

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

03081

3

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE

POSGRADO

**“ANÁLISIS MOLECULAR DE LA RESPUESTA A LA COLÁGENA-
POLIVINILPIRROLIDONA EN CULTIVOS DE SINOVIA DE
PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN

INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A

GUADALUPE JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA

México D. F., 2000.

276149



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Título de la tesis:

"MOLECULAR ANALYSIS ON THE RESPONSE OF COLLAGEN-POLYVINYLPIRROLIDONE IN SYNOVIAL TISSUE CULTURES FROM RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS"

Grado y nombre del tutor o director de tesis:

DR. JORGE ALCOCER VARELA

Institución de adscripción del tutor o director de tesis:

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION "SALVADOR ZUBIRAN"

Resumen de la tesis: (Favor de escribir el resumen de su tesis a máquina, como máximo en 25 renglones a un espacio, sin salir de la extensión de este cuadro.)

"MOLECULAR ANALYSIS ON THE RESPONSE OF COLLAGEN-POLYVINYLPIRROLIDONE IN SYNOVIAL TISSUE CULTURES FROM RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS"

Objective. To determine whether collagen-polyvinylpyrrolidone (collagen-PVP) modifies some biochemical and/or immunological responses in synovial tissue cultures from rheumatoid arthritis (RA) patients.

Methods. Fragments of synovial tissue from 10 RA patients were cultured in duplicate with or without 1% collagen-PVP. Tissues on the 3rd, 5th, and 7th culture day were sectioned and stained by the Herovici histological technique. Total collagen and type I/III collagen ratio were evaluated by the Woessner micromethod and by interrupted gel electrophoresis, respectively. Collagenolytic activity was assessed by degradation of ³H-collagen in tissue culture supernatants. TIMP-1, IL-1 β and TNF- α were determined in supernatants of cultures by enzyme-linked immunosorbent assay, and the results were normalized by DNA concentration. Adhesion molecule expression was evaluated by immunohistochemistry.

Results. Collagen-PVP at 1% did not produce changes in total collagen content, however the histological analysis and interrupted gel electrophoresis revealed a 1.7-fold increase of type III collagen in a time-dependent fashion. Collagenolytic activity, ICAM-1 and VCAM-1 expression, as well as IL-1 β and TNF- α levels were all downregulated at statistically significant levels in treated cultures.

Conclusion. Exogenous addition of collagen-PVP to synovial tissue cultures induced downmodulation but not an inhibition of some inflammatory parameters, contributing to the gradual and better recovery of homeostasis in synovial tissue from RA patients.

LOS DATOS ASENTADOS EN ESTE DOCUMENTO CONCUERDAN FIELMENTE CON LOS REALES Y QUEDO ENTERADO QUE, EN CASO DE CUALQUIER DISCREPANCIA, QUEDARÁ SUSPENDIDO EL TRÁMITE DEL EXAMEN

Fecha de solicitud: _____

Firma del alumno

Acompaña los siguientes documentos:

- Nombramiento del jurado del examen de grado
- Aprobación del trabajo escrito por cada miembro del jurado
- Copia de la última revisión de estudios
- Comprobante de pago de derechos por registro del grado

Biblioteca del Plantel

Biblioteca Central

Entrega ejemplares de tesis

Titulo de la tesis:

"ANÁLISIS MOLECULAR DE LA RESPUESTA A LA COLÁGENA-POLIVINILPIRROLIDONA EN CULTIVOS DE SINOVIA DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE"

Grado y nombre del tutor o director de tesis:

DR. JORGE ALCOCER VARELA

Institución de adscripción del tutor o director de tesis:

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION "SALVADOR ZUBIRAN"

Resumen de la tesis: (Favor de escribir el resumen de su tesis a máquina, como máximo en 25 renglones a un espacio, sin salir de la extensión de este cuadro.)

"ANÁLISIS MOLECULAR DE LA RESPUESTA A LA COLÁGENA-POLIVINILPIRROLIDONA EN CULTIVOS DE SINOVIA DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE"

Objetivo. Determinar si la colágena-polivinilpirrolidona (colágena-PVP) modifica algunas de las respuestas bioquímicas y/o inmunológicas en los cultivos de la membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR).

Métodos. Se realizaron cultivos por duplicado de fragmentos de sinovia de 10 pacientes con AR, en ausencia o presencia de colágena-PVP al 1% durante 7 días. Los tejidos obtenidos del día 3, 5 y 7 de cultivo fueron teñidos con la técnica de Herovici. El contenido total de colágena y las proporciones de las colágenas tipos I y III fueron determinadas por el micrométodo de Woessner y con geles de electroforesis interrumpida, respectivamente. La actividad colagenolítica fue evaluada en los sobrenadantes de cultivo a través de la degradación de ³H-colágena. La concentración del TIMP-1, la IL-1 β y el TNF- α en los sobrenadantes de cultivo se cuantificó con un ensayo inmunoenzimático de tipo ELISA y los resultados se normalizaron con el contenido de ADN. La expresión de las moléculas de adhesión se evaluó a través de la técnica de inmunohistoquímica.

Resultados. La adición de la colágena-PVP al 1% a los cultivos de sinovia no produjo cambios en el contenido total de colágena. Sin embargo el análisis histológico y los geles de electroforesis interrumpida, mostraron un incremento de 1.7 veces de colágena tipo III de forma tiempo dependiente. La actividad colagenolítica, la concentración del TIMP-1, la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, así como los niveles de IL-1 β y TNF- α en los cultivos tratados, fueron regulados negativamente y a niveles estadísticamente significativos con respecto a los cultivos control.

Conclusión. La adición de colágena-PVP a los cultivos de sinovia indujo la regulación negativa pero no la inhibición de algunos parámetros inflamatorios, contribuyendo así a una recuperación gradual de la homeostasis en la sinovia de los pacientes con AR.

LOS DATOS ASENTADOS EN ESTE DOCUMENTO CONCUERDAN FIELMENTE CON LOS REALES Y QUEDO ENTERADO QUE, EN CASO DE CUALQUIER DISCREPANCIA, QUEDARÁ SUSPENDIDO EL TRÁMITE DEL EXAMEN

Fecha de solicitud: _____

Firma del alumno

Acompaño los siguientes documentos:

- Nombramiento del jurado del examen de grado
- Aprobación del trabajo escrito por cada miembro del jurado
- Copia de la última revisión de estudios
- Comprobante de pago de derechos por registro del grado

Biblioteca del Plantel

Biblioteca Central

Entrega ejemplares de tesis

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO,
SECRETARÍA GENERAL
DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
SOLICITUD PARA EL TRÁMITE DE EXAMEN DE GRADO DE MAESTRÍA O DOCTORADO

DATOS GENERALES

No. de cuenta 8531761-9 No. de expediente 30932045
Nombre FURUZAWA CARBALLEDA GUADALUPE JANETTE
primer apellido segundo apellido nombre(s)
Dirección CAOBA, MANZANA 7, LOTE 6 Colonia JUVENTUD UNIDA
Población o ciudad MEXICO Def. o municipio TLALPAN Estado D.F.
C.P. 14640 Tel. particular 5513 52 05 Tel. oficina
Nacionalidad MEXICANA Sexo F M
Lugar de nacimiento MEXICO, D.F. Fecha de nacimiento 19-12-68
Dirección de origen UNIDAD FUENTES BROTTANTES B 3-202, COL. HIDALGO
MEXICO D.F. MEXICO 14250
población o ciudad estado país código postal

ESTUDIOS ANTECEDENTES

LICENCIATURA

Plan de Estudios QUIMICO FARMACEUTIVO BIOLOGIA
Institución UNAM Facultad o escuela QUIMICA
País MEXICO Estado D.F.
Promedio 9.2 Fecha de titulación (día/mes/año) 25 Nov. 93

ESTUDIOS DE POSGRADO

Nivel y plan de estudios MAESTRIA
Institución Instituto de Invest. Biomédicas Facultad o escuela UACPyP DEL CCH
País MEXICO Estado D.F.
Fecha de diplomación o graduación (día/mes/año): 10 Oct. 95
Nivel y plan de estudios DOCTORADO
Institución: Instituto de Invest. Bioméd. Facultad o escuela UACPyP del CCH
País MEXICO Estado d.f.
Fecha de diplomación o graduación (día/mes/año)

DATOS PARA LA REVISIÓN DE ESTUDIOS

Entidad académica UACPyP DEL CCH
Plan de estudios DOCTORADO EN INVESTIGACION MEDICA BASICA
Año y semestre de ingreso 96-2 Promedio indicado en la última revisión de estudios 9.83
Año y semestre en que cursó su última asignatura o concluyó los requisitos del plan de estudios 98-1
Cursó el plan de estudios con beca si no Otorgada por DGAPA
Realizó tesis si no Con beca si no Otorgada por DGAPA

Jurado asignado

Presidente: Dr. Ruy Pérez Tamayo

Secretario: Dr. Moisés Selman Lama

Vocal: Dr. Jorge Alcocer Varela

Vocal: Dr. Enrique Ortega Soto

Vocal: Dr. Pedro Reyes López

Suplente: Dr. Víctor Monteón Padilla

Suplente: Dr. Rafael Saavedra Durán

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Tejido Conjuntivo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la dirección del *Dr. Jorge Alcocer Varela* y del *Dr. Lino Díaz de León Hernández*[†] y con el apoyo de *ÁSPID S.A. de C.V.* (LDL-94); *PADEP* (030308, 030352) y *PUIS*.

CONTENIDO

I. Abreviaturas	1
II. Resumen	3
III. Abstract	5
IV. Introducción	6
Descripción Histológica de la Membrana Sinovial Normal	7
Descripción Histológica de la Membrana Sinovial de Pacientes con Artritis Reumatoide	11
Componentes de la Matriz Extracelular de la Membrana Sinovial Normal	11
Componentes de la Matriz Extracelular de la Membrana Sinovial de Pacientes con Artritis Reumatoide	12
Expresión de Citocinas en la Membrana Sinovial de Pacientes con Artritis Reumatoide	13
Moléculas de Adhesión en la Membrana Sinovial de Pacientes con Artritis Reumatoide	15
Actividades Proteolíticas en la Membrana Sinovial de Pacientes con Artritis Reumatoide	20
Inhibidores Tisulares de las Metaloproteasas en la Membrana Sinovial de Pacientes con Artritis Reumatoide	23
Regulación de la Expresión de proteasas y TIMPS	24
V. Antecedentes	26
VI. Justificación	29
VII. Hipótesis	30
VIII. Objetivo General	31
IX. Objetivos Particulares	31
X. Materiales y Métodos	32
XI. Resultados	40
XII. Discusión	54
XIII. Conclusión	60
XIV. Agradecimientos	61
XV. Referencias	62

I. ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AR	Artritis Reumatoide
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
CD	"Cluster Differentiation" o Molécula de Diferenciación Celular
Colágena-PVP	Colágena-Polivinilpirrolidona
CMN	Células Mononucleares
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
DS	Desviación estándar
ELISA	"Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" o Ensayo Inmunoenzimático
ES	Error estándar
GAG	Glicosaminoglicano
GM-CSF	"Granulocyte and Monocyte-Colony Stimulator Factor" o Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Monocitos
ICAM-1	"Intercellular Adhesion Molecule-1" o Molécula de Adhesión Intercelular-1
IFN-γ	"Interferon-gamma" o Interferón-gama
IL	Interleucina
kD	Kilodalton
LFA	"Leucocyte Function Antigen" o Antígeno de Función Leucocitaria
MAC	Moléculas de Adhesión Celular
MEC	Matriz Extracelular
MMP	"Matrix Metalloproteinase" o Metaloproteasa de Matriz
μg	Microgramo
μm	Micrómetro
NK	"Natural Killer Cells" o Células Asesinas Naturales
No-AR	Grupo control de individuos sanos
PDGF	"Platelet Derived Growth Factor" o Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas
PKC	"Protein-Kinase C" o Proteína Cinasas C

TACE	“TNF- α -converting enzyme” o enzima activadora del TNF- α
TCR	“T-Cell Receptor” o Receptor de Célula T
TGF-β	“Transformant Growth Factor-beta” o Factor de Crecimiento Transformante-beta
Th	“T-helper cell” o Célula T cooperadora
TIMP-1	“Tissue Inhibitor Metalloproteinase Protein-1” o Inhibitor Tisular de Metaloproteasas
TNF-α	“Tumor Necrosis Factor-alpha” o Factor de Necrosis Tumoral-alfa
UDFGD	Uridin Difosfoglucosa Deshidrogenasa
VCAM-1	“Vascular Cell Adhesion Molecule-1” o Molécula de Adhesión Celular Vascular-1
VLA	“Very Late Adhesion Antigen” o Molécula Antigénica de Adhesión Tardía

II. RESUMEN

Objetivo. Determinar si la colágena-polivinilpirrolidona (colágena-PVP) modifica algunas de las respuestas bioquímicas y/o inmunológicas en los cultivos de la membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR).

Métodos. Se realizaron cultivos por duplicado de fragmentos de sinovia de 10 pacientes con AR, en ausencia o presencia de colágena-PVP al 1% durante 7 días. Los tejidos obtenidos del día 3, 5 y 7 de cultivo fueron teñidos con la técnica de Herovici. El contenido total de colágena y las proporciones de las colágenas tipos I y III fueron determinadas por el micrométodo de Woessner y con geles de electroforesis interrumpida, respectivamente. La actividad colagenolítica fue evaluada en los sobrenadantes de cultivo a través de la degradación de ^3H -colágena. La concentración del TIMP-1, la IL-1 β y el TNF- α en los sobrenadantes de cultivo se cuantificó con un ensayo inmunoenzimático de tipo ELISA y los resultados se normalizaron con el contenido de ADN. La expresión de las moléculas de adhesión se evaluó a través de la técnica de inmunohistoquímica.

Resultados. La adición de la colágena-PVP al 1% a los cultivos de sinovia no produjo cambios en el contenido total de colágena. Sin embargo el análisis histológico presentó un aumento en las fibras de colágena con una agregación semejante a la tipo III y los geles de electroforesis interrumpida, mostraron un incremento de 1.7 veces de colágena tipo III de forma tiempo dependiente. La actividad colagenolítica, la concentración del TIMP-1, la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, así como los niveles de IL-1 β y TNF- α en los cultivos tratados, fueron regulados negativamente y a niveles estadísticamente significativos con respecto a los cultivos control.

Conclusión. La adición de colágena-PVP a los cultivos de sinovia indujo la regulación negativa pero no la inhibición de algunos parámetros inflamatorios, contribuyendo así a una recuperación gradual de la homeostasis en la sinovia de los pacientes con AR.

III. ABSTRACT

Objective. To determine whether collagen-polyvinylpyrrolidone (collagen-PVP) modifies some biochemical and/or immunological responses in synovial tissue cultures from rheumatoid arthritis (RA) patients.

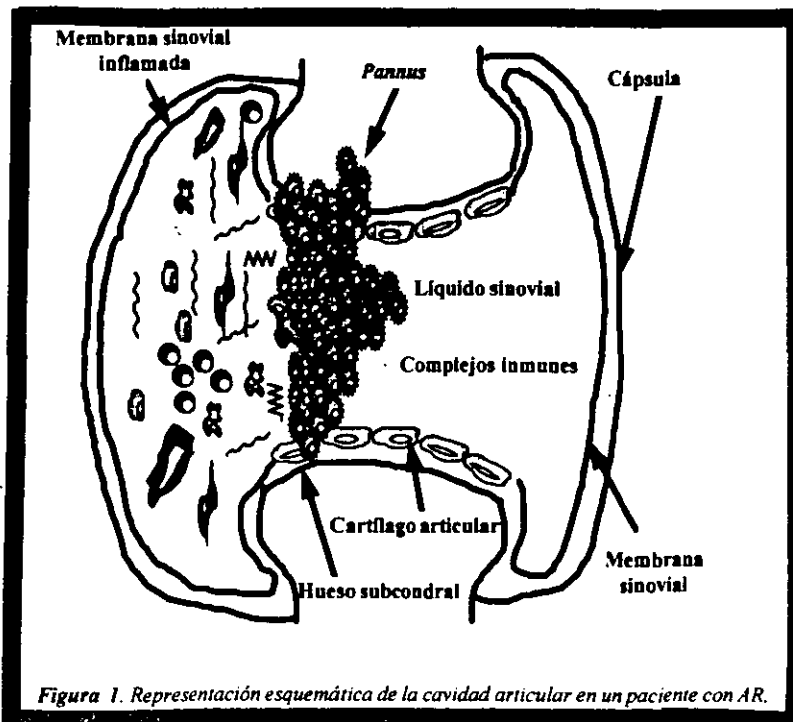
Methods. Fragments of synovial tissue from 10 RA patients were cultured in duplicate with or without 1% collagen-PVP. Tissues on the 3rd, 5th, and 7th culture day were sectioned and stained by the Herovici histological technique. Total collagen and type I/III collagen ratio were evaluated by the Woessner micromethod and by interrupted gel electrophoresis, respectively. Collagenolytic activity was assessed by degradation of ³H-collagen in tissue culture supernatants. TIMP-1, IL-1 β and TNF- α were determined in supernatants of cultures by enzyme-linked immunosorbent assay, and the results were normalized by DNA concentration. Adhesion molecule expression was evaluated by immunohistochemistry.

Results. Collagen-PVP at 1% did not produce changes in total collagen content, however the histological analysis and interrupted gel electrophoresis revealed a 1.7-fold increase of type III collagen in a time-dependent fashion. Collagenolytic activity, TIMP-1, ICAM-1 and VCAM-1 expression, as well as IL-1 β and TNF- α levels were all downregulated at statistically significant levels in treated cultures.

Conclusion. Exogenous addition of collagen-PVP to synovial tissue cultures induced downmodulation but not an inhibition of some inflammatory parameters, contributing to the gradual and better recovery of homeostasis in synovial tissue from RA patients.

IV. INTRODUCCIÓN

Bajo condiciones fisiológicas en el tejido conjuntivo, las citocinas [factores estimuladores de colonias (CSF), quimiocinas o intercrinas, interleucinas (IL), factores de crecimiento (GF) e interferones (IFN)], forman una red intrincada de interacciones que mantienen la homeostasis tisular. En la artritis reumatoide (AR), una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la presencia de infiltrados inflamatorios crónicos, el desarrollo de artropatía destructiva, fibrosis, erosión ósea y degradación del cartílago articular (*Figura 1*); se presentan interacciones muy complejas. Lo anterior debido a la gran variedad de células que forman a la membrana sinovial, a los contactos directos célula-célula o célula-matriz extracelular (MEC) a través de las diferentes moléculas de adhesión (MACs) de la superficie celular y a la sobreexpresión de las citocinas pro-inflamatorias que desplazan el equilibrio hacia una degradación excesiva de los componentes de la sinovia, produciendo los fenómenos destructivos característicos de la enfermedad.



DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DE LA MEMBRANA SINOVIOL NORMAL

La membrana sinovial es un tejido conjuntivo especializado encargado de la producción del líquido sinovial, cuyas funciones incluyen la nutrición del cartílago articular y la lubricación de la articulación. La sinovia está constituida por 2 capas: la íntima y la subíntima sinovial (*Figura 2*).

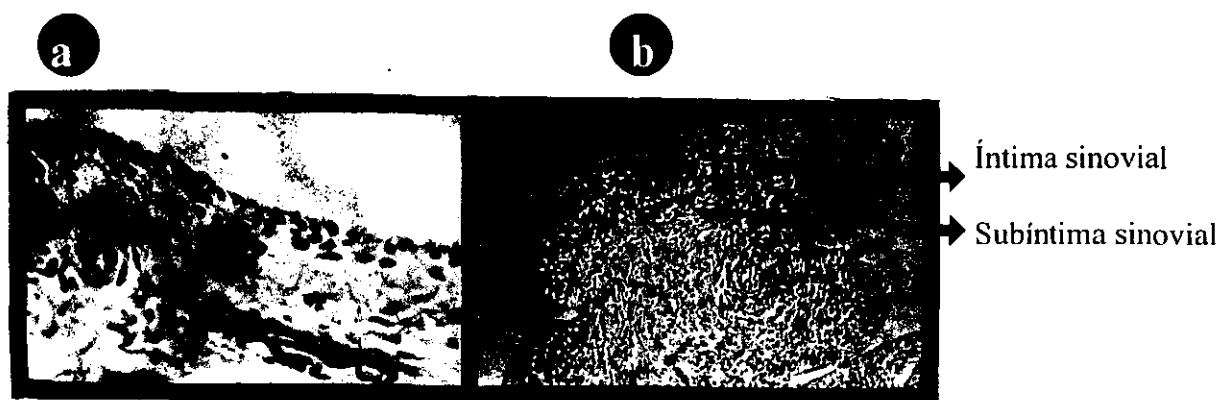


Figura 2. Membrana sinovial de la rodilla de a, un sujeto adulto sano (250X) y b, un paciente con AR (100X), teñidas con hematoxilina y eosina.

a) La **íntima sinovial** forma una capa superficial de 50 μm , similar a un epitelio. Está compuesta por 1 ó 2 monocapas de sinoviocitos tipo B o células semejantes a fibroblastos, que constituyen cerca del 80 al 85% de la población celular total y por sinoviocitos tipo A o células semejantes a macrófagos, que conforman el 15 ó 20% restante (*Figura 3*) y provienen de la médula ósea (*Lindblad, 1987; Nikkari, 1995*). Ultraestructuralmente, los sinoviocitos tipo B presentan un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado, pocas vacuolas y vesículas. Expresan el gen de la

uridin difosfoglucosa deshidrogenasa (UDFGD) de 4 a 9 veces más que los fibroblastos de la subíntima sinovial. Además, producen enzimas tales como la hialuronato sintetasa, por lo que han sido considerados como las células que producen el hialuronato del líquido sinovial (*Athanasou, 1995*) y la prolilhidroxilasa (*Smith, 1998*) y expresan VCAM-1 de forma constitutiva, CD44 (receptor del hialuronato), laminina y colágenas tipos I, III y IV a niveles comparables a los de los fibroblastos de la piel (*Schneider, 1994; Edwards, 1995*).

Los sinoviocitos tipo A son células con capacidad fagocítica, se regulan hormonalmente, participan en la respuesta inmune celular y sintetizan un gran número de glicoproteínas. Morfológicamente, se caracterizan por sus prominentes filopodios, vacuolas, vesículas y por un retículo endoplásmico rugoso escaso. Bioquímicamente se identifican por expresar la actividad de esterasa no específica e inmunohistoquímicamente por presentar el marcador CD68 de macrófagos y monocitos (*Athanasou, 1995*).

En la íntima sinovial las uniones intercelulares son raras ya que las células se encuentran separadas entre 1 y 2 μm , espacio que se ocupa con las macromoléculas de la MEC (*Levick, 1989*).

La microcirculación en la íntima sinovial se lleva a cabo a través de una red de capilares embebidos en la matriz a una profundidad mayor de 5 μm . Estos vasos sanguíneos con endotelio fenestrado, son la fuente del agua, los electrolitos y los nutrientes del líquido sinovial (*Stevens, 1991*). La fenestración se encuentra preferencialmente en el lado del capilar orientado hacia la cavidad articular permitiendo que el agua y los solutos lleguen a la MEC. En muchos tejidos la resistencia de la matriz durante el transporte y difusión de los nutrientes es relativamente pequeña comparada con la del endotelio. Sin embargo, en la sinovia la resistencia hidráulica intersticial es de una magnitud similar a la de la red capilar debido a las fenestraciones (*Knight, 1985*). Así, el

transporte y difusión de solutos y electrolitos entre el plasma y la cavidad articular se encuentra significativamente influenciada por la naturaleza de la MEC, el área, el grosor, la composición y la resistencia (*Knight, 1988*).



Figura 3. Membrana sinovial de la rodilla de un sujeto adulto sano. Los sinoviocitos de forma irregular y de gran tamaño representan a los sinoviocitos tipo A o similares a macrófagos y los de tamaño menor y redondeado representan a los tipo B o similares a fibroblastos (600X).

b) La subíntima sinovial, ubicada por debajo de la íntima está compuesta de tejido adiposo, areolar o fibroso dependiendo del tipo de articulación, y de fibroblastos, algunos macrófagos y linfocitos perivasculares (*Lindblad, 1987; Rinaldi, 1998*).

Si bien ultraestructuralmente no se distingue una membrana basal que separe a los sinoviocitos de la íntima de la subíntima sinovial, se ha demostrado inmunohistoquímicamente que proteínas tales como laminina, entactina y colágena tipo IV se encuentran presentes y con una

distribución definida en la sinovia semejando una lámina basal (*Nikkari, 1995; Smith, 1998; Rinaldi, 1998*).

La microcirculación de la subíntima sinovial se lleva a cabo a través de una red de vénulas, arteriolas y venas que se originan a nivel de la unión hueso-cartílago, y presentan estrecha relación con los del periostio, del hueso y de la médula ósea (*Wilkinson, 1989*). Además, contiene un plexo de vasos linfáticos que es importante en la regulación del contenido del líquido sinovial, ya que participa drenando el exceso y manteniendo una presión subatmosférica en la articulación. Asimismo, este plexo es la única vía por la cual las macromoléculas tales como las proteínas plasmáticas, los fármacos unidos a proteínas, los complejos inmunes, el hialuronato y las macromoléculas del cartílago parcialmente degradadas son removidas de la articulación (*Brown, 1991*). Los solutos pequeños tales como el bióxido de carbono, el lactato y las citocinas difunden directamente a los capilares de la íntima (*Simkin, 1990*). El plexo linfático se encuentra separado de la cavidad articular por el grosor de la MEC de la íntima. Ésta modifica el microambiente no sólo por intervenir en la separación de los capilares y la cavidad articular sino también por determinar la facilidad con la que el agua, las macromoléculas y el hialuronato alcanzan el sistema linfático.

DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DE LA MEMBRANA SINOVIAL DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

La membrana sinovial inflamada presenta un incremento en la celularidad, la cual es propiciada principalmente por las células reclutadas del torrente sanguíneo más que por una hiperproliferación y diferenciación de las propias de la sinovia, lo cual se ha determinado en experimentos donde la incorporación de timidina tritiada es baja. La íntima sinovial se incrementa de 1 ó 2 a 6 ó 10 monocapas, a lo que se denomina *pannus*. El principal componente celular son los macrófagos activados o sinoviocitos tipo A. La región de la subíntima sinovial presenta folículos de células linfoides alrededor de los vasos sanguíneos, así como linfocitos dispersos entre ellos. La neovascularización es importante y se encuentran células endoteliales activadas. También se observan células plasmáticas, dendríticas y fibroblastos activados (*Athanasou, 1995; Feldmann, 1996*).

COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DE LA MEMBRANA SINOVIAL NORMAL

Los sinoviocitos tipo B son las células responsables de la síntesis de las macromoléculas de la MEC. La sinovia es rica en fibrillas y microfibrillas de las colágenas tipos I y III, las cuales se encuentran en cantidades similares, predominando la tipo III en la íntima sinovial (*Okada, 1990; Schneider, 1994*). La colágena tipo VI forma microfibrillas cuyo principal papel es el mantenimiento de la integridad estructural de la matriz ya que se une al hialuronato y a la fibronectina (*Kielty, 1992*). La presencia de fibronectina se ha determinado tanto en la íntima como en la subíntima sinovial, mientras que la colágena tipo IV y la laminina se encuentran sólo en la parte basal de la íntima, rodeando a los sinoviocitos tipo B y en los vasos sanguíneos

(Pollock, 1990; Revell, 1995). También se presentan algunos glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados tales como el 6- y el 4-sulfato de condroitina, el sulfato de heparán y el de queratán (Edwards, 1995; Revell, 1995). El hialuronato se presenta en mayor concentración en la íntima sinovial y la microdensitometría indica que hay un gradiente de concentración del GAG que se extiende a una profundidad de 90 µm con una mayor concentración en la superficie sinovial y alrededor de los vasos sanguíneos (Worrall, 1991). Finalmente también se han detectado algunas glicoproteínas estructurales tales como la entactina (nidógeno) y la tenascina por debajo de la íntima (Cutolo, 1992; Edwards, 1995; Revell, 1995). Sin embargo no se ha detectado vitronectina (Tomasini-Johansson, 1998).

COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DE LA MEMBRANA SINOVIAL DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

Esencialmente se encuentran las mismas macromoléculas que en una sinovia normal, sólo que las proporciones y localizaciones varían (Edwards, 1995). Por ejemplo, en una membrana sinovial reumática se reporta un incremento en la síntesis y secreción de tenascina y de hialuronato (Castor, 1971; Cutolo, 1992), sin embargo este último posee un peso molecular diferente (Dahl, 1985) y se encuentra distribuido no sólo en la íntima, como en una sinovia normal, sino también en la subíntima, especialmente alrededor de los vasos sanguíneos y de las áreas de alta densidad celular. Esto podría estar relacionado con el tráfico celular o la angiogénesis (Worrall, 1991). Por otra parte, la colágena tipo V sólo es detectada en la sinovia de pacientes con AR y generalmente se encuentra asociada con fibrillas relativamente finas (Okada, 1990); también se observa un incremento en el contenido de colágena tipo I (Smith, 1998), de fibronectina (Carsons, 1995; Sarkissian, 1998) y de vitronectina producida por los macrófagos y

fibroblastos (Rinaldi, 1997; Tomasini-Johansson, 1998). Asimismo, se ha determinado una pérdida gradual en el contenido de laminina (Rinaldi, 1998).

EXPRESIÓN DE CITOCINAS EN LA MEMBRANA SINOVIAL DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

Las citocinas son un grupo heterogéneo de moléculas de naturaleza glicoproteica, de bajo peso molecular (7 a 30 kD), producidas por una gran variedad de células; actúan de forma autocrina, paracrina o endocrina y a concentraciones picomolares, regulan el crecimiento, la morfología, la migración y la función celular, por lo que desempeñan un papel esencial en la inflamación, en la respuesta inmune y consecuentemente en la fisiopatología de la AR (Alvaro-Gracia, 1992).

Entre las citocinas pro-inflamatorias sobreexpresadas, de las cuales se conoce su participación en la desregulación que se presenta en esta enfermedad durante la fase crónica, se encuentran la interleucina-1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), que actúan de forma sinérgica y son consideradas como las "citocinas artritogénicas" (Cooper, 1992), la IL-6, la IL-8, el factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) (Gowen, 1983; Firestein, 1990; Mera, 1991; Mulero, 1991; Seitz, 1991; Holt, 1992; Alvaro-Gracia, 1992; Chu, 1992; Akaoshi, 1993; Chen, 1993; Farahat, 1993; Manicourt, 1993; Rathanaswami, 1993; Sack, 1993; Shingu, 1993; Taub, 1994; Hosaka, 1994; Katsikis, 1994; Reitamo, 1994; Keyszer, 1994; Wang, 1994; Brennan, 1995; Cush, 1995; Feldmann, 1996; Furuzawa-Carballeda, 1999a).

De la IL-1 existen 2 genes distintos que codifican dos isoformas, la IL-1 α y la IL-1 β . Ambas tienen un peso molecular de 17 kD en su forma extracelular y derivan de un precursor de 31 kD que carece de actividad biológica. Su similitud es sólo del 26% por lo que a aminoácidos se refiere y del 45% en los nucleótidos, sin embargo las dos tienen las mismas acciones biológicas y se unen al mismo receptor extracelular. Son sintetizadas fundamentalmente por los macrófagos y en menor grado por las células dendríticas, las de Langerhans, las endoteliales, las mesangiales, las epiteliales, los astrocitos, la microglía, los fibroblastos, los neutrófilos y las líneas de células T y B activadas. La IL-1 es una de las citocinas más pleiotrópicas, que ejerce acciones sobre una gran variedad de células. Además de su efecto activador sobre las células T, es capaz de promover la maduración de las pre-B y de actuar sinérgicamente con otros factores en la proliferación y la secreción de las inmunoglobulinas por las células B maduras. Así pues, son sus múltiples efectos pro-inflamatorios los que han despertado un gran interés en cuanto a su participación en la AR (*Gowen, 1983; Firestein, 1990; Holt, 1992; Alvaro-Gracia, 1992; Chu, 1992; Farahat, 1993*).

El TNF- α se sintetiza como un precursor intracelular de 26 kD que posteriormente es transformado a la forma extracelular activa de 17 kD por una metaloproteasa (MMP) denominada "TACE" (TNF- α -converting enzyme) (*Black, 1997*). El factor es secretado fundamentalmente por los macrófagos activados aunque los linfocitos, las células NK y los mastocitos también lo producen. Más que por su efecto inductor de la necrosis hemorrágica de ciertos tumores y la caquexia en enfermedades parasitarias, es reconocido en la actualidad por sus acciones pro-inflamatorias. En realidad, comparte casi todas las actividades de la IL-1, salvo las de activación linfocitaria (*Alvaro-Gracia, 1992; Chu, 1992; Farahat, 1993; Firestein, 1990*).

Ambas citocinas han sido detectadas tanto en el líquido como en el tejido sinovial de pacientes con AR por hibridación *in situ*, inmunoelectrotransferencia e inmunohistoquímica (Firestein, 1990; Alvaro-Gracia, 1992; Manicourt, 1993; Feldmann, 1996; Dolhain, 1998). Estas mismas proteínas también se han determinado en los cultivos de las mezclas de células derivadas de la digestión enzimática de las membranas sinoviales a través de ensayos inmunoenzimáticos, inmunoelectrotransferencia y bioensayos (Brennan, 1989; Alvaro-Gracia, 1992; Brennan, 1995; Feldmann, 1996).

Debido a ello el TNF- α ha sido considerado como el blanco terapéutico en muchos ensayos preclínicos y clínicos, en los cuales se han empleado anticuerpos monoclonales quiméricos (ratón y humano, denominado cA2), cuya afinidad es de 1.8×10^{-9} M y los cuales neutralizan la actividad biológica del factor (Paleolog, 1996) obteniéndose resultados alentadores cuando los pacientes reciben entre 5 a 20 mg de anticuerpo (cA2)/kg de peso corporal durante 4 semanas (Brennan, 1997; Perkins, 1998).

Por otro lado, linfocinas tales como la IL-2, la IL-4 y el INF- γ no son halladas dentro de la articulación, lo que produce una evidente dificultad para evaluar la participación de las células T (Firestein, 1988; Salmon, 1995).

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LA MEMBRANA SINOVIAL DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

El estudio de los mecanismos de interacción entre los macrófagos, los linfocitos, las células sinoviales y las endoteliales así como el efecto de esta interacción sobre la cavidad articular han resultado de gran interés, debido a que la infiltración masiva de las células mononucleares (CMNs) es una de las características histopatológicas constantes en la AR. De tal

forma que la adhesión y migración celular, la generación de la respuesta inmune, la destrucción de las células blanco, la interacción de las células con los componentes de la MEC, la organización estructural de la sinovia, el recambio de la misma y la generación de los fenómenos inflamatorios, son procesos que dependen de la presencia de los *receptores específicos* en la membrana celular. Entre ellos se incluyen:

1) *La Familia de las Selectinas*: son glicoproteínas transmembranales que poseen un dominio tipo lectina, otro tipo factor de crecimiento epidérmico y de 2 a 9 dominios semejantes al factor del complemento, se expresan en la membrana de los leucocitos, las plaquetas y las células endoteliales. Se han descrito 3 tipos de selectinas, la L-selectina (LAM-1, gp90MEL, Mel-14, Leu 8, LECAM-1), la E-selectina (ELAM-1, LECAM-2) y la P-selectina (CD62, PADGEM, GMP-140, LECAM-3). La primera se sintetiza constitutivamente por la mayor parte de los leucocitos, los monocitos, las células T, los polimorfonucleares y otras células mieloides; la segunda lo hace en el endotelio activado y la tercera se detecta en las plaquetas y en las células endoteliales. Los ligandos que se unen a las selectinas son principalmente oligosacáridos que se encuentran en la membrana de diversas células. La E-selectina y la L-selectina inducen la adhesión reversible de los linfocitos y los granulocitos a las células endoteliales mediante el fenómeno de rodamiento (rolling) a lo largo de las paredes de la microvasculatura; éste es el paso inicial en la migración de los leucocitos a través de los endotelios. La P-selectina se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y en las plaquetas se localiza en las membranas de los gránulos densos, por lo que es capaz de mediar las interacciones entre éstas y los leucocitos y posiblemente también entre las células endoteliales y los leucocitos (*Bevilacqua, 1993; Cronstein, 1993; Chapman, 1995*).

II) *La Familia de las Integrinas*: comprende a un grupo de glicoproteínas heterodiméricas transmembranales que se unen al citoesqueleto. Fueron denominadas así debido a su función integradora de las células con la MEC produciendo así una señal. Las integrinas están constituidas por una cadena β y una α asociadas de manera no covalente; se conocen al menos 8 cadenas β (1 a 8) y 15 cadenas α (α_1 a la α_8 , α_L , α_M , α_X , α_d , α_{IIIb} y α_v) (Rinaldi, 1997). Existe una asociación preferencial de algunas cadenas α con ciertas β , lo que da lugar a la formación de 3 subfamilias: cuando la cadena β_1 (CD29) se asocia a las cadenas α_1 a la α_8 se genera la *subfamilia de las integrinas β_1 o VLA* (Very Late Activation Antigens); cuando la cadena β_2 (CD18) se asocia con las cadenas α_L , α_M , α_X y α_d se constituye la *subfamilia de las integrinas β_2 o leucointegrinas*; y por último, la β_3 se asocia preferencialmente con α_v (CD41/CD51) que se denomina *subfamilia β_3 o de las citoadhesinas*. Las integrinas β_1 se expresan casi en todas las células del organismo a excepción de los neutrófilos. Entre sus funciones se incluyen el reconocimiento de los componentes de la MEC o ligandos celulares. Las integrinas β_2 se expresan únicamente en los leucocitos participando en la actividad citotóxica mediada por las células NK y la dependiente de anticuerpos, la función cooperadora de las células T, la unión de los leucocitos al endotelio, la presentación antigénica, la agregación, la migración y la quimiotaxis leucocitaria, la opsonización y fagocitosis y la interacción leucocitaria con superficies recubiertas de proteínas séricas. La subfamilia β_3 se expresa en las plaquetas, reconoce ligandos de la MEC con la secuencia RGD tales como la fibronectina, el fibrinógeno, el factor de Von Willebrand, la vitronectina y la trombospondina, la osteopontina y la colágena (Bevilacqua, 1993; Cronstein, 1993; Chapman, 1995; El-Gabalawy, 1996).

III) *Las Moléculas de la Superfamilia de las Inmunoglobulinas*: son glicoproteínas que poseen regiones que se semejan a las de los dominios de las inmunoglobulinas. Se expresan en los linfocitos así como en otras células, e incluyen a CD2 (LFA-2), LFA-3, ICAM-1 ó CD54, ICAM-2, CD4, CD8, el complejo TCR/CD3, VCAM-1 y las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) I y II, entre otras. La molécula CD2 se expresa en todos los linfocitos T y en la mayor parte de las células NK, cuando se une a sus ligandos principales (LFA-3, CD59 ó CD58) cambia su conformación generándose el CD2R que envía señales de activación celular. La molécula LFA-3 expresada en linfocitos activados, presenta diversas isoformas que parecen tener afinidad similar por el CD2. Las moléculas ICAM-1 e ICAM-2 están relacionadas en estructura y función, participan en las interacciones célula-célula y se asocian a una o más integrinas β_2 (LFA-1 o CD11a/CD18 y Mac-1). Las moléculas CD4 y CD8 se expresan principalmente en los linfocitos T y están funcionalmente relacionadas con el complejo TCR/CD3. No funcionan propiamente como moléculas de adhesión, ya que al parecer su función principal es la de generar señales de coestimulación que favorezcan la activación de las células T, mediada por los antígenos a través del complejo TCR/CD3. Este complejo se encuentra constituido por el TCR propiamente dicho, formado por las cadenas α y β , o las γ y δ que pertenecen también a la superfamilia de las inmunoglobulinas y forman heterodímeros que poseen la capacidad de reconocer los péptidos unidos a las moléculas del CPH, asociado no covalentemente al complejo molecular CD3 formado por las subunidades γ , δ , ϵ y ζ . Es en este sentido que el complejo TCR/CD3 funciona como una molécula de adhesión altamente específica (Bevilacqua, 1993; Cronstein, 1993; Chapman, 1995).

Así, la presencia de los leucocitos en el espacio subsinovial, detectada en los primeros días o semanas tras el comienzo de los síntomas articulares y coincidentemente con la lesión

endotelial inicial de la microvasculatura, tiene su origen en la migración celular desde la sangre periférica a través de la membrana sinovial. El primer paso (reversible), para que un leucocito activado circulante abandone el torrente sanguíneo y sea reclutado al interior de un tejido, es su adhesión al endotelio por el cual literalmente rueda sobre los segmentos afectados en una sucesión de uniones y desuniones consecutivas con las células endoteliales, a través de las selectinas vasculares E y P que reconocen a los hidratos de carbono (SLe^x) en el extremo flexible de ELAM-1 localizado selectivamente en las microvellosidades de la superficie celular de los leucocitos que inician el contacto. Particularmente, la unión de las células linfoides a la E-selectina está mediada por las moléculas CD31 y CD44. La interacción de la E-selectina con los leucocitos permite la exposición de éstos a agentes quimiotácticos, citocinas o activadores producidos en el microambiente. Lo anterior incrementa la expresión y la avidéz de las integrinas leucocitarias, principalmente las α_2 , (LFA-1 por su ligando ICAM-1, $\alpha_4\beta_1$ o VLA-4 por VCAM-1, etc). Así, la especificidad en el reclutamiento de uno u otro tipo de leucocito está dada por los factores activadores que son producidos localmente. Cuando las células T son estimuladas, la unión al endotelio activado por la IL-1 y/o el TNF- α , la IL-4 ó la IL-6, utiliza las dos vías VLA-4/VCAM-1 y LFA-1/ICAM-1, mientras que la adhesión al endotelio en reposo se realiza fundamentalmente a través de LFA-1/ICAM-2. Una vez que los leucocitos y las células T activadas atraviesan el endotelio, penetran en la membrana sinovial e interactúan con los componentes de la MEC tales como la fibronectina, laminina y colágena, a través de las integrinas de $\alpha_1\beta_1$, α_4 etc. Estas últimas incrementan su expresión y afinidad por un cambio conformacional. La interacción de las células T con las proteínas de la MEC, genera a su vez señales de activación que estimulan a las células a través del complejo TCR/CD3 (Athanasou, 1995).

Ensayos inmunohistoquímicos realizados a cultivos de sinoviocitos tipo B o en fragmentos de sinovia de pacientes con AR, han mostrado que existen alteraciones en la expresión de algunas moléculas de adhesión:

I) *De la Familia de las Selectinas* se ha determinado el incremento de ELAM-1 y PECAM las cuales son reguladas por las citocinas artritogénicas (Tak, 1995; Paleolog, 1996; Youssef, 1997; Dolhain, 1998).

II) *De la Familia de las Integrinas*, la $\alpha_6\beta_1$ se ha encontrado disminuída, probablemente debido a la sobreexpresión de la IL-1 β y el TNF- α (Pirila, 1996; Rinaldi, 1998); la integrina $\alpha_v\beta_3$ no se expresa (Nikkari, 1995; Pirila, 1996), las integrinas $\alpha_{1-5}\beta_1$ presentan un incremento en su expresión con respecto al tejido sinovial normal (Cicutini, 1994; Tak, 1995; Pirila, 1996; Rinaldi, 1997). Además se observa una sobreexpresión en las leucointegrinas α_L , α_M , α_X y α_d durante la sinovitis crónica (El-Gabalawy, 1996).

III) *De la Superfamilia de las Inmunoglobulinas* se ha demostrado un aumento en la expresión de VCAM-1 e ICAM-1, el cual está regulado por las citocinas pro-inflamatorias (Lindsley, 1993; Gerritsen, 1993; Cicutini, 1994; Szekanecz, 1994; Tak, 1995; Iademarco, 1995; Paleolog, 1996; El-Gabalawy, 1996; Youssef, 1997; Lambert, 1998; Dolhain, 1998; Furuzawa-Carballeda, 1999a).

ACTIVIDADES PROTEOLÍTICAS EN LA MEMBRANA SINOVIOL DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

Existen evidencias del papel particular de las proteasas independientes y dependientes del calcio (MMPs) en procesos patológicos, dadas por la determinación de éstas a nivel de ARNm, de proteína, por su actividad enzimática en el sitio de la lesión, así como por su producción por las

células en cultivo. Esto sugiere que dichas proteasas pueden ser importantes en la pérdida de la homeostasis que incrementa el recambio de la MEC de la sinovia, del cartílago articular, de las estructuras periarticulares y en la reabsorción ósea en la AR (*Matrisian, 1994, Müller, 1996; Lark, 1997; Miyata, 1998*).

Por ejemplo, a través de técnicas de hibridación *in situ* se ha demostrado que las células que conforman el *pannus* expresan los ARNm para las proteasas independientes del calcio, tales como las cisteín-proteasas (catepsina L), las proteasas del ácido aspártico (catepsina D) y la elastasa de neutrófilos que se expresan predominantemente en la íntima sinovial, en las regiones intersticiales y perivasculares por los linfocitos de los infiltrados inflamatorios, no así en las membranas del grupo control no inflamatorio (*Starkey, 1977; Keyszer, 1995; Kakimoto, 1995; Owen, 1995*).

Por otra parte, las MMPs secretadas como proformas se activan en el espacio extracelular por otras proteasas tales como la plasmina y las estromelisin-1 y -2 (*Birkedal-Hansen, 1995; Murphy, 1994; Koolwijk, 1995*) y se expresan en la capa íntima y subíntima de las sinovias artríticas (*Maeda, 1995*). Los estudios inmunohistoquímicos han documentado las frecuencias y distribuciones de la mayoría de las MMPs. La presencia de la MMP-3 (estromelisin-1) se asocia a la MEC y/o a las células inflamatorias mientras que la MMP-1 (colagenasa intersticial) y -2 (gelatinasa A o tipo IV o de 72 kD) se observa en las células de la capa íntima y en las estromales. En cambio no se detecta la presencia de la MMP-10 (estromelisin-2) (*Hembry, 1995; Gruber, 1996*).

La MMP-9 (gelatinasa B o tipo IV o de 92 kD) se ha observado a nivel del ARNm y de la proteína en los osteoclastos pero no en el tejido sinovial de AR (*Grillet, 1997; Okada, 1995*). Sin embargo, estudios *in vitro* han aportado evidencias acerca de la participación de la MMP-9 en el

metabolismo óseo normal y patológico ya que esta enzima degrada los polímeros insolubles de la colágena tipo I despolimerizada por ácidos y las fibrillas de colágena del hueso desmineralizado (Okada, 1995).

Algunos otros estudios han mostrado que la MMP-3 y la MMP-1 colocalizan con la IL-1 β y el TNF- α en el sitio de unión del cartílago y el *pannus* (Tetlow, 1995; Tetlow, 1998). Esto sugiere que las MMPs pueden estar asociadas a la MEC (colágena) por algún tiempo, para después ejercer su actividad degradativa potenciando así la sinovitis y la migración celular. Además, la síntesis de estas enzimas parece ser regional, episódica y finamente regulada por las citocinas pro-inflamatorias producidas localmente.

Los estudios realizados en el líquido sinovial y el suero obtenidos de pacientes con AR, muestran que principalmente la MMP-3, -1 y -9 se encuentran en cantidades abundantes con respecto al grupo control tanto en el líquido sinovial como en el suero y que la concentración se puede relacionar directamente con el grado de inflamación sinovial (Okada, 1995; Manicourt, 1995; Koolwijk, 1995; Maeda, 1995; Yoshihara, 1995; Ahrens, 1996; Gruber, 1996; Grillet, 1997; Reboul, 1996; Ishiguro, 1996; Watanabe, 1997; Brennan, 1997).

En conclusión, a partir de los estudios inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ* en las sinovias, el hueso subcondral y el cartílago articular, de la determinación de la concentración de las MMPs a través de técnicas inmunoenzimáticas y de la zimografía sérica, plasmática y del líquido sinovial, se ha demostrado que las MMPs se encuentran expresadas tanto en situaciones normales como patológicas y que las diferencias en la participación dentro de cualquiera de estos procesos depende de la presencia, concentración y combinación de varias proteasas.

INHIBIDORES TISULARES DE LAS METALOPROTEASAS (TIMPS) EN LA MEMBRANA SINOVIAL DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

Existen tres tipos de TIMPs que han sido identificados y clonados. Éstos poseen dos dominios: el N-terminal que reacciona con los centros activos de la mayoría de las MMPs y el C-terminal que participa en la unión de la región C-terminal de las gelatinasas. Los TIMPs son moléculas que contienen secuencias semejantes a factores de crecimiento presentes quizá en la región C-terminal (*Hayakawa, 1992; Hayakawa, 1994; Kikuchi, 1997*). En el humano el TIMP-1 es una glicoproteína de 28.5 kD y el TIMP-2 es una proteína no glicosilada de 21 kD; ambos son producidos de manera constitutiva por varios tipos celulares tales como las células mesenquimáticas y las endoteliales, y su presencia se ha demostrado en los fluidos corporales y en los extractos tisulares (*Overall, 1994*). Su regulación génica parece ser diferente ya que la inducción de la expresión del TIMP-1 es controlada por diversas citocinas (IL-1, IL-6) y factores de crecimiento (TGF- β , bFGF, etc.) (*Overall, 1994*), mientras que aún no se determina cómo es la del TIMP-2. El TIMP-3 es una proteína de 21 kD que puede ser glicosilada, y sus ARNm, tanto en el humano como en el ratón, se han encontrado expresados en una gran variedad de tejidos incluyendo los diferentes estadios de desarrollo (*Murphy, 1994*).

Si bien las formas individuales de los TIMPs muestran una homología de tan sólo el 40%, comparten una alta similitud estructural. Esto se debe a que todas contienen 12 residuos de cisteína conservados que generan enlaces disulfuro produciendo una estructura de seis asas. Estas tres proteínas son formas de alta afinidad que se unen de manera no covalente e irreversible, formando complejos estequiométricos (1:1) con las proformas y las formas activas de las MMPs (*Bodden, 1994; Murphy, 1994*). El(los) mecanismo(s) por el(los) cual(es) los TIMPs se unen fuertemente, aunque con diferente afinidad, a los centros activos de las MMPs e inhiben su

función, es(son) todavía poco entendido(s), debido a la carencia de estructuras tridimensionales. Sin embargo, estudios de mutagénesis dirigida muestran que los residuos del 1 al 13 son importantes en la unión (*Woessner, 1994; Bodden, 1994*).

La unión de los TIMPs involucra numerosos puntos de interacción con las MMPs. El dominio C-terminal tiene distintos sitios de unión en la enzima, los cuales difieren de acuerdo a la MMP y actúan en conjunto para incrementar su capacidad de inhibición, además ésta se ve aumentada por la posibilidad de la interacción del dominio N-terminal de las MMPs con el N-terminal de los TIMPs (*Murphy, 1994*).

Particularmente, la MMP-2 es inhibida por las interacciones entre el dominio C-terminal de la enzima y del TIMP-1 y -2, formándose en el último un tallo iónico (*Murphy, 1994*).

El TIMP-1 se encuentra distribuido por toda la sinovia de los pacientes con AR y en cantidad abundante, sin embargo no se detecta el TIMP-2 (*Hembry, 1995; Gruber, 1996*).

Existen algunos otros inhibidores como la α_1 -antitripsina que bloquea la función de la MMP-8 (*Lacraz, 1992*).

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEASAS Y LOS TIMPs

La regulación de la biosíntesis de las proteasas es inducida por las citocinas pro-inflamatorias, tales como la IL-1 y el TNF- α (*Shingu, 1995; West-Mays, 1995; Migita, 1996; Brennan, 1997; Cawston, 1998*), así como por la interacción de las integrinas con sus ligandos, tales como la α_v o α_4 con la fibronectina, la β_2 -microglobulina con el CPH, VCAM-1 con VLA-4, etc. (*Larjava, 1993; Romanic, 1994; Tremble, 1994; Rukonen, 1995; Wang, 1995; Migita, 1997; Rinaldi, 1997; Sarkissian, 1999*). La inhibición de la actividad y/o expresión se lleva a cabo a

través de la α_2 -macroglobulina, los TIMPs (TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3) y algunas citocinas, tales como la IL-4, la IL-6, la IL-10, el INF- γ , etc. (*Birkedal-Hansen, 1995*).

En lo que se refiere a la inhibición de la expresión de las MMPs por factores solubles, se ha determinado que la IL-4, el INF- γ o los inhibidores de la proteína-quinasa C (PKC) son capaces de modular la síntesis y expresión de algunas MMPs. Por ejemplo, la inhibición de la actividad de la PKC con calfostatina o la adición de la IL-4 a los cultivos de fibroblastos dérmicos humanos o de macrófagos alveolares disminuye los niveles de ARNm para la estromelina, mientras que la producción del TIMP-1 no se modifica (*Prontera, 1996; Lacraz, 1992*).

La IL-10, así como la IL-4 inhiben la producción de los transcritos de la MMP-9 e incrementan sólo la del TIMP-1 en los monocitos y macrófagos del humano, pero no en los fibroblastos, lo que sugiere que estas citocinas actúan de forma célula-específica (*Lacraz, 1995*).

La biosíntesis de la matrilisina por los monocitos y macrófagos de sangre periférica es inhibida por la IL-4, la IL-10 y el INF- γ , por glucocorticoides (dexametasona) y retinoides (todos los ácidos trans-retinoicos), ya que al parecer la interacción del corticoide o retinoide con su receptor interfiere directamente con la expresión del factor AP-1 reprimiendo la transcripción génica o por asociación a *c-fos* o *c-jun* impidiendo así su función (*Matrisian, 1994; Busiek, 1995; Overall, 1994*).

Recientemente se ha demostrado que la PGE₂ es capaz de inhibir la síntesis y secreción de la MMP-1 y -3 así como del TIMP-1 en los cultivos de fibroblastos sinoviales de AR tratados previamente con IL-1 (*DiBattista, 1995*).

V. ANTECEDENTES

La colágena-PVP es la mezcla de colágena porcina pepsinizada tipo I y la polivinilpirrolidona en una solución amortiguadora de citratos que estabiliza el pH, irradiada por rayos gamma. En condiciones de cultivo a 37°C y pH neutro el biofármaco no forma un gel y sus propiedades electroforéticas, fisicoquímicas y farmacológicas se encuentran modificadas por la unión covalente entre la colágena y la PVP. Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que el compuesto actúa diferente de como lo hacen sus componentes por separado (colágena y PVP) como se ha descrito previamente (*Chimal-Monroy, 1997*). Este biofármaco tiene efectos moduladores sobre el metabolismo de la colágena y su aplicación mejora los procesos reparativos de la piel y de otros tejidos. Lo anterior se ha determinado durante el tratamiento de heridas quirúrgicas en ratas Wistar, donde la colágena-PVP aplicada intralesionalmente induce un incremento del tejido de granulación hasta el día 7 posterior a la cirugía y produce una mejor arquitectura tisular al día 14 con respecto al grupo control. Esto incluye la presencia de anexos cutáneos (glándulas sebáceas y folículos pilosos) y un arreglo en la disposición de las fibras de colágena, el cual es similar al de la piel normal (*Kröttsch-Gómez, 1993*).

Asimismo, en las fracturas producidas en ratas induce la síntesis de osteopontina y osteonectina acelerando la consolidación ósea (*Almazán, 1996; Chimal-Monroy, 1998*).

Por otro lado, se ha demostrado su eficacia en la resolución de padecimientos fibrosantes dérmicos, como las cicatrices hipertróficas en humanos, donde la aplicación intralesional en dosis de 0.2 ml por cada 5 cm de cicatriz, de forma semanal durante un período máximo de 6 meses, o en una terapia preventiva, aplicado tres semanas antes y tres después de realizar una resección quirúrgica. La evaluación clínica incluyó parámetros tales como la eliminación de la sensación

urente, el prurito, el dolor, el restablecimiento de la normocromía, el reblandecimiento y la eliminación del exceso de fibrosis de la cicatriz. En cuanto a los parámetros histológicos se observó una cantidad menor de la colágena depositada, la recuperación de la colágena tipo III de la dermis papilar y un arreglo de las fibras semejante al de la piel normal, disminución del infiltrado celular y corrección del contorno epidérmico. Inmunohistoquímicamente, se evaluó la presencia de algunas citocinas pro-inflamatorias/fibrogénicas (IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1 y PDGF) y de las MACs (ELAM-1 y VCAM-1) determinándose que todas estas proteínas se expresaron abundantemente en el tejido de las cicatrices hipertróficas sin tratamiento, no así en las tratadas con el biofármaco cuyos niveles fueron similares a los de la piel normal (*Kröttsch-Gómez, 1998*).

Este efecto inmunomodulador de la colágena-PVP también fue observado en las lesiones cutáneas de escleroderma tratadas con una aplicación intralesional por semana durante 12 semanas, mejorando su textura y apariencia. Histológicamente, se observó una remodelación del tejido fibroso que permitió el restablecimiento de la proporción de las colágenas tipos I y III, la recuperación de la colágena tipo III de la dermis papilar, se conservó el contorno epidérmico y además se presentaron anexos cutáneos. Inmunohistoquímicamente se determinó que la colágena-PVP fue capaz de regular negativamente la expresión de IL-1 β y ELAM-1. Con esto se concluyó que el biofármaco mejora la arquitectura tisular de las manifestaciones cutáneas de escleroderma y regula negativamente algunos de los parámetros pro-inflamatorios (*Barile, 1998*).

Finalmente se han realizado algunos estudios de bioseguridad y farmacovigilancia así como análisis clínicos y pruebas de laboratorio en voluntarios sanos y pacientes, no encontrándose reacciones adversas o efectos secundarios aún después del uso prolongado de la colágena-PVP (más de 12 meses). Además se ha demostrado que el biofármaco no produce ni fibroproliferación (*Kröttsch-Gómez, manuscrito en preparación*) ni linfoproliferación. Tampoco

se ha determinado que posea o induzca algún efecto genotóxico (*Furuzawa-Carballeda, manuscrito en preparación*).

VI. JUSTIFICACIÓN

La AR es una enfermedad de prevalencia considerable en la población mexicana (1-3%). En la actualidad aún se desconoce(n) el(los) mecanismo(s) que inicia(n) y perpetúan el proceso inflamatorio, produciendo la sinovitis característica de la AR. Sin embargo se conoce que dentro de los signos patognomónicos se encuentran una exacerbación de la síntesis y liberación de las citocinas pro-inflamatorias y de las proteasas, así como la inhibición de la producción de algunos componentes del tejido conjuntivo de la sinovia y la degradación de otros. Por ello con base en los antecedentes farmacológicos del medicamento se sugiere que éste probablemente pudiese tener un efecto regulador sobre el proceso inflamatorio.

VII. HIPÓTESIS

La colágena-PVP aplicada a los cultivos de la membrana sinovial de pacientes con AR, actuará interrumpiendo el proceso de la inflamación a través de la modulación de la producción de algunas de las citocinas pro-inflamatorias, de las colagenasas y de las moléculas de adhesión.

VIII. OBJETIVO GENERAL

Debido a que existen evidencias de que la adición de proteínas de la MEC a cultivos de linfocitos T es capaz de modular su respuesta (*Easter, 1988; Rybski, 1989; Rüg, 1989; Cutolo, 1992*), en el presente trabajo se analizará el efecto de una proteína de MEC modificada, la colágena-polivinilpirrolidona (colágena-PVP), sobre algunos parámetros inflamatorios en cultivos de membrana sinovial de pacientes con AR, enfermedad cuyo signo patognomónico es la inflamación crónica.

IX. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el contenido total de colágena en las membranas sinoviales en cultivo con o sin colágena-PVP al 1%.
- Analizar la histomorfología de las sinovias en cultivo.
- Determinar el porcentaje relativo de las colágenas tipos I y III en el tejido sinovial.
- Evaluar la actividad colagenolítica total, dependiente e independiente del calcio en los sobrenadantes del cultivo.
- Cuantificar los niveles del TIMP-1 en los sobrenadantes de cultivo.
- Evaluar la expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 en el tejido sinovial.
- Cuantificar los niveles de IL-1 β y TNF- α en los sobrenadantes de cultivo.

VIII. OBJETIVO GENERAL

Debido a que existen evidencias de que la adición de proteínas de la MEC a cultivos de linfocitos T es capaz de modular su respuesta (*Easter, 1988; Rybski, 1989; Rüeg, 1989; Cutolo, 1992*), en el presente trabajo se analizará el efecto de una proteína de MEC modificada, la colágena-polivinilpirrolidona (colágena-PVP), sobre algunos parámetros inflamatorios en cultivos de membrana sinovial de pacientes con AR, enfermedad cuyo signo patognomónico es la inflamación crónica.

IX. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el contenido total de colágena en las membranas sinoviales en cultivo con o sin colágena-PVP al 1%.
- Analizar la histomorfología de las sinovias en cultivo.
- Determinar el porcentaje relativo de las colágenas tipos I y III en el tejido sinovial.
- Evaluar la actividad colagenolítica total, dependiente e independiente del calcio en los sobrenadantes del cultivo.
- Cuantificar los niveles del TIMP-1 en los sobrenadantes de cultivo.
- Evaluar la expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 en el tejido sinovial.
- Cuantificar los niveles de IL-1 β y TNF- α en los sobrenadantes de cultivo.

X. MATERIALES Y MÉTODOS

Membranas sinoviales de pacientes con AR y de individuos sanos (No-AR). Se obtuvieron las membranas sinoviales de 10 pacientes con AR, que cumplían con los criterios de diagnóstico del Colegio Americano de Reumatología (*Arnett, 1988*). Nueve de ellos fueron mujeres con una edad promedio de 50 años (50 ± 17 ; promedio \pm DS, con un intervalo de 33 a 67 años) y un tiempo de evolución de la enfermedad de 15 ± 6 años. Las muestras fueron de pacientes sometidos a un reemplazo de cadera o rodilla, quienes se trataron previamente con fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad y anti-inflamatorios no esteroideos.

Las membranas sinoviales de los individuos No-AR se obtuvieron de 3 sujetos varones y 2 mujeres polifracturadas los cuales fueron sometidos a cirugía, cuya edad promedio fue de 40 ± 21 años (intervalo de 19 a 61 años). Este grupo control corresponde a los individuos que no presentan evidencia de alguna enfermedad reumática o procesos asociados con inflamación crónica.

Todas las muestras se obtuvieron con el consentimiento previo e informado de los pacientes y con la respectiva aprobación institucional.

Cultivo de tejidos. Para el cultivo de tejidos se emplearon todas las sinovias obtenidas a pesar de la variabilidad en el contenido de células inflamatorias o de que el tejido se encontrara en un estado fibroso, lo cual se determinó histológicamente. El tejido sinovial se separó de la grasa, el hueso y el cartílago y se fragmentó en segmentos de aproximadamente 7 mm^3 . Después de lavar las sinovias con medio de cultivo RPMI-1640 (HyQ cell culture Reagents, Logan UT), se sembraron de 50 a 60 secciones de las muestras de cada uno de los pacientes tomadas al azar y colocadas en placas de 24 pozos (Costar, Cambridge, MA). Para ello se emplearon membranas de

policarbonato de 1 μm de diámetro de poro (Costar) y 500 μl de RPMI-1640, con 10% suero fetal de ternera inactivado (HyQ cell cultures Reagents) y 100 U de penicilina/10 mg de estreptomicina/25 μg de anfotericina B/ml (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO). De 25 a 30 de los fragmentos se cultivaron sin colágena-PVP representando a los *cultivos control*, mientras otros 25 a 30 fragmentos de la membrana sinovial del mismo paciente se cultivaron durante 7 días con *colágena-PVP al 1% dializada* (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de colágena). Los cultivos se realizaron por duplicado para cada una de las pruebas y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% CO_2 /95% aire. El sobrenadante y los tejidos fueron recuperados al día 3, 5 y 7 y se conservaron a -70°C hasta su uso (*Figura 4*).

Determinación del contenido total de colágena. La determinación del contenido total de colágena en las membranas sinoviales se llevó a cabo de acuerdo al micrométodo de Woessner (1961). Para ello se preparó una solución con 25 mg de L-hidroxiprolina (SIGMA) en 250 ml de HCl 0.001 N. Los estándares para la curva patrón se obtuvieron mediante la dilución de la solución anterior con agua para obtener concentraciones de 0 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de L-hidroxiprolina. El amortiguador de ácido cítrico se preparó diluyendo 50 g del ácido monohidratado, 12 ml de ácido acético glacial, 120 g de acetato de sodio trihidratado y 34 g de hidróxido de sodio, en un volumen final de 1 lt de agua destilada y el pH se ajustó a 6.0. De los tejidos homogenados se tomaron 250 μl a los cuales se les adicionaron 250 μl de HCl 12 N. Las muestras se hidrolizaron durante 48 horas a 104°C. Posteriormente se evaporó el ácido y el hidrolizado se resuspendió en 100 μl de agua destilada. De la suspensión se tomaron 5 μl y se agregaron 195 μl de agua destilada. La oxidación de la hidroxiprolina se inició adicionando 100 μl de una solución de cloramina T 0.05 M (1.41 g de p-toluensulfoncloramida de sodio de SIGMA, disuelta en 20 ml de agua destilada, 30 ml de metilcelosolve o etilenglicolmonometil éter de MERCK, Darmstat y 50

ml del amortiguador de ácido cítrico). Los contenidos de los tubos fueron mezclados y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. La oxidación con la cloramina T se detuvo adicionando 100 μ l de una solución de ácido perclórico 3.15 M e incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron 100 μ l de una solución de p-dimetilaminobenzaldehído al 20% (SIGMA) en metilcelosolve. Los tubos se incubaron en un baño de maría a 60°C durante 30 minutos y después se mantuvieron a 4°C. El desarrollo del color fue estable durante 1 hora. Las reacciones se leyeron en un colorímetro a 557 nm y los resultados se interpolaron en la curva patrón de hidroxiprolina. La normalización de los datos obtenidos se llevó a cabo considerando la concentración del ADN total del tejido cultivado.

Histología. Los tejidos se tiñeron de acuerdo a la técnica de Herovici (1963), en la cual una mezcla de ácido pícrico, azul de metilo y fucsina ácida permiten la diferenciación de la agregación de las fibras de colágena tipo I (haces más gruesos en su mayoría) que se tiñen en magenta y las de tipo III en azul (haces más delgados).

SDS-PAGE con reducción retardada. Para la determinación del porcentaje relativo de las colágenas tipos I y III se emplearon homogenados de tejido, los cuales se trataron durante 72 horas con 10 μ l de pepsina (100 mg/ml en ácido acético 5 M) en agitación suave a 4°C. Posteriormente las muestras se dializaron en una solución de ácido acético 5 mM. De los dializados se tomaron 20 μ l y se diluyeron volumen a volumen con el amortiguador de carga de Laemmli (1970). Éstos se desnaturalizaron en un baño de maría durante 5 minutos. Después fueron centrifugados y del sobrenadante se corrió un gel de poliacrilamida al 7.5% a 60 mA. La electroforesis se interrumpió cuando el frente del colorante se encontraba a 7 mm en el gel separador y a cada carril se adicionaron 5 μ l de β -mercaptoetanol al 20% (glicerol, agua destilada, β -mercaptoetanol, SDS al 10%, amortiguador de Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8). El gel se

incubó durante 15 minutos y se continuo el corrimiento. Finalmente los geles se tiñeron con una solución de nitrato de plata y se realizó el análisis densitométrico para las bandas $\alpha_2(I)$, $\alpha_1(I)$ y $\alpha_1(III)$ (Sykes, 1976).

Determinación de la concentración de ADN. La evaluación del contenido de ADN de las muestras se llevó a cabo de acuerdo al método de Labarca (1980), que a continuación se describe brevemente: se tomaron 100 μl de las muestras de tejido homogenadas, los cuales se adicionaron a 2.8 ml de un amortiguador de fosfatos 0.05 M, con cloruro de sodio 2 M a un pH de 7.4 y de 3 μl de una solución a 100 $\mu\text{g/ml}$ del reactivo de Hoechst 332584. El blanco de reactivos se preparó con el amortiguador de fosfatos y el equivalente del reactivo. Se realizó una curva patrón con ADN de timo de ternera (MERCK), cuyos intervalos incluyeron las concentraciones de 100 ng a 1 μg de ADN. La lectura se realizó en un fluorómetro a 360 nm de excitación y 460 nm de emisión.

Determinación de la actividad colagenolítica. Para determinar la actividad colagenolítica total se emplearon 140 μl del sobrenadante del cultivo, los cuales se incubaron durante 24 horas a 35°C con 100 μl de un amortiguador de Tris-HCl 0.050 M, NaCl 0.20 M, N-etilmaleimida 0.005 M, glucosa 0.4 M y CaCl_2 5 mM, pH 7.8 y 5 μl de N-[propionato-2,3- ^3H]-colágena tipo I de rata (AMERSHAM LIFE SCIENCE, Buckinghamshire, Eng) con una actividad específica de 4 000 cpm. Para determinar la actividad colagenolítica independiente del calcio los sobrenadantes se incubaron en el mismo amortiguador, salvo que el CaCl_2 se substituyó por EDTA 10 mM. Posteriormente, la reacción se detuvo adicionando 50 μl de o-fenantrolina 80 mM diluida en dioxano/agua (v/v). Las proteínas de las muestras se precipitaron agregando 500 μl de dioxano y se centrifugaron a 9 000 g, durante 15 minutos a 4°C. Del sobrenadante se tomaron alícuotas de 500 μl , se mezclaron con 2 500 μl de líquido de Bray y se determinaron las

cpm en un contador de centelleo (Beckman, modelo LS 1801, Fullerton, CA). Durante el ensayo se corrió un control negativo en el que se sustituyó el sobrenadante de cultivo por agua destilada.

La actividad colagenolítica dependiente de calcio se calculó como la diferencia de la actividad colagenolítica total (aquella obtenida en el amortiguador de CaCl_2) menos la actividad colagenolítica independiente de calcio (aquella obtenida en el amortiguador de EDTA). La actividad se expresó como las cpm/24 horas a $35^\circ\text{C}/\mu\text{g}$ de ADN (Murawaki, 1990).

Cuantificación de los niveles del TIMP-1. La concentración del TIMP-1 se determinó en los sobrenadantes de cultivo diluïdos entre 5 a 20 veces con el amortiguador empleado para la curva patrón, a través de un ensayo inmunoenzimático de tipo ELISA en fase sólida (AMERSHAM). Cien μl de las diluciones del estándar del TIMP-1 o de las muestras de los sobrenadantes de cultivo fueron incubados durante 2 horas a temperatura ambiente en las placas que previamente tenían unido un anticuerpo anti-TIMP-1. Posteriormente las placas se lavaron y aspiraron, y se les adicionaron 100 μl de un anticuerpo anti-TIMP-1 humano acoplado a la peroxidasa. Lo anterior se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. El TIMP-1 unido a la fase sólida se detectó a los 30 minutos de incubación por la reacción de la peroxidasa sobre 100 μl del substrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, peróxido de hidrógeno al 20% (v/v) y dimetilformamida. La reacción se paró empleando 100 μl de una solución de H_2SO_4 1 M. La lectura se realizó a 450 nm de longitud de onda. El sistema reconoció con la misma reactividad no sólo al TIMP-1 libre, sino también el complejo con la pro-MMP-9 las formas activas de MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9. La sensibilidad del sistema fue de 1.25 ng/ml, y la linealidad obtenida entre los 3.13 ng/ml y los 60 ng/ml. La corrección de los resultados se llevó a cabo a través de la concentración de ADN del tejido.

Cuantificación de los niveles de IL-1 β y TNF- α . La concentración de la IL-1 β y el TNF- α se determinó en los sobrenadantes de cultivo con un ensayo inmunoenzimático de tipo ELISA en fase sólida (AMERSHAM). Cincuenta μ l de las diluciones del estándar de la IL-1 β o del TNF- α , o las muestras de los sobrenadantes de cultivo y 50 μ l de un anticuerpo anti-citocina acoplado con biotina fueron incubados durante 2 horas a temperatura ambiente en las placas que previamente tenían unido un anticuerpo anti-citocina. Posteriormente las placas se lavaron y aspiraron, y se les adicionaron 100 μ l de un complejo de avidina-peroxidasa el cual se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron, aspiraron y se les aplicaron 100 μ l del substrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, peróxido de hidrógeno al 20% (v/v) y dimetilformamida. Se incubaron durante 30 minutos en la obscuridad. La reacción se paró empleando 100 μ l de una solución de H₂SO₄ 0.18 M. La lectura se realizó a 450 nm de longitud de onda. En este sistema de ELISA la sensibilidad fue <1 pg/ml (0.05 pg/pozo) para la IL-1 β y <5 pg/ml (0.25 pg/pozo) para el TNF- α . La corrección de los resultados se llevó a cabo a través de la concentración de ADN del tejido.

Inmunohistoquímica. Para la técnica de inmunoperoxidasa se emplearon criocortes fijados con acetona absoluta durante 3 minutos. Posteriormente los tejidos se incubaron con una solución de H₂O₂ al 3 % (JT Baker) durante 20 minutos. Los sitios de pegado inespecífico fueron bloqueados con albúmina de huevo al 3% (SIGMA) durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Los tejidos se incubaron durante 18 horas con el anticuerpo primario, una inmunoglobulina monoclonal de tipo IgG/k preparado en ratón anti-VCAM-1 o -ICAM-1 humanas (GENZYME Corporation, Cambridge, MA) a una concentración de 10 μ g/ml y a 4°C. Como anticuerpo secundario se empleó una IgG anti-inmunoglobulina de ratón biotinada preparada en caballo (VECTASTAIN Elit ABC kit, Vector Lab, CA), las criosecciones se incubaron durante 1

hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. A continuación se empleó el complejo avidina-peroxidasa (VECTASTAIN Elit ABC Kit, Vector Lab), con el que se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se desarrolló cubriendo los tejidos durante 10 minutos con una solución de 6 mg de diaminobencidina en 10 ml de Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4 y 10 μ l de H₂O₂ que produce un precipitado color sepia en las células inmunorreactivas. Las muestras se contratiñeron con hematoxilina de Harris durante 10 minutos, se deshidrataron con alcohol y xileno y finalmente se montaron con resina. Durante el ensayo se corrió un control negativo en el que se sustituyó el primer anticuerpo por uno no relacionado (suero normal de humano diluido 1:100) y un blanco de reactivos en el que se reemplazó el anticuerpo primario por albúmina de huevo al 3% en PBS 0.01 M, pH 7.4. Al menos dos secciones de 2 diferentes tejidos fueron analizadas en cada paciente y para cada día del cultivo. La expresión de las moléculas de adhesión se reportó determinando el número de células inmunorreactivas al anticuerpo de un total de 400 células en los vasos sanguíneos (células endoteliales, CMNs en el lumen o perivasculares) y las células dispersas (infiltrados inflamatorios intersticiales y células mesenquimáticas) a lo largo de un campo (10X). Los valores representan el promedio del porcentaje de las células inmunorreactivas \pm error estándar (ES) (*Furuzawa-Carballeda, 1999a*).

Análisis estadístico. Todos los experimentos fueron realizados al menos por duplicado. La asociación entre las variables cuantificables se determinó empleando la prueba *t* de Student pareada. Los resultados expresan el promedio \pm ES, donde $p \leq 0.05$ fueron consideradas como estadísticamente significativas.

XI. RESULTADOS

Efecto de la colágena-PVP en la proliferación celular del tejido sinovial en cultivo.

Para determinar si el biofármaco producía un efecto a nivel de la proliferación celular o bien directamente en el metabolismo, se procedió a cuantificar el contenido de ADN de los cultivos de sinovias de individuos sanos (No-AR) y de pacientes con AR, con o sin colágena-PVP al 1% aplicada al cultivo durante los 7 días. En la determinación no se encontraron diferencias en la concentración del ADN en los cultivos de sinovias No-AR y la mayoría de las AR, entre los cultivos control y los tratados con colágena-PVP (*Tabla I*). Lo anterior sugiere que la acción del biofármaco en los cultivos de membranas sinoviales de pacientes con AR se debe a su efecto sobre el metabolismo, más que a la modificación del número celular. Es de hacer notar que el contenido de ADN en los cultivos de sinovias No-AR fue de 3 a 6 veces menor comparado con el de los pacientes con AR, debido al contenido variable de células inflamatorias.

Tabla 1. Contenido de ADN en los cultivos de tejido sinovial de individuos No-AR y de pacientes

con AR. †

Tratamiento	Control	Colágena- PVP	Control	Colágena- PVP	Control	Colágena- PVP
Día de cultivo	3	3	5	5	7	7
No-AR*	0.5±0.2	0.5±0.3	0.5±0.2	0.7±0.2	0.5±0.3	0.5±0.3
AR 1	0.9±0.4	1.5±0.2	1.6±0.3	1.5±0.6	1.2±0.4	1.1±0.5
AR 2	3.5±1.1	4.5±1.6	1.4±0.8	1.9±0.0	2.3±1.3	7.9±1.3**
AR 3	1.2±1.0	5.0±0.7**	1.2±0.0	2.6±0.5	1.6±0.9	1.0±0.1
AR 4	1.2±1.1	5.1±3.2	1.1±0.2	2.0±1.2	1.0±0.1	3.5±0.4
AR 5	1.9±0.8	5.0±0.9**	2.9±1.5	3.9±1.5	3.9±3.0	2.2±0.7
AR 6	8.8±5.3	4.7±3.1	1.4±0.2	5.8±1.4	4.7±1.7	6.4±6.7
AR 7	2.4±1.5	5.2±0.8	2.2±1.0	5.8±1.2**	2.7±0.4	4.6±0.5
AR 8	0.2±0.1	0.7±0.1	0.5±0.5	0.8±0.1	0.4±0.3	0.5±0.3
AR 9	0.2±0.1	0.3±0.1	0.4±0.0	0.4±0.2	0.3±0.0	0.6±0.3
AR 10	1.1	0.6	0.7	0.7	0.7	0.6
AR1 ‡	2.3±2.8	3.4±2.4	1.4±0.9	2.6±2.1	1.9±1.7	3.0±3.0

†Contenido de ADN ($\mu\text{g/ml}$) en los homogenados de 3 a 5 mg de tejido sinovial.

*Los resultados representan el promedio \pm DS de los duplicados de los cultivos de membrana sinovial de 5 individuos No-AR.

‡Los resultados representan el promedio \pm DS de los duplicados de los cultivos de membrana sinovial de 10 pacientes con AR.

**p=0.05

Efecto de la colágena-PVP en el contenido total de colágena en los cultivos de sinovia. Con el fin de determinar si la colágena-PVP era capaz de modificar el contenido total de colágena, éste fue cuantificado en los cultivos control *versus* sus respectivos cultivos tratados durante 7 días con el biofármaco al 1%, tanto en las membranas sinoviales de individuos sanos como en las de los pacientes con AR. No se encontró ninguna diferencia entre los cultivos de sinovias No-AR control y las tratadas (*Figura 5a*) así como tampoco en las de AR, en los diferentes días de cultivo (*Figura 5b*). Sin embargo en el día 3 de cultivo la cantidad de colágena en las membranas sinoviales de pacientes con AR fue menor.

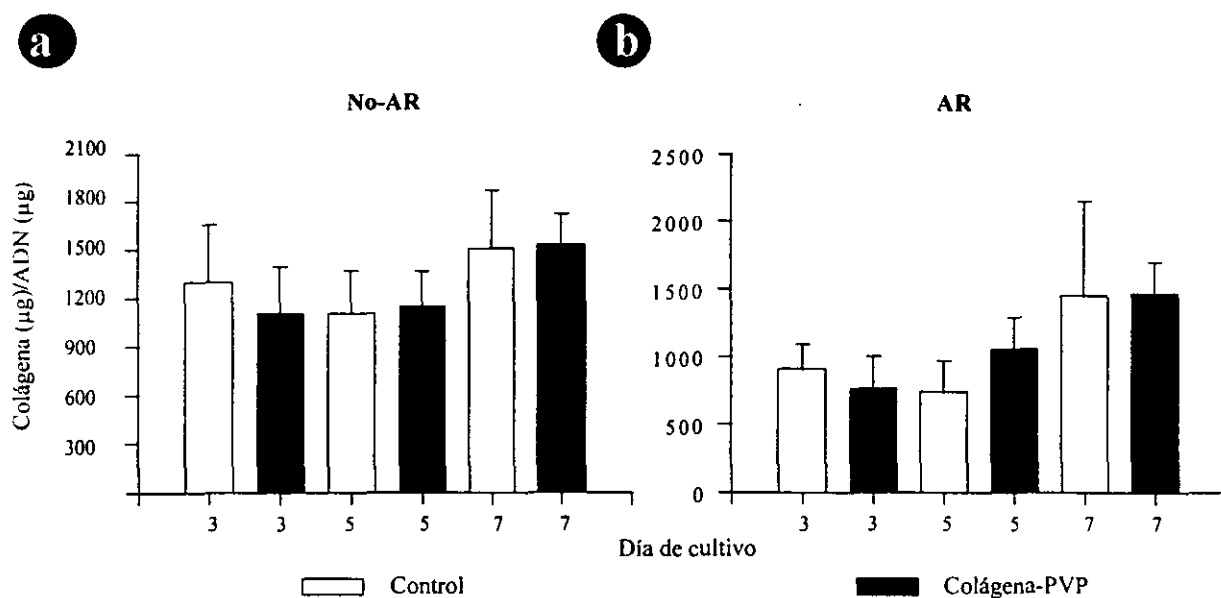


Figura 5. Contenido total de colágena. Éste se cuantificó a través de una reacción colorimétrica en hidrolizados ácidos de las muestras para determinar el contenido de hidroxiprolina. Los resultados representan el promedio \pm ES de los cultivos tratados o control realizados por duplicado, para cada uno de los días de cultivo, en cada una de las muestras de **a**, No-AR (n=5) y **b**, de los pacientes con AR (n=10). Los datos obtenidos fueron normalizados de acuerdo al contenido en microgramos de ADN de las muestras correspondientes.

Datos histológicos. Los datos histológicos obtenidos indican que las membranas sinoviales de las muestras No-AR no sufrieron cambio alguno en cuanto a su arquitectura tisular, aún después de la aplicación de la colágena-PVP al 1% (*Figura 6b*) con respecto a los cultivos control (*Figura 6a*). En lo que se refiere al grosor de las fibras colagénicas no se observó modificación ni tampoco se determinaron cambios en el número o composición de los infiltrados inflamatorios en los cultivos tratados *versus* los no tratados. Lo anterior sugiere que la aplicación del biofármaco no modificó el recambio de las fibras que potencialmente podrían ser de colágenas tipos I y III, ni indujo un daño o cambio al menos aparente en la arquitectura tisular del tejido sano. En contraste, los cultivos control de las membranas sinoviales de los pacientes con AR presentaron un contenido inflamatorio variable y fibrosis con abundantes haces gruesos de colágena tipo I en los días tercero, quinto y séptimo de cultivo (*fibras en rojo; Figura 6c*). Sin embargo las membranas sinoviales tratadas con colágena-PVP al 1% presentaron una disminución de los haces gruesos de colágena tipo I con un concomitante incremento de haces más delgados, potencialmente de colágena tipo III (*fibras en azul; Figura 6d*) de manera tiempo dependiente. La proporción de las colágenas tipos I y III fue semejante a la observada en las sinovias de individuos No-AR (*Figuras 6a, 6b y 6d*).

Membranas sinoviales teñidas con la técnica de Herovici

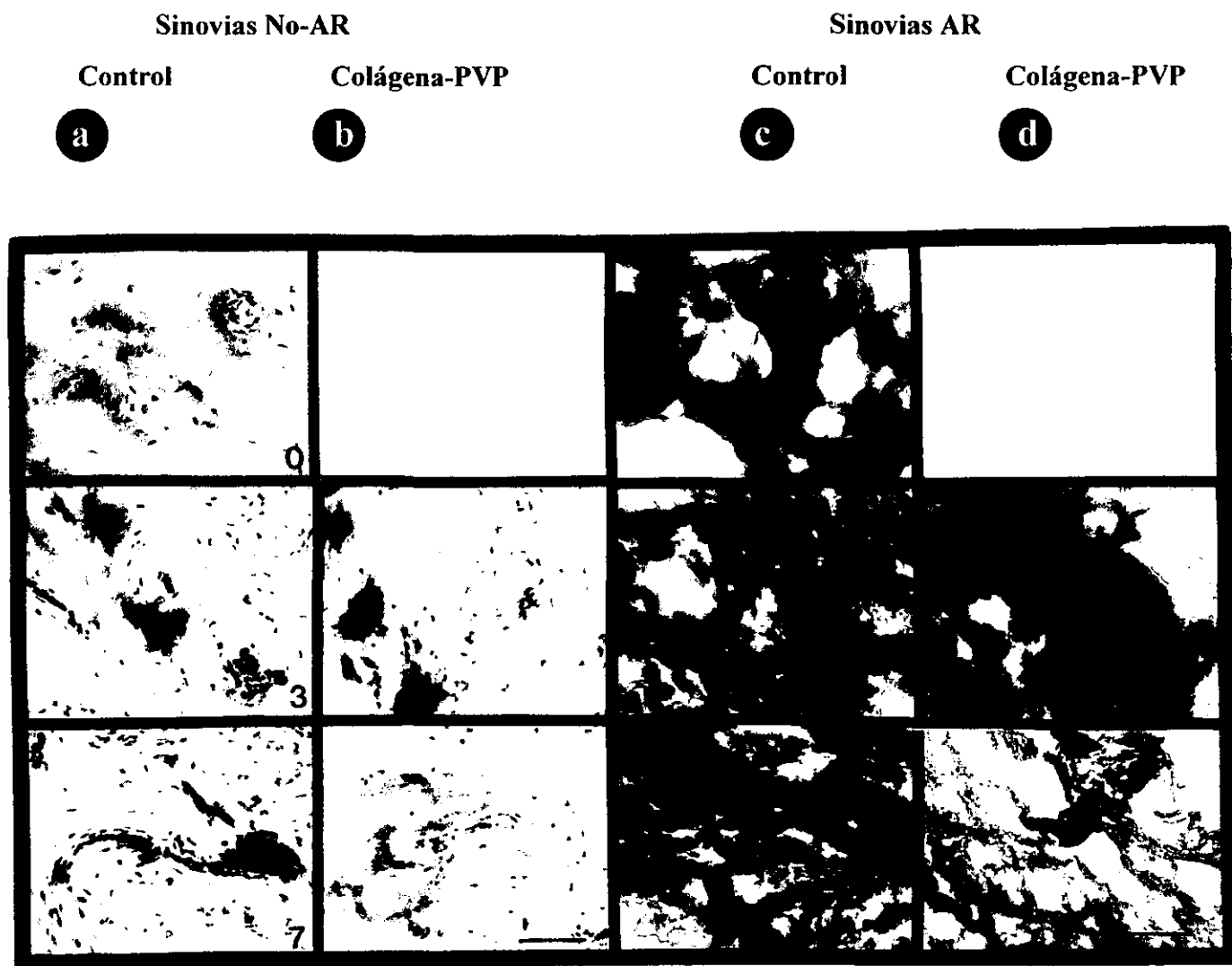


Figura 6. Efecto de la colágena-PVP en los cultivos de membrana sinovial teñidos con la técnica de Herovici. Las fibras en rojo representan a la colágena tipo I, las azules a la colágena tipo III. a, representa el cultivo control de un individuo No-AR. b, representa el cultivo tratado con colágena-PVP al 1% de un individuo No-AR. c, cultivo control representativo de una sinovia de un paciente con AR. d, cultivo representativo de una sinovia de un paciente con AR tratado con el biofármaco. Los números 0, 3 y 7 se refieren al día de cultivo. La barra representa 100 μ m.

Efecto de la colágena-PVP sobre el porcentaje relativo de las colágenas tipo I y III.

Para determinar si había alguna relevancia en los resultados histológicos obtenidos con respecto al cambio en las proporciones de las colágenas tipos I y III, en las membranas sinoviales No-AR y en las de los pacientes con AR tratadas con el biofármaco durante el cultivo, se procedió a realizar una SDS-PAGE con reducción retardada. Bajo estas condiciones de reducción los puentes disulfuro intercadena de la colágena tipo III se escinden liberando los monómeros $\alpha_1(\text{III})$, los cuales migran más lentamente que las cadenas $\alpha_1(\text{I})$ (*Figura 7a*). El análisis densitométrico de los geles mostró que en los cultivos de sinovias de individuos No-AR no se modificaron los porcentajes relativos de las colágenas aún a pesar del tratamiento con el biofármaco. Asimismo los cultivos control de las sinovias de los pacientes con AR no sufrían ninguna modificación en cuanto a sus proporciones relativas de las colágenas tipos I y III, donde la colágena tipo III se presentaba en muy bajo porcentaje. Sin embargo las sinovias en cultivo tratadas durante 7 días con la colágena-PVP al 1% presentaban una recuperación en el contenido de colágena tipo III, alcanzando una concentración similar a la observada en las membranas sinoviales de individuos No-AR (*Figuras 7b y 7c*). Este incremento fue 1.7 veces mayor en el día 7 de cultivo y el valor fue estadísticamente significativo.

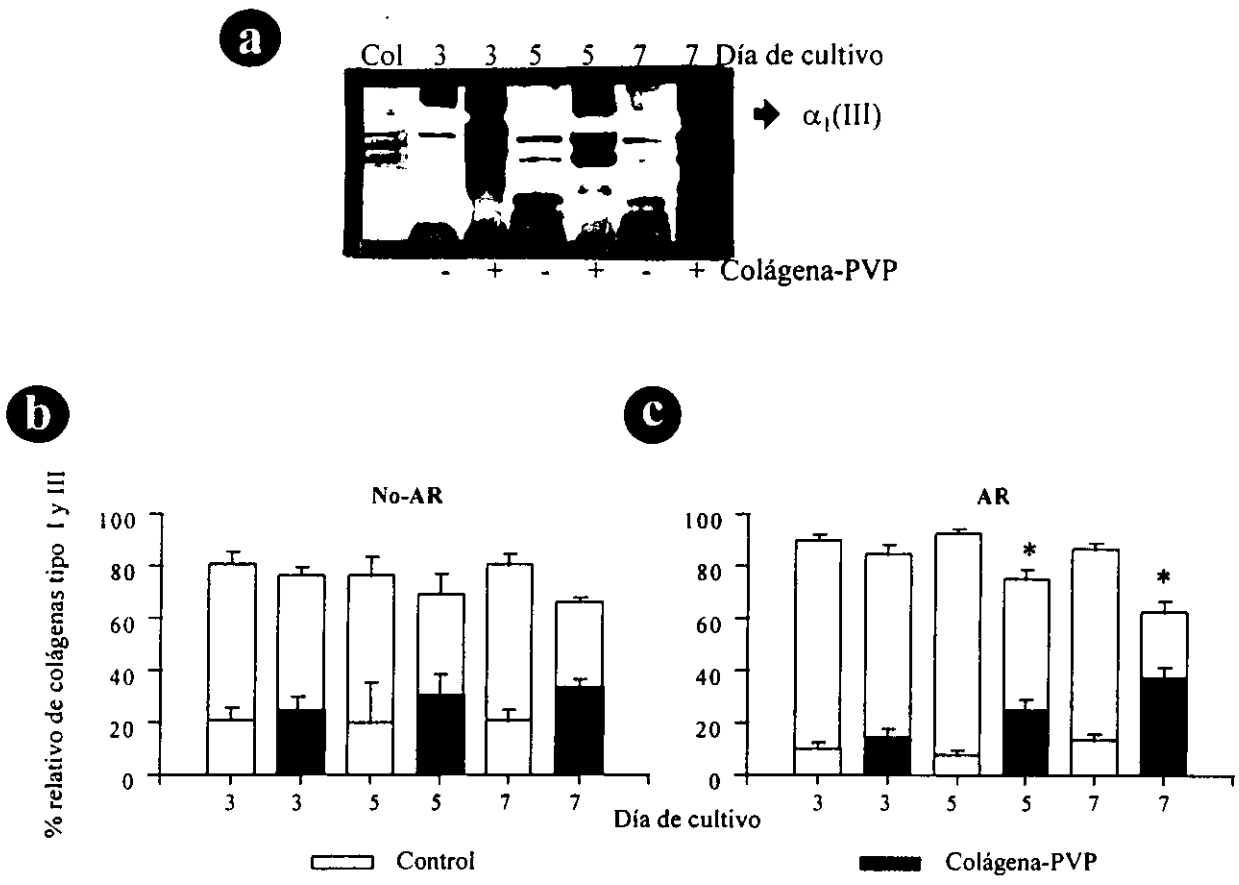


Figura 7. Efecto de la colágena-PVP en el contenido de las colágenas tipos I y III en los cultivos de sinovia. a, SDS-PAGE con reducción retardada de un cultivo de tejido sinovial de un paciente con AR. Col: muestra de colágena tipo I obtenida de Pentapharm (Basel, Switzerland); (-) cultivos control; (+) cultivos tratados con colágena-PVP al 1%. Los resultados representan el promedio \pm ES de los cultivos tratados con el biofármaco o control realizados por duplicado, en cada uno de los días de cultivo y para cada una de las muestras de b, No-AR (n=5) y de c, los pacientes con AR (n=10). Las barras grises representan del porcentaje de colágena tipo I. * $p \leq 0.0009$.

Efecto de la colágena-PVP sobre la actividad colagenolítica en los sobrenadantes del cultivo de sinovias con AR. Durante la progresión de la AR la actividad proteolítica en el sitio de la inflamación se incrementa. Por lo tanto, en los sobrenadantes de cultivo de las membranas sinoviales de los pacientes con AR se determinaron aquellas actividades de colagenasa que son tanto dependientes como independientes de la presencia del calcio para su estabilidad y funcionamiento, es decir la actividad colagenolítica total. Los resultados mostraron que la colágena-PVP aplicada durante 7 días a los cultivos fue capaz de disminuir los niveles de degradación de la ³H-colágena (*Figura 8a*).

Asimismo, los niveles de colagenasas independientes del calcio, atribuidos a la catepsina G y/o a la elastasa de neutrófilos debido a las condiciones de pH y temperatura a las que se llevó a cabo la reacción (*Murawaki, 1990*), fueron menores en los sobrenadantes de los cultivos tratados que en los controles (*Figura 8b*).

Por su parte, la actividad colagenolítica dependiente del calcio (MMPs) disminuyó ligeramente en los sobrenadantes de los cultivos tratados con respecto a los controles, sin embargo los niveles no fueron estadísticamente significativos (*Figura 8c*).

Es importante destacar que tanto las colagenasas dependientes como las independientes del calcio manifestaron niveles de actividad similares. Lo anterior sugiere que en la patogenia de la enfermedad, tanto las MMPs como otras enzimas colagenolíticas podrían encontrarse involucradas con la misma intensidad en la degradación acelerada del tejido conjuntivo de la articulación.

Finalmente, se realizó el cociente entre el contenido total de colágena y la actividad colagenolítica total. Lo anterior permitió establecer cómo se encontraba potencialmente el

depósito de colágena con respecto a su posible proporción de degradación. Así, se sugirió que la colágena-PVP probablemente permitía la recuperación de la colágena (*Figura 8d*).

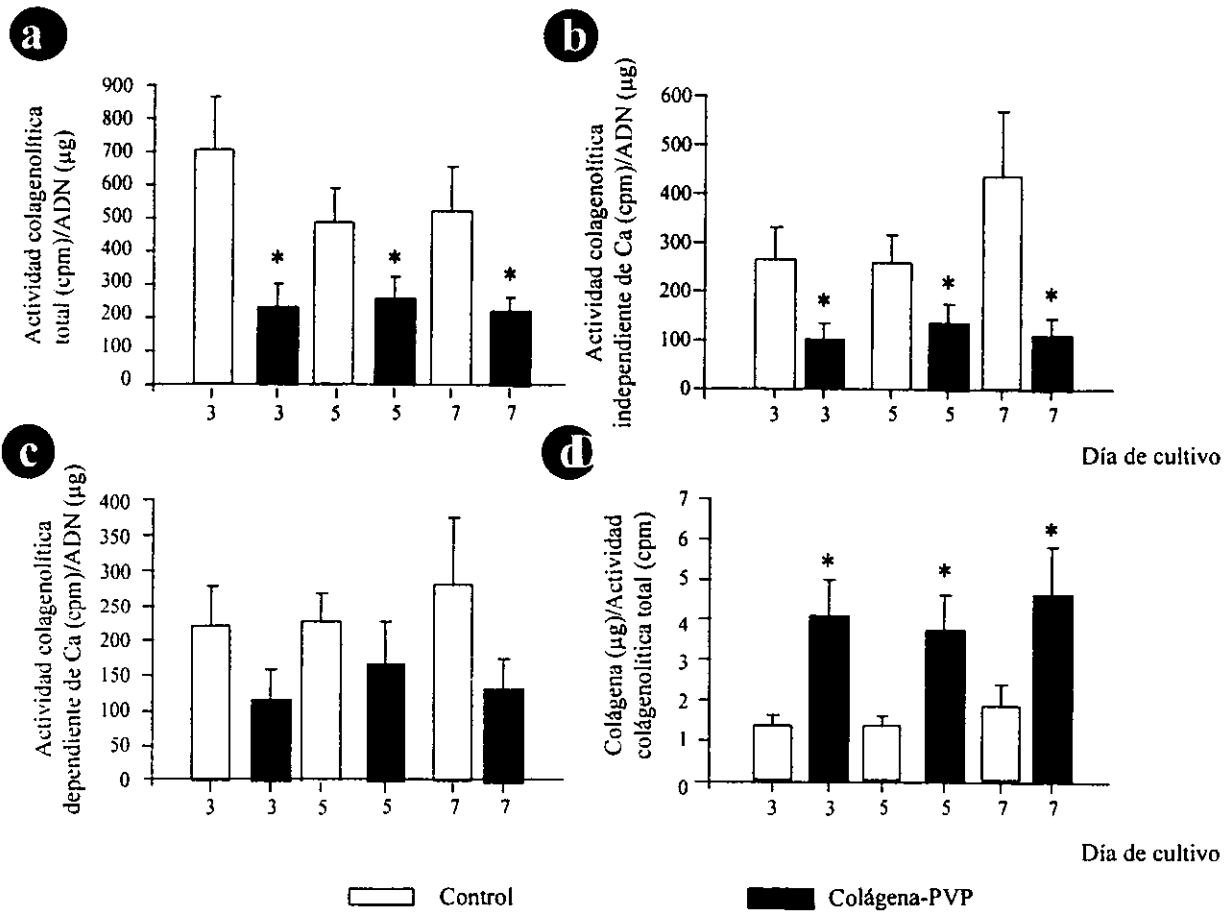


Figura 8. Efecto de la colágena-PVP sobre la actividad colagenolítica de los cultivos de sinovia de pacientes con AR. a, Actividad colagenolítica total en los sobrenadantes de cultivo control y tratados con el biofármaco, incubados con el amortiguador de CaCl_2 ($*p \leq 0.05$). b, Actividad colagenolítica independiente de calcio en los sobrenadantes de cultivo incubados con el amortiguador de EDTA ($*p \leq 0.008$). c, Actividad colagenolítica dependiente de calcio en los sobrenadantes de cultivo, que corresponde a la diferencia de la actividad colagenolítica total menos la independiente de calcio. d, Cociente entre el contenido total de colágena y la actividad colagenolítica total ($*p \leq 0.04$). Los resultados representan el promedio \pm ES de los cultivos tratados con colágena-PVP o control realizados por duplicado, en cada uno de los días de cultivo y para cada una de las muestras de los pacientes con AR ($n=10$).

Efecto de la colágena-PVP sobre la producción del TIMP-1 liberado a los sobrenadantes del cultivo por las membranas sinoviales de AR. Los niveles de TIMP-1 fueron cuantificados en los sobrenadantes de los cultivos de las sinovias de pacientes con AR no tratados o tratados durante 7 días con colágena-PVP al 1%, a través de un ensayo inmunoenzimático de tipo ELISA. Mediante dicha determinación se encontró que los niveles del TIMP-1 en los sobrenadantes de los cultivos a los que se adicionó la colágena-PVP fueron 1.7 veces menores en el día 7 que en los no tratados con el biofármaco (*Figura 9a*). Asimismo, se determinó el cociente de la actividad colagenolítica dependiente de calcio atribuible a las MMPs y el TIMP-1 (*Figura 9b*). Lo anterior permitió establecer que esta disminución en la concentración del TIMP-1 no necesariamente podría encontrarse relacionada con un incremento en la actividad proteolítica, ya que la proporción de los cocientes de los cultivos tratados fue similar a la de los controles, sin embargo las actividades colagenolíticas fueron menores en los cultivos tratados *versus* los controles.

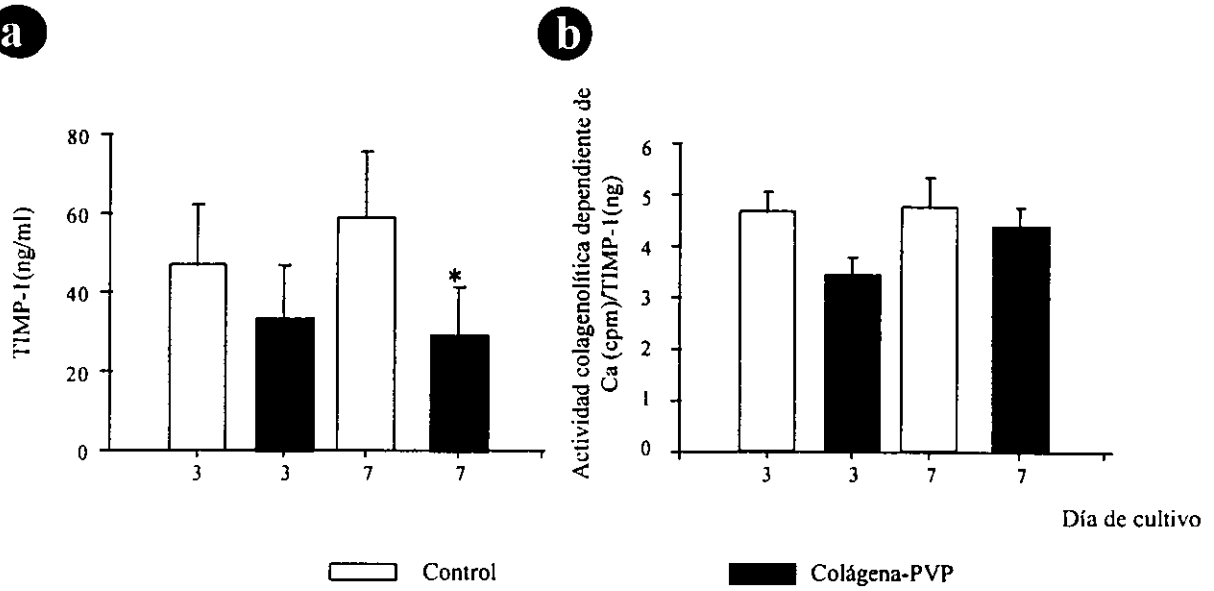


Figura 9. Efecto de la colágena-PVP sobre la producción del TIMP-1 en los cultivos de sinovia de pacientes con AR. **a,** Concentración del TIMP-1 en los sobrenadantes de los cultivos (* $p=0.04$). **b,** Cociente entre la actividad colagenolítica dependiente de calcio (MMPs) y la concentración del TIMP-1. Los resultados representan el promedio \pm ES de los cultivos tratados con colágena-PVP o control realizados por duplicado, en cada uno de los días de cultivo y para cada una de las muestras de los pacientes con AR ($n=10$).

Efecto de la colágena-PVP sobre la expresión de las moléculas de adhesión en los cultivos de membrana sinovial. Para establecer el estado inflamatorio del tejido sinovial, se determinó la expresión de dos moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas, ICAM-1 y VCAM-1, asociadas a procesos inflamatorios crónicos.

Además, con el fin de determinar si la colágena-PVP modificaba la expresión de la molécula inflamatoria ICAM-1, y asimismo de conocer la expresión de esta molécula en las membranas sinoviales de individuos No-AR, se realizaron cultivos en las mismas condiciones que los de las sinovias de AR. Se encontró que la expresión de ICAM-1 no se modificaba en los cultivos tratados con respecto a los control en los vasos sanguíneos (CMNs en el lumen y en la periferia pero en contacto íntimo con las células endoteliales de los vasos sanguíneos, así como las células endoteliales), y que el número de células inmunorreactivas fluctuaba entre el 11 y el 18% (*Figura 10a*).

El tratamiento con el biofármaco de los cultivos de las sinovias de los pacientes con AR mostró una regulación negativa en la expresión tanto de ICAM-1 como de VCAM-1 a niveles estadísticamente significativos (*Figura 10b y 10c*). Esta disminución fue más importante para VCAM-1 ya que el efecto se observó desde el día 3 de cultivo tanto en las células de los vasos sanguíneos como en las células dispersas (infiltrados inflamatorios intersticiales y células del mesénquima) (*Figura 10c*).

Por su parte, se determinó que la expresión de ICAM-1, en los cultivos tratados de membranas sinoviales de pacientes con AR disminuyó tanto en las células de los vasos sanguíneos como en las células dispersas de forma tiempo dependiente (*Figura 10b*), hasta casi alcanzar el número de células inmunorreactivas observadas en los cultivos de sinovia de individuos No-AR.

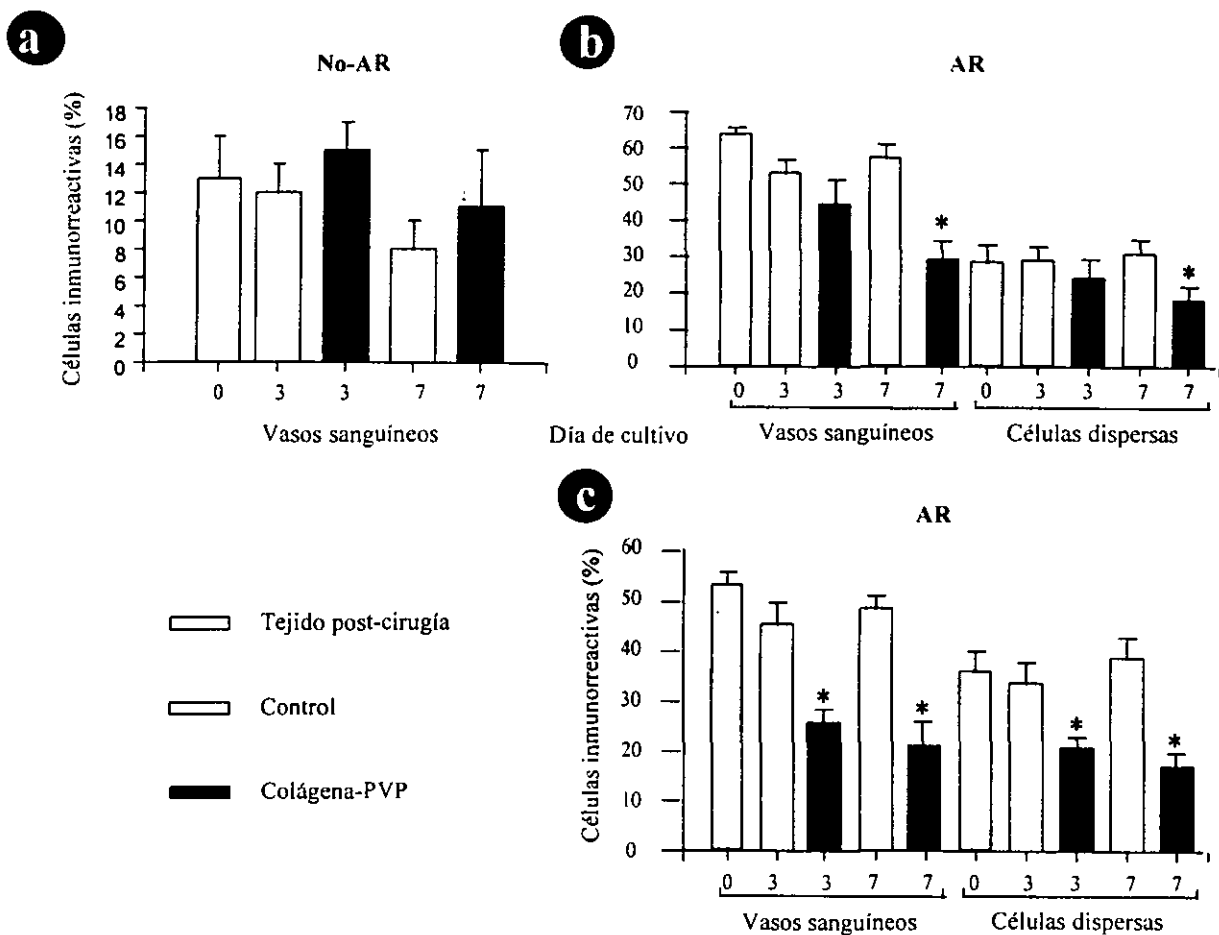


Figura 10. Expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en los cultivos de tejido sinovial. Los cortes seriados de los tejidos fueron analizados a través de la técnica de inmunoperoxidasa. La expresión de ICAM-1 y de VCAM-1 se determinó cuantificando el número de células positivas en los vasos sanguíneos y en las células dispersas. Los resultados expresan el porcentaje promedio de al menos dos cortes analizados por cada tejido \pm ES. **a**, Expresión de ICAM-1 en los vasos sanguíneos de individuos No-AR ($n=5$). **b**, Expresión de ICAM-1 en los vasos sanguíneos y las células dispersas en el tejido sinovial de los pacientes con AR ($n=10$; $*p \leq 0.04$). **c**, Expresión de VCAM-1 en los vasos sanguíneos ($*p \leq 0.05$) y las células dispersas ($*p \leq 0.03$) en el tejido sinovial de los pacientes con AR ($n=10$).

Cuantificación de citocinas en el sobrenadante del cultivo del tejido sinovial de pacientes con AR. Debido a que la actividad colagenolítica, la expresión del TIMP-1 y de las moléculas de adhesión se presentaron reguladas negativamente en los cultivos tratados con colágena-PVP, se sospechó que muy probablemente la expresión de la IL-1 β y el TNF- α se encontraba también modificada. Así la concentración de estas citocinas artritogénicas se cuantificó en los sobrenadantes del cultivo a través de un ensayo inmunoenzimático de tipo ELISA. La determinación mostró que los niveles de la IL-1 β en los cultivos tratados fueron 3 veces menores que en los controles (*Figura 11a*), mientras que los de TNF- α en los cultivos tratados fueron 4 veces menores con respecto de los no tratados (*Figura 11b*).

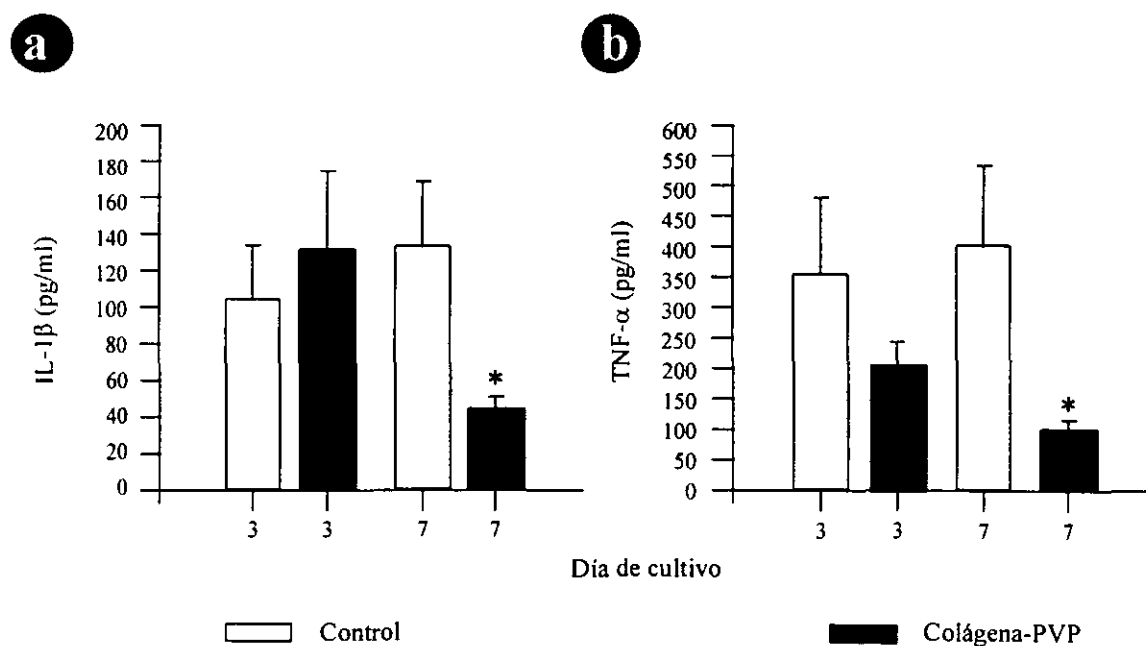


Figura 11. Efecto de la colágena-PVP en la expresión de citocinas en los sobrenadantes de cultivo de sinovias de pacientes con AR. a, Expresión de IL-1 β (* $p=0.05$). b, Expresión de TNF- α (* $p=0.03$). Los resultados representan el promedio \pm ES de los cultivos tratados con colágena-PVP o control realizados por duplicado, en cada uno de los días de cultivo y para cada una de las muestras de los pacientes con AR ($n=10$).

XII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de una proteína de MEC, la colágena tipo I polimerizada (colágena-PVP) sobre algunos parámetros pro-inflamatorios así como sobre las actividades colagenolíticas en el tejido sinovial de pacientes con AR.

Lo anterior se llevó a cabo debido a que en estudios previos se había demostrado que la adición de proteínas de la MEC modificaba la respuesta de células T *in vitro* (Easter, 1988; Rybsky, 1989; Rüeg, 1989).

Por otro lado, en un ensayo preclínico se determinó que la aplicación de colágena-PVP en la regeneración ósea de fémures de rata modulaba la producción de proteínas de la MEC, tales como osteopontina y osteonectina (SPARC), lo que sugirió que el probable efecto del biofármaco era a través de la regulación de los factores de crecimiento sintetizados por las células mesenquimáticas induciendo una señal que modificaba la migración, proliferación y diferenciación de las células condrogénicas y osteoblásticas, acelerando la consolidación ósea (Almazán, 1996; Chimal-Monroy 1998).

Asimismo, en ensayos clínicos de fase I se demostró que la colágena-PVP poseía propiedades moduladoras del recambio de otras proteínas de la MEC, particularmente de las colágenas tipos I y III, así como de regulación negativa de la sobreproducción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF- α , y PDGF-AB) y de moléculas de adhesión (ELAM-1) en la inflamación crónica de las cicatrices hipertróficas (Kröttsch-Gómez, 1998) y las lesiones cutáneas de escleroderma (Barile, 1998). Cabe resaltar que dentro de las características de acción del biofármaco se encuentran la recuperación de los niveles basales de producción dichas citocinas y MACs en estas patologías fibrosantes dérmicas.

Basados en el marco teórico anterior, resultó lógico el evaluar el posible efecto anti-inflamatorio del biofármaco en tejidos de sinovia con una inflamación crónica recurrente, la AR. El estudio consistió de dos partes: la primera en la que se evaluó si el fármaco modificaba algunas de las respuestas del tejido sinovial de individuos No-AR en las condiciones en que se llevaron a cabo los cultivos. Para ello se realizaron cultivos sin colágena-PVP y de forma pareada y paralela cultivos con el biofármaco al 1%. La segunda parte del estudio consistió en evaluar el efecto de la colágena-PVP en el tejido sinovial cuyo antecedente era la presencia de un proceso inflamatorio crónico (AR).

La adición de la colágena-PVP al 1% a los cultivos de sinovias de individuos No-AR no indujo ningún cambio en la proliferación celular, ni en su metabolismo, cuya evaluación incluyó la determinación de parámetros tales como: cambios en las proporciones relativas de las colágenas tipos I y III, en el contenido total de colágena y en la expresión de ICAM-1. Los resultados anteriores demuestran que la colágena-PVP al 1% adicionada a los cultivos no fue un agente tóxico, no modificó la fisiología del tejido, ni su morfología.

Por otra parte, en los cultivos de tejido sinovial de pacientes con AR, el biofármaco modificó el patrón histológico y bioquímico de la fibrosis, ya que si bien no indujo un cambio en el contenido total de colágena, sí produjo una recuperación de la colágena tipo III a niveles similares a los determinados en el tejido sinovial No-AR. Además, la colágena-PVP disminuyó la acumulación de los haces gruesos de colágena y estableció una arquitectura tisular semejante a la observada en la sinovia normal. Estos resultados son relevantes debido a que las macromoléculas de la matriz son esenciales para la estructura e integridad de los tejidos. Asimismo, los componentes de la matriz regulan muchas de las funciones celulares entre las que se incluyen el

fenotipo, la diferenciación, la migración, la actividad mitogénica, la activación celular, la apoptosis y la síntesis de macromoléculas (*Hynes, 1992; Almazán, 1996; Chimal-Monroy 1998*).

Además, la MEC también provee un soporte mecánico, elástico y de adhesión para las células de la íntima y los capilares; influencia la adhesión de las células de la subíntima, su proliferación y comportamiento; asimismo produce una resistencia hidráulica previniendo así el escape rápido del líquido sinovial fuera de la cavidad articular y modificando de esta forma la velocidad de salida de las macromoléculas tales como el hialuronato (*Knight, 1985*).

Las actividades proteolíticas, particularmente las colagenasas, disminuyeron en los cultivos de sinovia tratados con colágena-PVP, alterando así el balance en el recambio de proteínas de la MEC, hacia el depósito y el restablecimiento del contenido de colágena tipo III. Si bien la actividad colagenolítica calcio dependiente disminuyó, los niveles alcanzados no fueron muy diferentes de los encontrados en los cultivos control. Sin embargo la actividad colagenolítica calcio independiente, probablemente debida a la elastasa de neutrófilos y/o a la catepsina G, disminuyó a niveles estadísticamente significativos. Es importante hacer énfasis en que la participación no sólo de las MMPs sino también de otras enzimas independientes del calcio podría ser importante durante la progresión de la enfermedad. Así, esta disminución en las actividades colagenolíticas, podría contribuir a evitar una de las más importantes secuelas de la sinovitis, la invasión del cartílago y el hueso por los sinoviocitos del *pannus*.

La adición de colágena-PVP a los cultivos también indujo una disminución en la producción del TIMP-1 de forma tiempo dependiente, probablemente debida a la regulación negativa de la expresión de citocinas pro-inflamatorias (*Wang, 1995*). Aunque este resultado podría ser controversial, ya que la disminución en la concentración del TIMP-1 sugiere que las MMPs pudiesen encontrarse libres y activas, se debe considerar que:

a) se ha demostrado que este inhibidor es un factor inductor de la proliferación de fibroblastos, los cuales contribuyen a la acumulación excesiva de colágena produciendo fibrosis (*Kikuchi, 1997*) y,

b) el cociente entre la actividad colagenolítica dependiente del calcio (MMPs) y la concentración del TIMP-1, sugiere que la actividad colagenolítica no se incrementó debido a la disminución en los niveles del inhibidor, ya que las proporciones de MMPs/TIMP-1 se mantienen a niveles semejantes a los de los cultivos control. Así pues, la posible disminución en la proporción de la degradación de la colágena podría permitir una recuperación de la homeostasis tisular.

La invasión de las células del *pannus* y la fibrosis son dos eventos que se encuentran enfatizados por una relación directa entre la intensidad de la infiltración de células inflamatorias y el daño erosivo producido por las enzimas proteolíticas y las interacciones célula-célula y célula-MEC a través de las moléculas de adhesión. Estas moléculas son importantes en el mantenimiento y organización de la membrana sinovial y son esenciales para la estructura e integridad del tejido, el movimiento celular y la activación. De hecho, actualmente se reconoce que la sinovia de pacientes con AR sobreexpresa ICAM-1 y VCAM-1 (*Cicuttini, 1994; Paleolog, 1996; Kienzle, 1998; Lambert, 1998; Furuzawa-Carballeda, 1999a,b*) y que estas moléculas son reguladas positivamente por las citocinas pro-inflamatorias (*Lindsley, 1993; Cicuttini, 1994; Paleolog, 1996*). Sin embargo, después del tratamiento con colágena-PVP se observó una disminución en el porcentaje de expresión de ambas moléculas, a niveles similares a los obtenidos en las membranas sinoviales normales (*Furuzawa-Carballeda, 1999a*). Lo anterior sugiere que probablemente *in vivo* esta regulación negativa en la expresión de las moléculas de adhesión podría disminuir la activación endotelial, con la consiguiente reducción en la migración leucocitaria a la articulación sinovial.

Finalmente, nos enfocamos en dos citocinas pro-inflamatorias/fibrogénicas, la IL-1 β y el TNF- α , debido a que en cultivos de CMNs de pacientes con AR en suspensión también se ha detectado la producción espontánea de IL-1 α e IL-1 β (ARNm y proteínas) a niveles elevados durante muchos días sin estimulación exógena (Brennan, 1989). Estas citocinas artritogénicas se encuentran también relacionadas con el inicio y las exacerbaciones de la enfermedad en los ensayos *in vitro* (Gowen, 1983; Wakisaka, 1998) y en los modelos murinos (Van De Loo, 1992; Cooper, 1992). Asimismo, inducen la producción y secreción de mediadores inflamatorios tales como la prostaglandina E₂ (PGE₂), también participan en la destrucción del cartílago articular y la erosión ósea (Sklatavala, 1985; Schneider, 1994; Tetlow, 1998; Wakisaka, 1998).

Además a través de la secreción de citocinas, los sinoviocitos tipo A pueden estimular la proliferación y activación de fibroblastos los cuales a su vez inducen y/o incrementan la síntesis de otras citocinas (GM-CSF, IL-6 e IL-8), proteasas, moléculas de adhesión y otras PGs, incrementando el CPH-DR y activando a las células B y T (Schneider, 1994; Athanasou, 1995; Paleolog, 1996; Wakisaka, 1998).

En este estudio se encontró que el tratamiento de los cultivos de sinovia con colágena-PVP disminuyó los niveles de IL-1 β y TNF- α en el sobrenadante, participando en la interrupción del proceso inflamatorio a través de ejercer un efecto en el metabolismo celular. Lo anterior es consistente con lo obtenido en el análisis *ex vivo* de las biopsias de piel de cicatrices hipertróficas tratadas con el biofármaco (Kröttsch-Gómez, 1998).

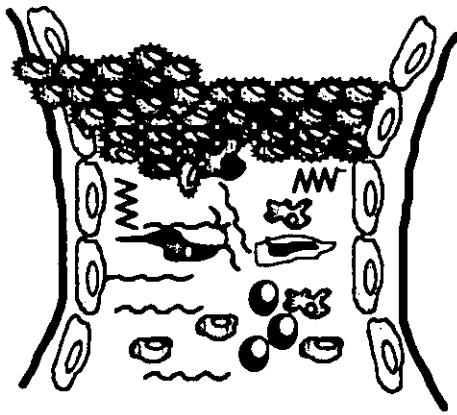
Es probable que la cuantificación de las actividades colagenolíticas, la expresión de TIMP-1 y de citocinas en el medio de cultivo no refleje necesariamente la producción total de los explantes, especialmente debido a la accesibilidad de cada glicoproteína en el medio de cultivo, ya que es posible que estas glicoproteínas queden unidas a la MEC, las células y/o los receptores.

Sin embargo, encontramos al cultivo de tejidos como una herramienta promisorio para los estudios *in vitro*, ya que se mantienen las interacciones entre las células-células y las células-MEC permitiendo así evaluar el comportamiento celular en condiciones casi similares a las observadas en el tejido *in vivo*.

Basados en los resultados obtenidos, sugerimos que la colágena-PVP adicionada a los cultivos de sinovia de AR, es capaz de modular la degradación de la colágena. Lo anterior debido a que la actividad colagenolítica disminuye, así como la producción de TIMP-1 y al incremento en el contenido de colágena tipo III. Además, el proceso inflamatorio crónico se altera por la acción de colágena-PVP, debido a la regulación negativa de la IL-1 β y el TNF- α .

Debido a lo anterior, las expectativas terapéuticas de la colágena-PVP incluyen una inmensa gama de posibilidades, entre ellas su posible empleo en humanos para el tratamiento paliativo de la artritis reumatoide.

XIII. CONCLUSIÓN

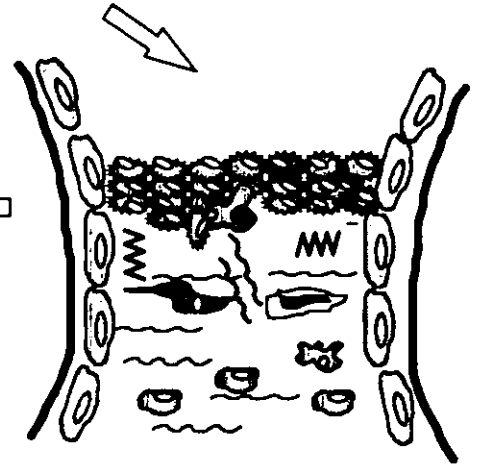


- Actividad colagenolítica
- TIMPs
- Degradación de la MEC
- Fibrosis (↓ colágena tipo III)
- Moléculas de adhesión
- Citocinas proinflamatorias



COLÁGENA-PVP

- Actividad colagenolítica (total y calcio-independiente)
- TIMP-1
- Degradación de la MEC
- Fibrosis (↑ colágena tipo III)
- Moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1)
- Citocinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α)



La colágena-PVP induce una regulación negativa, mas no una inhibición de algunos parámetros inflamatorios. Probablemente este efecto produzca una recuperación gradual y de mejor calidad en la sinovia permitiendo así restablecer la homeostasis tisular.

XIV. RECONOCIMIENTOS

Agradezco profundamente la donación de algunos de los especímenes utilizados en el estudio al Dr. Virgilio Hernández Cuevas y la ayuda metodológica recibida por el QA Alejandro Quintana Díaz.

XV. REFERENCIAS

- Ahrens D, Koch AE, Pope RM, Stein-Picarella M, Niedbala MJ. Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kD gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39:1576-87.
- Akahoshi T, Wada C, Endo H, Hirota K, Hosaka S, Takagishi K, Kondo H, Kashiwazaki S, Matsushima K. Expression on Monocyte Chemotactic and Activating Factor in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:762-71.
- Almazán Díaz A, de la Cruz García JC, Lira Romero JM, Arrellin G, Chimal Monroy J, Díaz de León L, Furuzawa Carballeda J, Krötzsch Gómez F: Investigación experimental de la regeneración ósea en fémures de rata después de la aplicación de colágena I polimerizada: Estudio radiológico, histológico e inmunohistoquímico. *Rev Mex Ortop Traum* 1996;10:142-52.
- Alvaro-Gracia JM. Citocinas en la Membrana Sinovial de la Artritis Reumatoide. *Rev Esp Reumatol* 1992;19:378-87.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA, Mitchell DM, Nuestadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG: The American Rheumatism Association 1987 Revised Criteria for the Classification of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
- Athanasou NA. Synovial macrophages. *Ann Rheum Dis* 1995;54:392-4.

- Barile L, Furuzawa-Carballeda J, Krötzsch-Gómez FE, Espinosa-Morales R, Alcalá M, Díaz de León L. Comparative study of collagen-polyvinylpyrrolidone vs. triamcinolone acetate in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 1998;16:370.
- Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Ann Rev Immunol* 1993;11:767-804.
- Birkedal-Hansen B. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Op Cell Biol* 1995; 7:728-35.
- Black RA, Rauch ChT, Kozlosky CJ. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 1997;385:729-33.
- Bodden MK, Windsor LJ, Caterina NM, Yermovsky A, Birkedal-Hansen B, Galazka G, Engler JA, Birkedal-Hansen H. Analysis of the TIMP-1/FIB-CL complex. En: Inhibition of matrix metalloproteinases. Therapeutic potential. Editors: Greenwald RA, Golub LM. 1994;85-95.
- Brennan FM, Browne KA, Green PA, Jaspar J-M, Maini RN, Feldmann M. Reduction of serum MMP-1 and MMP-3 in rheumatoid arthritis patients following anti-tumour necrosis factor- α (cA2) therapy. *Br J Rheumatol* 1997;36:643-50.
- Brennan FM, Chantry D, Turner M, Foxwell B, Maini R, Feldmann M. Inhibitory effect of TNF- α antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1989;2:244-7.
- Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Cytokine expression in chronic inflammatory disease. *Br Med Bulletin* 1995;51:368-84.

- Brown TJ, Laurent UBG, Fraser JRE. Turnover of hyaluronan in synovial joints. *Exp Physiol* 1991;76:125-34.
- Busiek DF, Baragi V, Nehring LC, Parks WC, Welglus HG. Matrilysin expression by human mononuclear phagocytes and its regulation by cytokines and hormones. *J Immunol* 1995;159:6484-91.
- Carsons SE, Wolf J. Interaction between synoviocytes and extracellular matrix *in vitro*. *Ann Rheum Dis* 1995;54:413-6.
- Castor CW. Abnormalities of connective tissue cells cultured from patients with rheumatoid arthritis. II: Defective regulation of hyaluronate and collagen formation. *J Lab Clin Med* 1971;77:65-75.
- Cawston TE, Curry VA, Summers CA, Clark IM, Riley GP, Life PF, Spaul JR, Goldring MV, Koshy PJT, Rowan AD, Shingleton WD. The role of oncostatin M in animal and human connective tissue collagen turnover and its localization within the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum* 1998;41:1760-9.
- Chapman PT, Haskard DO. Leukocyte adhesion molecules. *Br Med Bull* 1995; 51:296-311.
- Chen E, Keystone EC, Fish EN. Restricted cytokine expression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:901-10.
- Chimal-Monroy J, Bravo-Ruiz T, Furuzawa-Carballeda GJ, Lira RJM, De la Cruz GJC, Almazán DA, Krötzsch-Gómez FE, Arrellín RG, Díaz de León L. Collagen-PVP accelerates new bone formation of experimentally induced bone defects in rat skull and promotes the expression of osteopontin and SPARC during bone repair of rat femora fractures. *Ann NY Acad Sci* 1998;857:232-6.

- Chimal-Monroy J, Bravo-Ruiz T, Krötzsch-Gómez FE, Díaz de León L. Implantes de Fibroquel aceleran la formación de hueso nuevo en defectos óseos inducidos experimentalmente en cráneos de rata: un estudio histológico. *Rev Biomed* 1997;8:81-8.
- Chu CQ, Field M, Allard S, Abney E, Feldmann M, Maini RN. Detection of cytokines at the cartilage/pannus junction in patients with rheumatoid arthritis: Implications for the role of cytokines in cartilage destruction and repair. *Br J Rheum* 1992;31:653-61.
- Cicuttini FM, Martin M, Boyd AW. Cytokine induction of adhesion molecules on synovial type B cells. *J Rheumatol* 1994;21:406-12.
- Cooper WO, Fava RA, Gates CA, Cremer MA, Townes AS. Acceleration of onset of collagen-induced arthritis by intra-articular injection of tumour necrosis factor or transforming growth factor-beta. *Clin Exp Immunol* 1992;89:244-50.
- Cronstein BN, Weissmann B. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum* 1993;36:147-57.
- Cush J, Splawski JB, Thomass R, McFarlin JE, Schulze-Koops H, Davis LS, Fujita K, Lipsky PE. Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:96-104.
- Cutolo M, Picasso M, Ponassi M, Sun MZ, Balza E. Tenascin and fibronectin distribution in human normal and pathological synovium. *J Rheumatol* 1992;19:1439-47.
- Dahl IMS, Husby G. Hyaluronic acid production in vitro by synovial lining cells from normal and rheumatoid joints. *Ann Rheum Dis* 1985;44:647-52.

- DiBattista JA, Pelletier J-P, Zafarullah M, Fujimoto N, Obata K-I, Martel-Pelletier J. Coordinate regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in human synovial fibroblasts. *J Rheumatol* 1995;22Suppl 143:123-8.
- Dolhain RJEM, Tak PP, Dijkmans BAC, de Kuiper P, Breedveld FC, Miltenburg AMM. Methotrexate reduces inflammatory cell numbers, expression of monokines and of adhesion molecules in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1998;37:502-8.
- Easter DW, Hayt DB, Ozkan AN. Immunosuppression by a peptide from the gelatin binding domain of human fibronectin. *J Surg Res* 1988;45:370-5.
- Edwards JCW. Synovial intimal fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 1995;54:395-7.
- El-Gabalawy H, Canvin J, Gouping M, Van der Vieren M, Hoffman P, Gallatin M, Wilkins J. Synovial distribution of α d/CD18, a novel leukointegrin. *Arthritis Rheum* 1996;39:1913-21.
- Farahat N, Yanni G, Poston R, Panayi G. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1993;52:870-5.
- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann Rev Immunol* 1996;14:397-439.
- Firestein GS, Alvaro-García JM, Maki R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1990;144:3347-53.
- Firestein GS, Xu W-D, Townsend K, Broide D, Alvaro-Gracia J, Glasebrook A, Zvaifler NJ. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. I. Failure to detect T cell lymphokines (interleukin 2 and interleukin 3) and presence of macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and a novel mast cell growth factor in rheumatoid synovitis. *J Exp Med* 1988;168:1573-86.

- Furuzawa-Carballeda J, Alcocer-Varela J. IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 expression levels are higher in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis than in osteoarthritis. *Scand J Immunol* 1999(a);50:215-22.
- Furuzawa-Carballeda J, Alcocer-Varela J, Díaz de León L. Collagen-PVP decreases collagen turnover in synovial tissue cultures from rheumatoid arthritis patients. *Ann NY Acad Sci* 1999(b);878:508-602.
- Gerritsen ME, Kelley KA, Ligon G, Perry CA, Shen C-P, Szczepanski A, Carley WW. Regulation of the expression of intercellular adhesion molecule 1 in cultured human Endothelial cells derived from rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1993;36:593-602.
- Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, McGuire MKB, Russell RG. An interleukin-1 like factor stimulates bone resorption *in vitro*. *Nature* 1983;306:378-81.
- Grillet B, Dequeker J, Paemen L, Van Damme B, Opdenakker G. Gelatinase B in chronic synovitis: immunolocalization with a monoclonal antibody. *Br J Rheum* 1997;36:744-7.
- Gruber BL, Sorbi D, French DL, Marchese MJ, Nuovo GJ, Kew RR, Arbeit LA. Markedly elevated serum MMP-9 (Gelatinase B) levels in rheumatoid arthritis: a potentially useful laboratory marker. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;78:161-71.
- Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 1992;298:29-32.
- Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci* 1994;107:2372-9.

- Hembry RM, Bagga MR, Reynolds JJ, Hamblen DL. Immunolocalisation studies on six matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMP-1 and TIMP-2, in synovia from patients with osteo- and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1995;54:25-32.
- Herovici C. Polychrome stain for differentiating precollagen from collagen. *Stain Technology* 1963;38:204-5.
- Holt Y, Cooper RG, Meager A, Hopkins J. Cytokine inter-relationships and their association with disease activity in arthritis. *Br J Rheum* 1992;31:725-33.
- Hosaka S, Akahoshi T, Wada C, Kondo H. Expression of the chemokine superfamily in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 1994;97:451-7.
- Hynes RO, Lander AD. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* 1992;68:303-22.
- Iademarco MF, Barks JL, Dean DC. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 expression by IL-4 and TNF- α in cultured endothelial cells. *J Clin Invest* 1995;95:264-71.
- Ishiguro N, Ito T, Obata K-I, Fujimoto N, Iwata H. Determination of stromelysin-1, and 92 kDa type IV collagenase, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-2 in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996;23:1599-604.
- Kakimoto K, Matsukawa A, Yosinaga M, Nakamura H. Suppressive effect of a neutrophil elastase inhibitor on the development of collagen-induced arthritis. *Cell Immunol* 1995;165:26-32.
- Katsikis PD, Chu CQ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1994;179:1517-27.

- Keyszer GM, Heer AH, Gay S. Cytokines and oncogenes in cellular interactions of rheumatoid arthritis. *Stem Cells* 1994;12:75-86.
- Keyszer GM, Heer AH, Kriegsmann J, Geiler T, Trabandt A, Keyszer M, Gay RE, Gay S. Comparative analysis of cathepsin L, cathepsin D, and collagenase messenger RNA expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis, by *in situ* hybridization. *Arthritis Rheum* 1995;38:976-84.
- Kienzle G, Von Kempis J. Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106) on primary human articular chondrocytes. Functional regulation of expression by cytokines and comparison with intercellular adhesion molecule 1 (CD54) and very late activation antigen 2. *Arthritis Rheum* 1998;41:1296-305.
- Kielty CM, Whittaker SP, Grant ME, Shuttleworth CA. Type VI collagen microfibrils: evidence from a structural association with hyaluronan. *J Cell Biol* 1992;118:979-90.
- Kikuchi K, Kadono T, Furue M, Tamaki K. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) may be an autocrine growth factor in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1997;108:281-4.
- Knight AD, Levick JR. Effect of fluid pressure on the hydraulic conductance of interstitium and fenestrated endothelium in the rabbit knee. *J Physiol* 1985; 360:311-32.
- Knight AD, Levick JR, MacDonald JN. Relation between trans-synovial flow and plasma colloid osmotic pressure, with an estimation of the albumin reflection coefficient in the rabbit knee. *Quarterly J Exp Physiol* 1988; 73:47-66.
- Koolwijk P, Miltenburg AMM, Van Erck MGM, Oudshoorn M, Niedbala MJ, Breedveld FC, Van Hinsbergh VWM. Activated gelatinase-B (MMP-9) and urokinase-type plasminogen

activator in synovial fluids of patients with arthritis. Correlation with clinical and experimental variables of inflammation. *J Rheumatol* 1995;22:385-93.

- Krötzsch-Gómez FE, Furuzawa-Carballeda J, Reyes-Márquez R, Quiróz-Hernández E, Díaz de León L. Cytokine expression is downregulated by collagen-polyvinylpyrrolidone in hypertrophic scars. *J Invest Dermatol* 1998;111:828-34.
- Krötzsch-Gómez FE, Guerrero-Padilla E, Díaz de León L. Morphological studies on the effects of Fibroquel during wound of surgical wounds in rats. *J Cell Biochem* 1993;Suppl,17E:137R506.
- Labarca C, Paigen K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 1980;102:344-52.
- Lacraz SLP, Nicod B, Galve-de-Rochemonteix C, Baumberger J-MD, Welgus HG. Suppression of metalloproteinase biosynthesis in human alveolar macrophages by IL-4. *J Clin Invest* 1992;90:382-8.
- Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer J-M. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1995;96:2304-10.
- Laemmli NK. Clavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* 1970;227:680-4.
- Lambert N, Lescoulié PL, Yassine-Diab B, Enault G, Mazières B, de Préval C, Cantagrel A. Substance P enhances cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression on cultured rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Clin Exp Immunol* 1998;113:269-75.

- Larjava H, Lyons J, Salo R, Makela M, Koivisto L, Birkedal-Hansen H, Akiyama SK, Yamada KM, Heino J. Anti-integrin antibodies induce type IV collagenase gene expression in keratinocytes. *J Cell Physiol* 1993;157:190-200.
- Lark MW; Bayne EK, Flanagan J, Harper CF, Hoerrner LA, Hutchinson NI, Singer II, Donatelli SA, Weidner JR, Williams HR, Mumford RA, Lohmander S. Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *J Clin Invest* 1997;100:93-106.
- Levick JR, McDonald JN. Ultrastructure of transport pathways in stressed synovium of the knee in anaesthetized rabbits. *J Physiol* 1989; 419:493-508.
- Lindblad S, Hedfors E. The synovial membrane of healthy individuals immunohistochemical overlap with synovitis. *Clin Exp Immunol* 1987;69:41-7.
- Lindsley HB, Smith DD, Cohick CB, Koch AE, Davis LS. Proinflammatory cytokines enhance human synoviocyte expression of functional intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Clin Immunol Immunopathol* 1993;68:311-20.
- Maeda S, Sawai T, Uzuki M, Takahashi Y, Omoto H, Seki M, Sakurai M. Determination of interstitial collagenase (MMP-1) in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1995;54:970-5.
- Manicourt D-H, Fujimoto N, Obata K-I, Thonar EJ-MA. Levels of circulating collagenase, stromelysin-1, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 in patients with rheumatoid arthritis. Relationship to serum levels of antigenic keratan sulfate and systemic parameters of inflammation. *Arthritis Rheum* 1995;38:1031-9.

- Manicourt DH, Triki R, Fukuda K, Devogelaer JP, Nagant de Deuxchaisnes C, Thonar EJMA. Levels of circulating tumor necrosis factor α and interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:490-9.
- Matrisian LM. Matrix metalloproteinase gene expression. En: Inhibition of matrix metalloproteinases. Therapeutic potential. Editores: Greenwald RA, Golub LM 1994;732:42-59.
- Mera VA, Insua VS, Camaño FM, Viñuela RJ. Acción destructiva de las citocinas en el hueso y articulación. *Inflamación* 1991;93:13-9.
- Migita K, Eguchi K, Kawabe Y, Ichinose Y, Tsukada Y, Aoyagi T, Nakamura H. TNF- α -mediated expression of membrane-type matrix metalloproteinase in rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunol* 1996;89:553-7.
- Migita K, Eguchi K, Tominaga M, Origuchi T, Kawabe Y, Shigenobu N. α_2 -Microglobulin induces stromelysin production by human synovial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Comm* 1997;239:621-25.
- Miyata T, Ishiguro N, Yasuda Y, Ito T, Nangaku M, Iwata H, Kurokawa K. Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis in its relation with inflammatory markers. *Biochem Biophys Res Comm* 1998;244:45-9.
- Mulero MJ. Implicaciones de las linfocinas y monocinas en la patogenia de la artritis reumatoide. *Inflamación* 1991;93:21-8.
- Müller-Ladner U: Molecular and cellular interactions in rheumatoid synovium. *Curr Op Rheumatol* 1996,8:210-20.

- Murawaki Y, Yamada S, Koda M, Hirayama Ch. Collagenase and collagenolytic cathepsin in normal and fibrotic rat liver. *J Biochem* 1990;108:241-4.
- Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, O'Shea MO, Ward R, Atkinson S, O'Connell J, Docherty A. Regulation of matrix metalloproteinase activity. En Inhibition of matrix metalloproteinases. Therapeutic potential. Editores: Greenwald RA, Golub LM 1994;732:31-41.
- Nikkari L, Haapasalmi K, Aho H, Torvinen A, Sheppard D, Larjava H., Heino J. Localization of the α_v subfamily of integrins and their putative ligands in synovial lining cell layer. *J Rheumatol* 1995;22:16-23.
- Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi Y, Fujimoto N, Sato H, Seiki M. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: Implications for bone resorption. *Lab Invest* 1995;72:311-22.
- Okada Y, Naka K, Minamoto T, Ueda Y, Oda Y, Nakanishi I, Timpl R. Localization of type VI collagen in the lining cell layer of normal and rheumatoid synovium. *Lab Invest* 1990;63:647-56.
- Overall ChM. Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases. En: Inhibition of matrix metalloproteinases. Therapeutic potential. Editores: Greenwald RA, Golub LM 1994;732:59-64.
- Owen CA, Campbell MA, Boukedes SS, Campbell EJ. Inducible binding of bioactive cathepsin G to the cell surface of neutrophils. *J Immunol* 1995;155:5803-10.

- Paleolog EM, Hunt M, Elliott MJ, Feldmann M, Maini RN, Woody JN. Deactivation of vascular endothelium by monoclonal anti-tumor necrosis factor α antibody in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39:1082-91.
- Perkins DJ, St Clair EW, Misukonis MA, Weinberg B. Reduction of NOS2 overexpression in rheumatoid arthritis patients treated with anti-tumor necrosis factor α monoclonal antibody (cA2). *Arthritis Rheum* 1998;41:2205-10.
- Pirila L, Heino J. Altered integrin expression in rheumatoid synovial lining type B cells: *In vitro* cytokine regulation of $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, and $\alpha v\beta 5$ integrins. *J Rheumatol* 1996;23:1691-8.
- Pollock LE, Lalor P, Revell PA. Type IV collagen and laminin in the synovial intimal layer: an immunohistochemical study. *Rheum Int* 1990;9:277-80.
- Prontera C, Crescenzi G, Rotilio D. Inhibition by interleukin-4 of stromelysin expression in human skin fibroblasts: role of PKC. *Exp Cell Res* 1996;224:183-8.
- Rathanaswami P, Hachicha M, Wong WL, Schall TJ, McColl SR. Synergistic effect of interleukin- 1β and tumor necrosis factor- α on interleukin-8 gene expression in synovial fibroblasts. Evidence that interleukin-8 is the major neutrophil-activation chemokine released in response to monokine activation. *Arthritis Rheum* 1993;36:1295-304.
- Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martell-Pelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. *J Clin Invest* 1996;97:2011-9.
- Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Juoni U. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J Clin Invest* 1994;94:2489-92.

- Revell PA, Al-Saffar N, Fish S, Osei D. Extracellular matrix of the synovial intimal cell layer. *Ann Rheum Dis* 1995;54:404-7.
- Rinaldi N, Barth TFE, Weis D, Schwarz-Eywill M, Pezzutto A, Lukoschek M, Brocai D, Brado B. Loss of laminin and of the laminin receptor integrin subunit α_6 in situ correlates with cytokine induced down regulation of α_6 on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1998;57:559-65.
- Rinaldi N, Schwarz-Eywill M, Weis D, Leppelmann-Jansen P, Lukoschek M, Keilholz U, Barth TFE. Increased expression of integrins on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis *in vitro* correlates with enhanced binding to extracellular matrix proteins. *Ann Rheum Dis* 1997;56:45-51.
- Romanic AM, Madri JA. The induction of 72 kD gelatinase in T cells upon adhesion to endothelial cells is VCAM-1 dependent. *J Cell Biol* 1994;125:1165-78.
- Rügge CR, Chiquet-Ehrismann R, Alkan SS. Tenascin, an extracellular matrix protein, exerts immunomodulatory activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7437-41.
- Rükönen T, Westermarck J, Koivisto L, Broberg A, Kähäri VM, Heino. Integrin $\alpha_2\beta_1$ is a positive regulator of collagenase (MMP-1) and collagen $\alpha_1(I)$ gene expression. *J Biol Chem* 1995;270:13548-52.
- Rybski JA, Lause DB, Reese AC. Effect of fibronectin on antigen-induced lymphoproliferation and antibody synthesis in rats. *J Leuk Biol* 1989;45:35-45.
- Sack U, Kinne RW, Marx T, Hept P, Bender S, Emmrich F. Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 1993;13:45-51.

- Salmon M, Gaston JSH. The role of T-lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Br Med Bulletin* 1995;51:332-45.
- Sarkissian V, Lafyatis R. Transforming growth factor- β and platelet derived growth factor regulation of fibrillar fibronectin matrix formation by synovial fibroblasts. *J Rheumatol* 1998;25:613-22.
- Sarkissian V, Lafyatis R. Integrin engagement proliferation and collagenase expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J Immunol* 1999;162:1772-9.
- Schneider M, Voss B, Rauterberg J, Menke M, Pauly TH, Miehle RK, Friemann J, Gerlach U. Basement membrane proteins in synovial membrane: Distribution in rheumatoid arthritis and synthesis by fibroblast-like cells. *Clin Rheumatol* 1994;13:90-7.
- Seitz M, Dewald B, Gerber N, Baggiolini M. Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1991;87:463-9.
- Shingu M, Miyauchi S, Nagai Y, Yasutake C, Horie K. The role of IL-4 and IL-6 in IL-1-dependent cartilage matrix degradation. *Br J Rheumatol* 1995;34:101-6.
- Shingu M, Nagai Y, Isayama T, Naono T, Nobunaga M, Nagai Y. The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 1993;94:145-9.
- Simkin PA, Benedict RS. Iodide and albumin kinetics in normal canine wrists and knees. *Arthritis Rheum* 1990;33:73-9.
- Sklatavala J, Sarsfield SJ, Townsend Y. Purification of two immunologically different leukocyte proteins that cause cartilage resorption lymphocyte activation and fever. *J Exp Med* 1985;162:1208-15.

- Smith SC, Folefac VA, Osei DK, Revell PA. An immunocytochemical study of the distribution of proline-4-hydroxylase in normal, osteoarthritic and rheumatoid arthritic synovium at both the light and electron microscopic level. *Br J Rheum* 1998;37:287-91.
- Starkey PM, Barrett AJ, Burleigh MC. The degradation of articular collagen by neutrophil proteinases. *Biochem Biophys Acta* 1977;483:386-97.
- Stevens CR, Blake DR, Merry P, Revell PA, Levick JR. A comparative study by morphometry of the microvasculature in normal and rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1991;34:1508-13.
- Sykes B, Puddle B, Francis M, Smith R. The estimation of two collagens from human dermis by interrupted gel electrophoresis. *Biochem Biophys Res Comm* 1976;72:1472-81.
- Szekanecz Z, Haines GK, Lin TR, Harlow LA, Goerd S, Rayan G, Koch AE. Differential distribution of intercellular adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-2, and ICAM-3) and the MS-1 antigen in normal and diseased human synovia. Their possible pathogenetic and clinical significance in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:221-31.
- Tak PP, Thurkow EW, Daha MR, Kluin PM, Smeets TJM, Meinders AE, Breedveld FC. Expression of adhesion molecules in early rheumatoid synovial tissue. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;77:236-42.
- Taub DD, Oppenheim JJ. Chemokines, inflammation and the immune system. *Therapeutic Immunol* 1994;1:229-46.
- Tetlow LC, Harper N, Dunningham T, Morris MA, Bertfield H, Woolley DE. Effects of induced mast cell activation on prostaglandin E and metalloproteinase production by rheumatoid synovial tissue *in vitro*. *Ann Rheum Dis* 1998;57:25-32.

- Tetlow LC, Woolley DE. Mast cells, cytokines, and metalloproteinases at the rheumatoid lesion: dual immunolocalisation studies. *Ann Rheum Dis* 1995;54:896-903.
- Tetlow LC, Woolley DE. Comparative immunolocalization studies of collagenase 1 and collagenase 3 production in the rheumatoid lesion, and by human chondrocytes and synoviocytes *in vitro*. *Br J Rheumatol* 1998;37:64-70.
- Tomasini-Johansson BR, Milbrink J, Pejler G. Vitronectin expression in rheumatoid arthritis synovia inhibition of plasmin generation by vitronectin produced *in vitro*. *Br J Rheumatol* 1998;37:620-9.
- Tremble P, Chiquet-Ehrismann R, Werb Z. The extracellular matrix ligands fibronectin and tenascin collaborate in regulating collagenase gene expression in fibroblasts. *Mol Biol Cell* 1994;5:4390-3.
- Van De Loo AAJ, Arntz OJ, Van Den Berg WB. Flare-up of experimental arthritis in mice with murine recombinant IL-1. *Clin Exp Immunol* 1992;87:196-202.
- Wakisaka S, Suzuki N, Saito N, Ochi T, Sakane T. Possible correction of abnormal rheumatoid arthritis synovial cell function by *jun D* transfection *in vitro*. *Arthritis Rheum* 1998;41:470-81.
- Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billa M. IL-10 Inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 1994;153:811-6.
- Wang AZ, Zhang XR, Wang JC, Fisher GW, Diamond HS. Fibronectin induces protease dependent focal matrix depletion and cell overlap in cultured rheumatoid synoviocytes. *J Rheumatol* 1995;22:817-28.

- Watanabe Y, Shimamori Y, N, Yamaguchi R, Fujimoto Y, Matsuno H. Correlation between the appearance of gelatinases in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and polymorphonuclear elastase, stromelysin-1, and the tissue inhibitor of metalloproteinase-1. Clin Exp Rheumatol 1997;15:255-61.
- West-Mays JA, Strissel KJ, Sadow PM, Fini ME. Competence for collagenase gene expression by tissue fibroblasts requires activation of an interleukin 1 β autocrine loop. Proc Natl Acