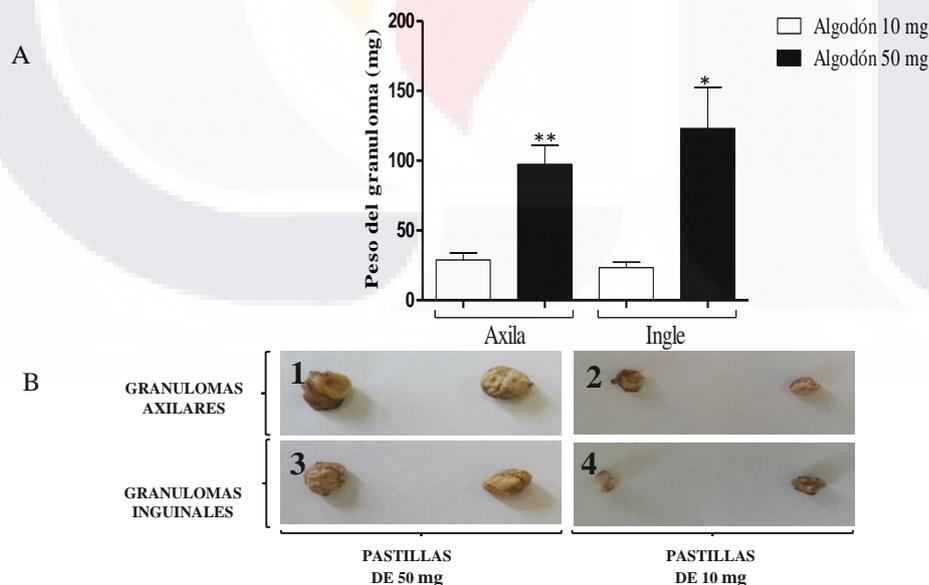


FIGURA 24. Estandarización del modelo de inflamación crónica. A) Peso de granuloma por la inserción de pastillas 10 y 50 mg de algodón en axila e ingle. t-Student; * $p < 0.01$ vs algodón 10 mg inguinal y ** $p < 0.001$ vs algodón 10 mg axilar; $n = 5$. B) Ejemplo de granulomas llevados a su peso constante, inducidos por pastillas de 10 y 50 mg de algodón en axila e ingle.

El efecto antiinflamatorio crónico del AL se evaluó como tratamiento profiláctico tras la administración de éste por 12 ó 3 días previos a la inducción del granuloma y como tratamiento terapéutico, tras su administración posterior a la inducción del mismo (fig. 25). Los resultados mostraron que el AL como tratamiento profiláctico de 12 ($22.13 \text{ mg} \pm 0.95$) y 3 ($22.17 \text{ mg} \pm 1.15$) días indujo porcentajes de inhibición de -3.29 y -3.05 %, y como tratamiento terapéutico ($18.04 \text{ mg} \pm 1.02$), de 12.29 %; en ninguno de los tratamientos el AL tuvo un efecto antiinflamatorio significativo sobre la formación del granuloma axilar respecto al control (21.47 ± 0.81 y 20.57 ± 0.99 profiláctico y terapéutico, respectivamente). La indometacina exhibió un porcentaje de inhibición del granuloma significativo, de un 22.04 % ($p < 0.01$).

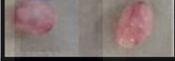
	Grupos	Peso del granuloma axilar en mg	Porcentaje de inhibición de granuloma axilar	Valor n
	C (profiláctico)	21.47 ± 0.81	0%	(n=3)
	I	5.43 ± 1.78	22.04%*	(n=6)
	AL (profiláctico de 12 días)	22.13 ± 0.95	-3.05%	(n=6)
	AL (profiláctico de 3 días)	22.17 ± 1.15	-3.29	(n=5)
	C (control terapéutico)	20.57 ± 0.99	0%	(n=5)
	AL (terapéutico)	18.04 ± 1.02	12.29%	(n=5)

FIGURA 25. Efecto profiláctico y terapéutico del AL sobre la inhibición de la formación del granuloma. A) Los valores están expresados como la media \pm SEM; t-Student; * $p < 0.01$ vs C axilar. B) Imágenes de dos de los granulomas formados en cada uno de los grupos.

8. DISCUSIONES

Durante el desarrollo de este trabajo ha quedado en evidencia que el AL no posee efecto tóxico sobre los mastocitos, célula clave en el inicio de la respuesta inmune innata. Además, se ha demostrado que el análogo sintético de la GnRH aquí evaluado, administrado vía IM a una dosis de 10 µg/Kg de peso corporal, no ejerce efecto antiinflamatorio en modelos experimentales de inflamación aguda y crónica en rata Wistar. Es decir, sobre el desarrollo del edema plantar inducido por carragenina y en el desarrollo del granuloma axilar, subcutáneo, inducido por pastilla de algodón.

Como se observó anteriormente, primero se establecieron las condiciones adecuadas para la evaluación de la toxicidad de AL mediante la técnica de MTT, sobre los cultivos de mastocitos. Estableciendo que a las 24 h, las células mantienen estable la densidad celular. Pues conforme pasa más tiempo, estas por si solas comienzan a morir, probablemente debido al desgaste de nutrientes. Además este tiempo, coincide con el reportado por otros autores durante pruebas de citotoxicidad de nanopartículas en mastocitos peritoneales murinos (Haynes *et al.*, 2006) y mastocitos diferenciados de sangre periférica (Jones *et al.*, 2010). Por lo tanto, las 24 h de incubación, fue el tiempo óptimo que permitió establecer si el AL tenía un efecto tóxico sobre los mastocitos, descartando de esta manera, que la muerte celular se pudiera estar dando por otras condiciones en el medio basal que fueran inadecuadas. Así mismo, en la búsqueda de un compuesto tóxico de referencia, para poderlo comparar con el efecto que tenía el AL sobre los mastocitos, se determinó la concentración letal mínima necesaria del DMSO. El DMSO (CH₃SOCH₃), ha sido empleado como medicamento para reducir el dolor y la inflamación por su capacidad de eliminar especies reactivas de oxígeno (Santos *et al.*, 2003); sin embargo, tiene la capacidad de ocasionar efectos adversos a las células, ya que interacciona directamente con el metabolismo y las membranas celulares (Brayton *et al.*, 1986). Acción dependiente del tiempo de exposición y de la concentración del mismo (Branch *et al.*, 1994; Malinin & Perry, 1967). De ahí que se probó concentraciones del 1 al 20%, concentraciones generalmente reportadas con efecto citotóxico en diferentes líneas celulares (Violante *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren, que a partir de una

concentración del 2.5% aproximadamente, el DMSO se vuelve nocivo para las células, alcanzando su máximo efecto tóxico a partir del 5%.

Algunos mecanismos moleculares por los cuales actúa el DMSO, han sido descritos por McConnell y colaboradores (1999), quienes reportaron que en eritrocitos humanos, el DMSO inhibía a la calmodulina dependiente de calcio, que estimula a la ATPasa ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) y a la ATPasa ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$), en cambio, no afectó el funcionamiento de la calmodulina independiente de calcio que estimula a la ATPasa ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$), lo que explicaría por qué el DMSO afecta el funcionamiento de las células (Ogura *et al.*, 1995). De la misma manera, se ha reportado que esta alteración de los niveles de calcio en el interior de la célula, conlleva a una alteración metabólica del glucógeno y a una muerte celular progresiva (Liu *et al.*, 2009).

In vitro, se ha reportado que el DMSO induce apoptosis a una concentración mayor del 10% (v/v), debido a su capacidad de atravesar las membranas celulares mediante la formación de poros (Notman *et al.*, 2006; Hanslick *et al.*, 2009). La concentración más baja a la cual este compuesto induce apoptosis, se reportó en células EL-4, a una concentración del 2.5% (v/v), por medio de un desbalance en la vía mitocondrial, mediada por caspasas 3 y 9, asociada a una disminución de la expresión de Bcl-2 (células de linfoma B2), a la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial y a la liberación del citocromo c de la mitocondria hacia el citoplasma (Liu *et al.*, 2001). Por lo tanto, estos mecanismos tóxicos sobre los cuales actúa el DMSO a concentraciones mayores del 1%, podrían ser los que estén induciendo la muerte de los mastocitos a las 24 h de incubación.

Debido a que Carou y colaboradores en el 2015, observaron que la GnRH, así como el AL (a una dosis de 100 nM), provocan apoptosis en las células granulosas ováricas, además de participar en otros procesos apoptóticos naturales que se centran inicialmente en el ovario, se decidió probar que el AL era inocuo en mastocitos, ya que con células importantes en la respuesta inflamatoria.

Nuestros resultados demuestran que el AL no presenta efecto tóxico sobre mastocitos. De hecho, se sabe que la hormona liberadora de gonadotropinas tipo I (GnRH-I), es transcrita y sintetizada por los mastocitos presentes en cerebro de rata,

además de presentar receptores para dicha hormona (Silverman *et al.*, 2002; Liebbenow, 2013). También se encontró que el número de estas células, se ve incrementado en respuesta a esta hormona por estímulos sexuales de comportamiento (Khalil *et al.*, 2003).

No hay estudios que hablen de la toxicidad del AL o de la GnRH en mastocitos, sin embargo, sí hay reportes del efecto exógeno que presenta la GnRH en macrófagos, al incrementar los niveles de Ca^{2+} intracelulares, los cuales se elevan con un aumento de la concentración de GnRH en el medio extracelular. Además, se menciona que a una concentración de 1 μ M y 10 μ M de GnRH exógena, el Ca^{2+} se eleva en el interior del macrófago a 100 nM y a 150 nM; sin embargo, a una concentración más elevada de 300 μ M, ya no se observa efecto alguno. De estos hallazgos, los autores resaltan la importancia de tomar en cuenta que un incremento regulado en los niveles de Ca^{2+} citosólico, son importantes para echar a andar varios mecanismos fisiológicos que son esenciales para el correcto funcionamiento de una célula. Por el contrario, cuando hay un incremento desmedido de Ca^{2+} , éste pasa a ser tóxico. De acuerdo a lo anterior, la GnRH exógena, a estas concentraciones, es tóxica. Nicosia (1979) menciona que se requiere tan solo una concentración citosólica de 1-10 μ M, que se sostenga por algunos minutos y que sea suficiente para conducir a una serie de alteraciones metabólicas, eléctricas y estructurales, que consecuentemente conducen a la muerte de la célula. Estas alteraciones, tal parece que están mediadas por la sobreactivación de varias enzimas que dependen de determinadas concentraciones de Ca^{2+} , como es la proteína quinasa C, la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+}/Mg^{2+} , fosfolipasas, proteasas, xantina oxidasa, endonucleasas e iNOS (Farber, 1990).

Como ya se mencionó, en las pruebas de toxicidad con AL, no sólo no se aprecia un efecto tóxico, sino que además, hay un incremento en la absorbancia arrojada por el espectrofotómetro (producto del metabolismo de las sales de tetrazolio), a las 24 h después de haber incubado las células con sus respectivos tratamientos. Este incremento se hace significativo respecto al control, a la dosis de 500 nM. El hecho de que el AL no sea citotóxico en estas células, no es de extrañar, ya que como se ha mencionado en párrafos anteriores, existen varios estudios que reportan la presencia de la GnRH en varias células extrahipotalámicas, entre ellas, las células del sistema

inmune, como son los linfocitos, en donde claramente se ha visto que se expresa el gen que codifica para la síntesis de dicha hormona.

Aparentemente, el incremento en el porcentaje de viabilidad celular (correlacionado con el aumento de la concentración de AL), el cual se refleja en la formación de cristales de formazan, es producto del metabolismo de las sales de tetrazolio por acción de enzimas con capacidad óxidoreductasa. De acuerdo con esto, se puede interpretar que posiblemente haya una modificación en el metabolismo de los mastocitos, específicamente por incremento en los niveles de enzimas óxidoreductasas, ya que se ha reportado que estas células también tienen estas enzimas, como es la lactato deshidrogenasa (Bello *et al.*, 1997). Esta suposición se apoya en el estudio llevado a cabo por Jones y Hsueh (1982), en donde se reportó que al incubar las células granulosas obtenidas de ovario de ratas hipofisectomizadas con GnRH, había un aumento de 2.7 veces más en la actividad de la enzima 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, la cual es una enzima que convierte a la progesterona en un metabolito menos activo. En dicho artículo, los autores concluyeron que la GnRH inducía un decremento en la producción de progesterona en células ováricas, posiblemente relacionado con la alteración en la actividad y expresión de algunas enzimas que participan en las vías esteroidogénicas y que tienen capacidad óxidoreductasa, como es la 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Al mismo tiempo, también reportaron que los efectos inhibitorios en la producción de progesterona por parte de la GnRH se podían contrarrestar de manera concomitante con prolactina.

Resultados similares fueron encontrados por Jones y Hsueh (1982), quienes reportaron que tras la incubación de células granulosas de ovario de ratas hipofisectomizadas con GnRH sola, había un incremento significativo (7.7 veces más) en los niveles de expresión de la proteína 3- β hidroxiesteroide deshidrogenasa (enzima que cataliza la síntesis de la progesterona desde la pregnenolona), lo que indica que la GnRH podría estar favoreciendo la proliferación. Además, también se encontró que la incubación de estas mismas células con FSH también incrementaba de manera significativa los niveles de 3- β hidroxiesteroide deshidrogenasa, sin embargo, la incubación de las células granulosas de ovario con ambas hormonas, producía un decremento en la expresión de esta misma proteína y que al emplear un antagonista de

la GnRH, este efecto inhibitorio se veía contrarrestado, lo que sugiere, que por sí sola, la GnRH también activa la expresión de esta proteína con actividad óxidoreductasa.

El incremento en la producción de cristales de formazan por parte de los mastocitos, al ser incubados con AL, también podría deberse a que favorece la proliferación celular. Dentro de los efectos del AL que se han vislumbrado recientemente, sobre las células del sistema inmune, se ha reportado una respuesta proliferativa en conjunto con el mitógeno Con A y que se correlaciona positivamente con la dosis empleada en timocitos de rata. Tal respuesta fue abolida después de utilizar anti-GnRH para bloquear los receptores de GnRH (Marchetti *et al.*, 1989). En otro estudio llevado a cabo por Batticane y colaboradores en el año de 1991, se reportó que los esplenocitos y los timocitos del proestro, al ser incubados con GnRH o algunos de sus análogos, la actividad basal proliferativa de estas células se veía incrementada junto con un aumento en el número de receptores positivos para IL-2.

Si bien es cierto, hasta el momento se pensaba que los mastocitos proliferaban estrictamente en la médula ósea roja y que una vez que estos migraban a los tejidos linfáticos periféricos, alcanzaban su madurez, diferenciándose y perdiendo de esta manera, su capacidad para dividirse. Sin embargo, en investigaciones recientes, se ha visto que los mastocitos maduros provenientes del epitelio humano, son capaces de proliferar al ser estimulados con el factor de células madre o stem cell factor (SCF). Sin embargo, el incremento en la formación de cristales de formazan, es poco probable que se deba a un efecto proliferativo de los mastocitos inducido por el AL. Esto se debe a que, en estudios llevados a cabo en mastocitos epiteliales humanos maduros, se observaba una proliferación de los mismos al término de 4 a 8 semanas en un medio libre de suero (Kambe *et al.*, 2016). A diferencia de ese estudio, en este trabajo, la incubación de los mastocitos peritoneales de rata duró únicamente 24 h, sin embargo, haría falta hacer más pruebas para descartar la posibilidad de que haya proliferación de estas células a las 24 h de haber incubado con AL a distintas concentraciones. Por lo tanto, se considera que sería interesante observar más a fondo el efecto que tiene el AL sobre las distintas células que participan en la respuesta inflamatoria, para así, rectificar el hecho de que este compuesto puede o no generar un efecto proliferativos sobre dichas células.

Los resultados dejan claro, que la CA si está generando una respuesta inflamatoria y que la S. S. F no desencadena ningún tipo de reacción inflamatoria, ya que el edema que inicialmente se había formado por la inyección de la SSF, va disminuyendo conforme pasa el tiempo, principalmente por reabsorción de la misma en los tejidos. Esta cinética de inflamación de la CA al 1%, coincide con la mostrada por Morris (2000), en donde menciona que el punto máximo de inflamación inducido por CA al 1% (tipo lambda), es alrededor de las 5 h de haber inyectado la misma. La importancia de este modelo, radica en el hecho de que representa una inflamación que se caracteriza por ser de tipo aguda, de carácter no inmune, muy bien descrita y que es altamente reproducible. A grandes rasgos, la inflamación por CA ha sido dividida en 2 fases: la primera fase es causada por la liberación de histamina y serotonina principalmente, lo que explicaría la formación del edema en sí. La segunda fase es causada por la liberación de bradicinina, prostaglandinas, proteasas y lisozimas, lo que explicaría el dolor. De ambas fases, se ha reportado que la segunda fase es la más susceptible a la acción de agentes antiinflamatorios como la indometacina (Mukherjee, 2002).

Por otro lado, el AL administrado como tratamiento profiláctico de 12 días, no tiene un efecto antiinflamatorio significativo que se vea reflejado en la reducción del edema plantar que se formó tras haber inyectado la CA. De acuerdo a la curva del AL, si hay momentos en los que se aprecia una tendencia a reducirse el edema, en comparación con la curva control, sin embargo, tal efecto no fue estadísticamente significativo, como fue el caso de la indometacina. En el efecto antiinflamatorio por parte del AL como profiláctico de 3 días también hay una tendencia antiinflamatoria, pero al igual que el grupo tratado con AL profiláctico de 12 días, este efecto no fue estadísticamente significativo, a excepción de las 2 h. El efecto antiinflamatorio del tratamiento terapéutico con AL, tampoco muestra señales de que inhiba la formación del edema. De hecho, la curva del AL se comporta de una manera similar a la curva del control, durante las primeras 4 h de haber inyectado la CA.

A pesar de tener evidencia de los efectos inmunomoduladores que tiene AL, no se ha establecido a que dosis y a que tiempos de administración, este efecto se ve exacerbado o mermado. Hay que tomar en cuenta, que el efecto del AL es retardado,

como se muestra en el estudio de Díaz-Galindo y colaboradores (2015), en el cual, se reporta que hubo una mejora en el control de la micción (60%) y en la locomoción (38%) de ratas con daño en la médula espinal, al administrar AL a una dosis de 10 µg/Kg durante 5 semanas. Además, en este mismo estudio también se demostró que hubo una disminución en el número de células de la microglia, las cuales participan en enfermedades autoinmunes de carácter crónico como la esclerosis múltiple (Deng & Sriram, 2005). Esto sugiere que el AL requiere de tiempos prolongados para ejercer un efecto antiinflamatorio, lo que explicaría porque no está funcionando como antiinflamatorio en nuestro estudio.

En cuanto al modelo crónico de inducción de granuloma por pastilla de algodón, los grupos tratados con AL, a manera de tratamiento profiláctico, no mostraron tener un efecto inhibitorio del crecimiento del granuloma cuando se aplicó 3 y 12 días antes de la inducción del mismo, en comparación con el grupo control. Por otro lado, el grupo al cual se le administró AL a manera de tratamiento terapéutico, si presentó un ligera inhibición en el crecimiento, sin embargo esta no fue estadísticamente significativa respecto al control.

La ausencia de un efecto antiinflamatorio posiblemente se deba a que el AL deba de ajustarse a una dosis y a un tiempo determinado, en donde lo ideal sería mantener dosis altas a tiempos cortos o dosis bajas en tiempos prolongados. La razón por la cual se resalta la importancia de no administrar dosis muy altas, ni de una manera prolongada y consecutiva, se debe a que el AL tiene una vida media de 3.6 h después de una administración por vía subcutánea y una vida media de 2.9 h después de una administración IV (Sennello *et al.*, 1986) en el organismo y su efecto se mantiene incluso después de que éste se ha eliminado del sistema (Chrisp & Sorkin, 1991). Aunado a esto, la GnRH (y por lo tanto, el AL), es una hormona liberadora de gonadotropinas, que es liberada por el hipotálamo, cuyo centro de acción es la hipófisis. Este decapeptido, se conoce inicialmente porque estimula la liberación de gonadotropinas (hormona luteinizante, LH, y folículo estimulante, FSH) por parte de la adenohipófisis. Por otro lado, las gonadotropinas poseen su centro de acción en las gónadas masculina y femenina, por lo que los niveles de la GnRH, están regulados por mecanismos de retroalimentación gracias a los andrógenos y estrógenos liberados por las gónadas, que actúan en el hipotálamo rápidamente.

La razón por la cual se utilizó la dosis de 10 $\mu\text{g/Kg}$ de AL, fue porque en el estudio llevado a cabo por Díaz-Galindoy colaboradores (2015), en el cual se reportó que en ratas con una lesión medular que las había dejado con las extremidades posteriores prácticamente inmóviles, se observaba una correlación positiva entre la dosis de AL y la recuperación del movimiento de estas extremidades. Los autores trabajaron con tres dosis: la dosis más baja de 1.2 $\mu\text{g/Kg}$, la dosis media de 5 $\mu\text{g/Kg}$ y la dosis más alta de 10 $\mu\text{g/kg}$. La dosis más alta resultó dar una recuperación casi completa del movimiento de las extremidades posteriores, mientras que en las otras dosis hubo ratas que no se recuperaron. De ahí que se esperaba que al utilizar la concentración más alta, hubiese una correlación positiva entre la misma y el porcentaje de inhibición del granuloma.

Otra variable que puede estar influyendo sobre la ausencia de actividad antiinflamatoria es el tiempo de administración del AL. Esto se pone de manifiesto por que en el modelo del granuloma hay un mejor efecto antiinflamatorio cuando la misma dosis de AL se utiliza a un tiempo menor. Es decir, al grupo al cual se le administró por menos tiempo el AL, fue al terapéutico, el cual mostró un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento del granuloma, en comparación con los grupos profilácticos de 3 y 12.

Hay evidencia de que el AL tiene un efecto inmunomodulador en algunas patologías e incluso se conoce el mecanismo. Por ejemplo, Guzmán y colaboradores (2015), mostraron que el AL a una dosis de 1.2 $\mu\text{g/Kg}$, reduce los niveles de expresión de la subunidad p65 (la cual es necesaria para a activación del NF- κB), en un 73.09, 48.97 99.31 y 94.79% en los días 13, 24 y 30 en ratas ovariectomizadas y con EAE, en comparación con el grupo que fue tratado únicamente con 100 μl de S. S. F, alcanzando valores similares al grupo control. Consecuentemente, se observó que al haber una disminución de la subunidad p65, también había una disminución en los niveles de expresión del RNAm de las citocinas IL-1 β , IL-17 y TNF- α . En este trabajo se concluyó, por tanto, que había una correlación positiva ente la disminución de los niveles del NF- κB activo y una evidente mejora en los signos clínicos de los animales con EAE. La EAE, es un modelo que imita a la esclerosis múltiple, la cual es una enfermedad autoinmune, que se caracteriza por un proceso inflamatorio de tipo crónico. Como ya se mencionó, en este artículo se reporta que el AL sí tiene un efecto

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

inmunomodulador de tipo antiinflamatorio relacionado con una disminución del NF- κ B en conjunto con la subunidad p65. Sin embargo, a diferencia de lo esperado, en los modelos de inflamación llevados a cabo en nuestro trabajo, no se observa este efecto. Hay que tomar en cuenta que los modelos de inflamación y las variables que en cada uno de ellos se mide son distintas, es decir, mientras en el modelo de EAE se evalúan signos clínicos, como el movimiento de los animales, el peso, el control sobre la micción y factores moleculares, en nuestro modelo se miden variables más austeras, como es el peso del granuloma en el caso del modelo crónico y el tamaño del edema en el caso del modelo agudo. Además, seguramente haya una serie de factores que podrían haber opacado el efecto antiinflamatorio del AL en este modelo de inflamación crónica. Uno de ellos, podría ser la condición en que se encontraban los animales, ya que mientras que en el estudio de Guzmán, las ratas están ovariectomizadas (castradas), nuestros animales no lo estaban, y esto, a la larga, produce un ruido ocasionado por el pico máximo de hormonas (LH y FSH), que se genera a las 2 h de haber administrado la primera dosis de AL. Aunque se ha reportado que a una dosis crónica o una sola dosis muy elevada de AL (10 a 100 μ g/Kg), ocasionan paradójicamente una marcada inhibición del efecto de la liberación de gonadotropinas y una atrofia gonadal (Okada *et al.*, 1983).

Por otro lado, las dosis de AL utilizadas, son en esencia, completamente diferentes, ya que en este estudio, se empleó una dosis de AL de 10 μ g/Kg, a diferencia de la dosis de 1.2 μ g/kg que fue utilizada por Guzmán y colaboradores. Como ya se sabe, el AL, a diferencia de su precursor original que es la GnRH, resiste más al ataque de las endopeptidasas, lo que le concede una vida media mayor en el organismo y además, tiene una mayor afinidad por los receptores de GnRH que la misma GnRH, lo que le confiere la capacidad de potenciar sus efectos, efectos que se ven todavía incrementados por un aumento en la dosis. Por lo tanto, una administración continua de este compuesto o una sola administración a dosis muy elevadas, a la larga inhibe el eje hipofisario gonadal, con una consecuente desensibilización de las células gonadotropas que se correlaciona positivamente con la dosis de AL empleada y una disminución sérica progresiva de las hormonas FSH y LH, de las cuales, está última ha mostrado tener propiedades inmunomoduladoras (Wilson *et al.*, 2007).

Díaz-Galindo y colaboradores (2015), utilizando la dosis de AL de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y evaluando la recuperación de ratas Wistar hembras ovariectomizadas a las que se les indujo un daño en la médula espinal, determinan que la administración de AL promueve nuevamente el movimiento de los animales, el control sobre la micción, la recuperación de la morfología de la médula espinal y el incremento en el número de las células de microglia en el sitio de lesión. Las diferencias entre el trabajo de Díaz-Galindo y el nuestro radican en el estado de castración de los animales, la cepa de rata empleada y los tiempos de administración del AL. En el estudio de Díaz-Galindo, se administró por 3 días consecutivos el AL y después de administró cada 4 días por 5 semanas consecutivas. Estos factores evidentemente generan una serie de variables que se comportan completamente diferente en nuestros animales y los animales empleados en el estudio de Guzmán y Díaz-Galindo.

La evidencia de las propiedades inmunomoduladoras y los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que es necesario hacer más estudios en ratas preferentemente castradas, para evitar esos cambios en las variables. Además, por lo reportado en el trabajo de Guzmán y colaboradores, también se considera que deben utilizarse dosis más bajas de AL y con lapsos de tiempo más prolongados entre una administración y otra.

9. CONCLUSIONES

En las pruebas de toxicidad llevadas a cabo en los mastocitos aislados de la cavidad peritoneal de rata Wistar, no se observa un efecto tóxico por parte del AL a ninguna dosis. A diferencia de esto, a dosis altas de AL.

El AL, administrado como tratamiento terapéutico o como tratamiento profiláctico, no posee efecto antiinflamatorio a una dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, tanto en el modelo de inflamación crónica de inducción de granuloma por pastillas de algodón, como en el modelo de inflamación aguda de inducción de edema plantar por acción de la CA.

10. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abe, R., Donnelly, S. C., Peng, T., Bucala, R., y Metz, C. N. (2001). Peripheral Blood Fibrocytes: Differentiation Pathway and Migration to Wound Sites. E. U. S. The Journal of Immunology: 166, 7556–7562.
- Akaza, H., Aso Y., Koiso K., Fuse H., y Isurugi, K. (1990). Leuporelin acetate depot: results of a multicentre Japanese trial. Japón. Journal of International Medical Research: 90-102.
- Ali, F., Khan, B. A., y Saewat, S. (2016). Wedelolactone mitigates UVB induced oxidative stress, inflammation and early tumor promotion events in murine skin: plausible role of NFkB Pathway. Manuscrito no publicado, European Journal of Pharmacology. India.
- Allsandri, A. L., Sousa, L. P., Lucas, C. D., Rossi, A. G., Pinho, V., y Teixeira, M. M. (2013). Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. Reino Unido. Pharmacology and Therapeutics: 06558, 1-24.
- Almolda, B., Costa, M., Montoya, M., González, B., y Castellano, B. (2011). Increase in Th17 and T-reg lymphocytes and decrease of IL22 correlate with the recovery phase of acute EAE in rat. Colombia. Health: 6, 181-183.
- Angus, D., Zwirble, L., T, Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, y J., Pinsky, M. (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. United States. Critical Care Medic. 7:1303-10.
- Arrese, M., Cabrera, D., Kalergis, A. M., y Feldstein, A. E. (2016). Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. E. U. S. Digestive Diseases and Sciences: 10, 1-10.
- Ashley, N. T., Weil, Z. M., y Nelson, R. J. (2012). Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. E. U. S. Annuals Reviews Further: 43, 385-406.

- Balkwill, F. R., y Mantovani, A. (2012). Cancer-related inflammation: Common themes and therapeutic opportunities. Reino Unido. *Digestive Diseases and Sciences* : 22, 33-40.
- Batticane, N., Morale, M. C., Gallo, F., Farinella, Z., y Marchetti, B. (1991). Luteinizing hormone- releasing hormone signaling at the lymphocyte involves stimulation of interleukin-2 receptor expression. *Endocrinology* 129, 277–286.
- Bayoglu, Y., Guven, S., Kirbas, A., Kalkan, Y., Tumkaya, L., y Guvendag, E. (2015). Is resveratrol a potential substitute for leuprolide acetate in xperimental endometriosis?. Turquía. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*: 184, 1-6.
- Bello, M. G., Masini, E., Ioannides, C., Nodisang, F., Raspanti, S., Sacchi, B., y Mannaioni, P, F. (1997). Histamine release from rat mast cells induced by the metabolic activation of drugs of abuse into free radicals. Italia. *Inflammation Research*: 47, 122-130.
- Bornazou, I., Pound, J, D., Duffin, R., Bournazos, S., Melville, L, A., Brrown, S, B., Rossi, A, G., y Gregory, C, D. (2009). Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. Reino Unido. *The Journal of Clinical Investigation*: 119, 20-32.
- Brayton, C, F. (1986). Dimethyl sulfoxide (DMSO). *Cornell University Veterinary Specialists*: 76, 61-90.
- Branch, D, R., Calderwood, S., Cecutti, M, A., Herst, R., y Solh, H. (1994). Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethyl sulfoxide toxicity. Canadá. *Transfusion*: 34, 887-890.
- Brun, B, C. (2000). The epidemiology of the systemic inflammatory response. Francia. *Intensive Care Medicine*: 26, 64-74.

- Carou, M, C., Cruzans, R, P., Maruri, A., Stockert, C, J., y Lombardo, M, D. Apoptosis in ovarian granulosa cells of cattle: Morphological features and clearance by homologous phagocytosis. España. *Acta Histochemica*: 117, 92-103.
- Castagnetta, L., Granata, O, M., Traina, A., Cocciadiferro, L., Saetta, A., Stefano, R., Cutolo, M., y Carruba, G. (2002). A Role for Sex Steroids in Autoimmune Diseases. E. U. S. New York Academy of Sciences: 966, 193-03.
- Chrisp, P., y Sorkin, E, M. (1991). Leuprorelin A Review of its Pharmacology and Therapeutic Use in Prostatic Disorders. Nueva Zelanda. Adis International Limited: 6, 487-509.
- De La Rosa, G., Yang, D., Tewary, P., Varadhachary, A., y Oppenheim, J, J. (2008). E. U. S. *The Journal of Immunology*: 180, 6868-6876.
- DePamphilis, M, L., Renty, C, M., Ullah, Z,m y Lee, C, Y. (2012). “The octet”: eight protein kinases that control mammalian DNA replication. U. S. A. *Frontiers In Physiology*: 3, 1-20.
- Drayton, D, L., Liao, S., Mounzer, R, H., y Ruddle, N, H. (2006). “The octet”: eight protein kinases that control mammalian DNA replication. U. S. A. *Nature Immunology*: 4, 344-353.
- Fadok, V, A., Bratton, D, L., Konowal, A., Freed, P, W., Westcott, J, Y., y Henson, P, M. (1998). Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells In Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production Through Autocrine/Paracrine Mechanisms Involving TGF β , PGE $_2$, and PAF. U. S. A. *The American Society for Clinical Investigation, Inc.*: 101, 890-898.
- Farber, J, L. (1990). The Role of Calcium Ions in Toxic Cell Injury. E. U. S. *Environmental Health Perspectives*: 84, 107-111.
- Fernandes, P., MacSharry, J., Darby, T., Fanning, A., Shanahan, F., Houston, A., y Brint, E. (2015). Differential expression of key regulators of Toll-like receptors in ulcerative colitis and Crohn’s disease: a role for Tollip and peroxisome proliferator-activated receptor gamma?. Irlanda. *Clinical and Experimental Immunology*: 183, 358–368.

- Freire, C, G., Nascimento, D, O., Soares, M, B, P., Bozza, P, T., Neto, H, C., Mello, F, G., DosReis, G, A., y Lopes, M, F. (2000). Uptake of apoptotic cells drives the growth of pathogenic trypanosome in macrophages. Brazil. *Nature*: 403, 199-203.
- Fries, J. (1996). Toward an Understanding of NSAID-Related Adverse Events: The Contribution of Longitudinal Data. U. S. A. *Scand J Rheumatol*: 25, 3-8.
- Gabalaway, H., Guenther, L, C., y Bernstein, C, N. (2010). Epidemiology of Immune-Mediated Inflammatory Diseases: Incidence, Prevalence, Natural History, and Comorbidities. Canadá. *Journal of Rheumatology*: 85, 2-10.
- Gabriel, S, E., Crowson, C, S., Kremers, H, M., Doran, M, F., Turesson, C., y O'Fallon, M, W., Matteson, E, L. (2003). Survival in Rheumatoid Arthritis. U. S. A. *American College of Rheumatology*: 48, 54-58.
- Gosh, S., May, M, J., y Kopp, E, B. (1998). NF- κ B And rels proteins: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. Canadá. *Annual Review of Immunology*: 16, 225-260.
- Guzmán-Soto, I., Salinas, E., Hernández, J, I., y Quintanar, J, L. (2012). Leuprolide Acetate, a GnRH Agonist, Improves Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: A Possible Therapy for Multiple Sclerosis. *Neurochemical Research*: 37, 2190-2197.
- Guzmán-Soto, I., Salinas, E., Hernández, J, I., y Quintanar, J, L. (2015). Leuprolide Acetate Inhibits Spinal Cord Inflammatory Response in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Suppressing NF- κ B Activation. *Neurochemical Research*: 23, 33-40.
- Haynes, C., Marquis, B., y Ressler, A. (2006). Cytotoxicity of Gold Nanoparticles in Mast Cells. E. U. S. *Research Accomplishments*: 9, 2-3.
- Hecker, L., Vittal, R., Jones, T., Jagirdar, R., Luckhardt, T, R., Horowitz, J, C., Pennathur, P., Martinez, F, J., y Thannickal, V, J. (2009). NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. U. S. A. *Nature America*: 15, 1077-1081.

- Henseler, T., y Christophers, E. (1985). Psoriasis of early and late onset: Characterization of two types of psoriasis vulgaris. Alemania. *Journal of the American Academy of Dermatology*: 13, 450-456.
- Ho, H. N., Chen, H. F., Chen, S. U., Chao, K. H., Yang, Y. S., Huang, S. C., et al. (1995). Gonadotropin releasing hormone (GnRH) agonist induces down regulation of the CD3+ CD25+ lymphocyte subpopulation in peripheral blood. *American Journal of Reproduction and Immunology*: 33, 243–252.
- Horeczko, T., Green, J. P., y Panacek, E. A. (2013). Epidemiology of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) in the Emergency Department. U. S. A. *Western Journal of Emergency Medicine*: 15, 329-336.
- Inagaki, N., Goto, S., Nagai, H., and Koda A. (1985). Pharmacological characterization of mouse ear PCA. E. U. S. *International Archives of Allergy and Immunology*: 78, 113–117.
- Inagaki, N., y Nagai, H. (2009). Analysis of the Mechanism for the Development of Allergic Skin Inflammation and the Application for Its Treatment: Mouse Models for the Development of Remedies for Human Allergic Dermatitis. Japón. *Journal of Pharmacological Sciences*: 110, 251-259.
- Jones, P. H., y Hsueh, A. J. (1980). Direct Stimulation of Ovarian Progesterone-metabolizing Enzyme by Gonadotropin-releasing Hormone in Cultured Granulosa Cells. U. S. A. *The Journal of Biological Chemistry*: 256, 1248-1254.
- Jones, P. H., y Hsueh, A. J. (1982). Regulation of Ovarian 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity by Gonadotropin-Releasing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone in Cultured Rat Granulosa Cells. U. S. A. *Endocrinology*: 110, 1663-1671.
- Ichihara, H., Kitawaki, J., Kado, N., Koshiba, H., Fushiki, S., y Honjo, H. (2003). Gonadotropin-releasing hormone agonist and danazol normalize aromatase cytochrome P450 expression in eutopic endometrium from women with endometriosis, adenomyosis, or leiomyomas. Japón. *Fertility and Sterility*: 79, 735-742.

Jacobson, D, L., Gange, S, J., Rose, N, R., y Graham, N, M. Epidemiology and Estimated Population Burden of Selected Autoimmune Diseases in the United States. U. S. A. *Clinical Immunology and Immunopathology*: 84, 223-243.

Jones, M, M., Lin, Y., Haynes, C. (2010). Functional Assessment of Metal Oxide Nanoparticle Toxicity in Immune Cells. E. U. S. *American chemical Society nano*: 6, 3363–3373.

Judd, L, L., Schettler, P, J., Sherwood, E, B., Wolkowitz, O, M., Sternberg, E, M., Bender, B, G., Bulloch, K., Cidlowski, J, A., Kloet, E, R., Fardet, L., Joëls, M., Leung, D, Y, M., McEwen, B, S., Roozendaal, B., Rossum, E, F, C., Ahn, J., Brown, D, W., Plitt, A., y Singh, G. Adverse Consequences of Glucocorticoid Medication: Psychological, Cognitive, and Behavioral Effects. U. S. A. *American Journal Psychiatry*: 171, 1045–1051.

Kambe, N., Kambe, M., Kochan, J, P., y Schwartz, L, B. (2016). Human skin-derived mast cells can proliferate while retaining their characteristic functional and protease phenotypes. U. S. A. *Hematopoiesis*: 97, 2045-2052.

Karin, M., Lawrence, T., y Nizet, V. (2006). Innate Immunity Gone Awry: Linking Microbial Infections to Chronic Inflammation and Cancer. U. S. A. *Leading Edge Review*: 124, 823–835.

Khalil, M., Silverman, A, J., Silver, R. (2003). Mast Cells in the Rat Brain Synthesize Gonadotropin-Releasing Hormone. E. U. S. *National Institutes of Health Public Access*: 56, 2-17.

Khan, A, F., y Khan, F, M. (2010). Inflammation and acute phase response. E. U. S. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*: 1, 312 – 321.

Khan, K, L., Kitajima, M., Hiraki, K., Fijishita, A., Sekine, I., Ishimaru, T., y Masuzaki, H. (2009). Changes in tissue inflammation, angiogenesis and apoptosis in endometriosis, adenomyosis and uterine myoma after GnRH agonist therapy. *Japón. Human Reproduction*: 00, 1-12.

- Küpker, W., Schultze, A., y Diedrich, K. (1998). Paracrine changes in the peritoneal environment of women with endometriosis. Alemania. European Society of Human Reproduction Embryology: 4, 719-723.
- Lau, S, K., Weiss, L, M., y Chu, P, G. (2004). Differential Expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in Carcinomas of Various Sites. U. S. A. American Society for Clinical Pathology: 122, 61-69.
- Lim, S, S., Vos, T., Flaxman, F, D., y Anderson, H, R. (2010). A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. U. S. A. National Institute of Health: 380, 2224–2260.
- Liu, J., Yoshikawa, H., Nakajima, Y., y Tasaka, K. (2001). Involvement of mitochondrial permeability transition and caspase-9 activation in dimethyl sulfoxide-induced apoptosis of EL-4 lymphoma cells. Int. Japon. Immunopharmacol: 1, 63–74.
- Loftus, E, V. (2003). Mortality in Inflammatory Bowel Disease: Peril and Promise. U. S. A. Gastroenterology: 125, 1881–1895.
- Luo, p., Wong, F, Y., Ge, L., Zhang, F, Z., Liu, Y., Liu, L., y Zhou, H. (2010). Antiinflammatory and analgesic effect of Plumbagin through inhibition of Nuclear Factor-kB activation. U. S. A. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics: 335, 735-742
- McFall, M, N. (2007). A memory-based immune system may have evolved in vertebrates because of the need to recognize and manage complex communities of beneficial microbes. U. S. A. Nature: 445, 153-158.
- Malinin, T, L., y Perry, V, P. (1967). Toxicity of dimethyl sulfoxide on HeLa cells. Canadá. Cryobiology: 4, 90-96.
- Mandal, S, C., Lakshmi, S, M., Kumar, C, K, A., Sur, T, K., y Boominathan, R. (2003). Evaluation of Anti-inflammatory Potential of Pavetta indica Linn. Leaf Extract (Family: Rubiaceae) in Rats. India. Published online in Wiley International Science: 17, 817-820.

- Mantovani, A., Allavvena, P., Sica, A., y Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Italia. Nature*: 454, 436-444.
- Marchetti, B., Guarcello, V., Morale, M. C., Bartoloni, G., Farinella, Z., Cordaro, S., et al. (1989). Luteinizing hormone releasing hormone bind insites in the rat thymus: characteristics and biological function. *Endocrinology*: 125, 1025–1036.
- McConnell, E. J., Wagoner, M. J., Keenan, C. E., Raess, B. U. (1999). Inhibition of calmodulin-stimulated ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-ATPase activity by dimethyl sulfoxide. *Biochemical Pharmacology*: 57, 39-44.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *U. S. A. Nature Insight*: 454, 428-435.
- Meresman, G. F., Bilotas, M. A., Lombardi, E., Tesone, M., Sueldo, C., y Barañao, R. I. (2003). Effect of GnRH analogues on apoptosis and release of interleukin-1b and vascular endothelial growth factor in endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Argentina. Human Reproduction*: 18, 1767-1771.
- Morgnstern, D., Gifforf, M., Li, L. L., Doerschuk, C. M., y Dinauer, M. C. (2015). Absence of Respiratory Burst in X-linked Chronic Granulomatous Disease Mice Leads to Abnormalities in Both Host Defense and Inflammatory Response to *Aspergillus fumigatus*. *U. S. A. The Rockefeller University Press*: 185, 207–218.
- Mukherjee, P. K. (2002). Quality control of Herbal drugs - An approach to evaluation of Botanicals. *Business Horizons. New Delhi*: 1, 555-556.
- Morris, J. C. (2003). Carrageenan induced paw edema in the rat and mouse. *U. S. A. Humana Press Incorporation. Totowa*: 225, 115-121.
- Needleman, P., Turk, J., Jackschi, A. B., Morrison, R. A., y Lefkowitz, B. J. (1986). Arachidonic acid metabolism. *E. U. S. Annual Review Biochemical*: 55, 609-102.

- Natahn, C. (2002). Points of control in inflammation. U. S. A. Nature: 420, 846-852.
- Nathan, C., y Ding, A. (2010). Nonresolving Inflammation. U. S. A. Insight Review Articles: 140, 871-882.
- Notman, R., Noro, M., O'Malley, B., y Anwar, J. (2006) Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. Inglaterra. Journal American Chemistry Soc: 128, 13982–13983.
- Ogura, T., Shuba, L, M., McDonald, T, F. (1995). Action potentials, ionic currents and cell waer in guinea pig ventricular preparations expos dimethyl sulfoxide. J Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics:273, 1273-1286.
- OMS (2003a). Diet Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. United States, Organización Mundial de la Salud.
- OMS (2015a). Prevention of non-communicable diseases. United States, Organización Mundial de la Salud.
- Panda, S, k., Das, D., y Tripathy, N, K. Anti-inflammatory Potential of Chlorophytum Borivilianum Sant and Fern. Root Tubers. U. S. A. Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences: 2, 242-251.
- Perretti, M., Creoxtail, J, D., Goulding, N, J., Hannon, R., y Flowe, R, J. (1996). Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leucocytes downregulates their transmigration. Reino Unido. Nature Publishing Group: 2, 1259-1262.
- Perretti, M., y D'Aquisto, F. (2009). Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. U. S. A. Nature: 9, 62-70.
- Quintanar, J, L., Salinas, E., Quintanar, A. (2010). Gonadotropin-releasing hormone reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. México. Elsevier: 45, 43-48.
- Quintanar, J, L., Guzmán, I. (2013). Hypothalamic neurohormones and immune responses. México. Frontiers in Integrative Neuroscience: 7, 1-15.
- Rao, L, V., Cleveland, R, P., y Ataya, K, M. (1993). GnRH Agonist Induces Suppression of Lymphocyte Subpopulations in Secondary Lymphoid Tissues

of Prepubertal Female Mice. U. S. A. American Journal of Reproductive Immunology: 30, 5-25.

Reddy, N, M., Kleeberger, S, R., Kensler, T, W., Yumamoto, M., Hassoun, P, M., y Rddy, S, P. (2009). Disruption of Nrf2 Impairs the Resolution of Hyperoxia-Induced Acute Lung Injury and Inflammation in Mice. Japón. The Journal of Immunology: 182, 7264–7271.

Reitamo, S., Rustin, M., Ruzicka, T., Cambazard, F., Kalimo, K., Frriedmann, P, S., Schoepf, W., Lahfa, M., Diepgen, T, L., Judodihardjo, H., Wollenberg, H., Berth-Jones, J., y Bieber, T. (2002). Efficacy and safety of tacrolimus ointment compared with that of hydrocortisone butyrate ointment in adult patients with atopic dermatitis. Francia. Journal of Allergy Clinical Immunology: 109, 547-554.

Romani, L., Fallarino, F., De Luca, A., Montagnoli, C., D'Angelo, C., Zelante, T., Vacca, C., Bistoni, F., Fioretti, M, C., Grohmann, U., Segal, B, H., y Puccetti, P. (2007). Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. U. S. A. Nature Publishing Group: 451, 211-215.

Russel, D, G., Cardona, P, J., Allain, S., y Altare, F. (2009). Foamy macrophages and the progression of the human TB granuloma. U. S. A. Nature Immunology: 10, 943-948.

Sakiani, S., Olsen, N, J., y Kovacs, W, J. (2012). Gonadal steroids and humoral immunity. U. S. A. Nature Reviews: 15, 1-7.

Scanell, M., Flanagan, M, B., Stefani, A., Wynne, K, J., Cagney, G., Godson, C., y Maderna, P. (2007). Annexin-1 and Peptide Derivatives Are Released by Apoptotic Cells and Stimulate Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils by Macrophages. U. S. A. The Journal of Immunology: 178, 4595–4605.

Scott, A., Khan, K, M., Cook, J, L., y Duronio, V. (2004). What is “inflammation”? Are we ready to move beyond Celsus?. Canadá. Br J Sports Med: 38, 248–249.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Schumacher, A., Heinze, K., Witte, J., Poloski, E., Linzke, N., Woidacki, K., et al. (2013). Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance. *E. U. S. Journal of Immunology*.6: 2650 – 2683.

Schumacher, A., Poloski, E., Spörcke, D., y Zenclussen, A. (2014). Luteinizing Hormone Contributes to Fetal Tolerance by Regulating Adaptive Immune Responses. *Alemania. American Journal Reproduction Immunology*: 71: 434–440.

Sennello LT, Finley RA, Chu S-Y, Jagst C, Max D, et a. (1986). Single-dose pharmacokinetics of leuprolide in humans following intravenous and subcutaneous administration. *E. U. S. Journal of Pharmaceutical Sciences*. 75: 158-160.

Serhan, C, N., y Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *U. S. A. Journal home : Nature Immunology*: 6,1191-7.

Signorello, M, J., Giacobbe, E., Segantin, A., Avigliano, L., Sinigaglia, F., Maccarrone, M., y Leoncini, G. (2011). Activation of Human Platelets by 2-Arachidonoylglycerol: Role of PKC in NO/cGMP Pathway Modulation. *Italia. Current Neurovascular Research*: 8, 200-209.

Smith, A, M., Rahman, F, Z., Hayee, B., Graham, S, J., Marks, D, J., Sewell, G, W., Palmer, C, D., Wilde, J., Foxwell, B, M., Gloger, I, S., Sweeting, T., Marsh, M., Walker, A, P., Bloom, S, L., y Segal, A, W. (2009). Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *Reino Unido. The Journal of Experimental Medicine*: 206, 1883-1897.

Sneller, M, C. (2000). Granuloma formation, implications for the pathogenesis of vasculitis. *E. U. S. Cleveland Clinic Journal of Medicine*: 69, 40-43.

Soehnlein, O., y Lindbom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Alemania. Nature Reviews*: 10, 427-439.

Standaert, F, E., Chew, B, P., Avila, D, D., y Reeves, R, R. (1992). Presence of luteinizing Hormone-Releasing Hormone binding Sites in cultured porcine lymphocytes. (1992). *U. A. A. Biology of Reproduction*: 46, 997-1000.

- Stark, M, A., Huo, Y., Burcin, T, L., Morris, M, A. (2005). Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17. U. S. A. Immunity: 22, 285–294.
- Stempel, M., and Ferjan. (2005). Signaling pathway in nerve growth factor induced histamine release from rat mast cells. Inflammation Research: 54, 344 - 349.
- Strieter, R, M., Gomperts, B, N., y Keane, M, P. (2007). The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. U. S. A. The Journal of Clinical Investigation: 117, 549–556.
- Swingle, K. F. (1974). Chemistry and Pharmacology. U. S. A. Academic Press: 2, 33-47.
- Thomas, P, G., Dash, P., Aldridge, J, R., Hellebedy, A, H., Reynolds, C., Funk, A, J., Martin, W, J., Lamkanfi, M., Webby, R, J., Boyd, K, L., Doherty, P, C., Kanneganti, T, D. (2009). The Intracellular Sensor NLRP3 Mediates Key Innate and Healing Responses to Influenza A Virus via the Regulation of Caspase-1. U. S. A. Immunity: 30, 566–575.
- Umathe, S, N., Dixit, P, V., Wanjari, M, M., y Ullewar, M, P. (2008). Leuprolide -a GnRH agonist prevents restraint stress-induced immunosuppression via sex steroid-independent peripheral mechanism in mice. India. International Immunopharmacology: 8, 71–79.
- Umesaki, N., Tanaka, T., Miyama, M., Mizuno, K., Kawamura, N., y Ogita, S. (1999). Increased Natural Killer Cell Activities in Patients Treated with Gonadotropin Releasing Hormone Agonist. Japón. Gynecologic and Obstetric Investigation: 48, 66-68.
- Urgelles, L, A. (2010). Dolor vs. Inflamación: nuevas ideas sobre su evaluación y control. Dolor (Foro Nacional de Investigación Clínica y Médica): 5, 1-19.
- Vallejo, D., y Quintanar, J, L. (2012). Gonadotropin-releasing hormone treatment improves locomotor activity, urinary function and neurofilament protein expression after spinal cord injury in ovariectomized rats. México. Neuroscience Letters: 515, 187 -190.

- Vane, J, R. (2000). The Mechanism of Action of Anti-Inflammatory Drugs. Alemania. *Advances in Eicosanoid Research*: 14, 1-23.
- Violante, G., Zerrouk, N., Richhard, I., Provot, G., Chaumeil, J, C., y Aenaud, P. (2002). Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures. Francia. *Pharmaceutical Society of Japan*: 12, 1600-1603.
- Webb, D, R. (2013). Animal Models of Human Disease: Animal Models of Inflammation. U. S. A. *Biochemical Pharmacology*: 13, 1-47.
- Wallusch, W.W.; Nowak, H.; Leopold, G. et al. (1978) Comparative bioavailability: Influence of various diets on the bioavailability of indomethacin. *International Journal of Clinical Pharmacology and Biopharmacy*: 16, 40-48.
- Wilson, C, A., Meethal, V, S., Bowen, L, R., and Atwood, S, C. (2007). Leuprolide acetate: a drug of diverse clinical applications. E. U. S. *OTB Research*: 16, 1851-1863.
- Wilson, A., Vadakkadath, M., Bowen, R., y Atwood, C. (2007). Leuprolide acetate: diverse clinical applications. U. S. A. *Informa healthcare*: 2, 148.153.
- Wilson, M, S., y Wynn, T, A. (2009). Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. U. S. A. *Nature*: 2, 103-121.
- Winter, C, A., y Porter, C, C. (1957). Effect of Alterations in Side Chain upon Anti-inflammatory and Liver Glycogen Activities of Hydrocortisone Esters. U. S. A. *Journal of the American Pharmaceutical Association*: 46, 515-519.
- Williamson, M., Bingham, B., y Viau, V. (2005). Central organization of androgen-sensitive pathways to the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Implications for individual differences in responses to homeostatic threat and predisposition to disease. Reino Unido. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*: 29, 1239-1248.
- Wong, K, H, J., y Simon, J, A. (2004). In vitro effect of gonadotropin-releasing hormone agonist on natural killer cell cytotoxicity in women with and without endometriosis. U. S. A. *Arthritis and Rheumatism*. 190, 44-9.

Wong, K., Gladman, D, D., Husted, J., Long, J, A., y Farewell, V, T. (1997). Mortality studies in psoriatic arthritis. U. S. A. Journal of American College of Rheumntology: 40, 1868-1872.

Yadav, U, C, S., Ramana, K, V., Aguirre, L, A., Boldogh, I., Boulares, H, A., y Srivastava, S, K. (2009). Inhibition of Aldose Reductase Prevents Experimental Allergic Airway Inflammation in Mice. U. S. A. Public Library of Science ONE: 4, 1-13.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS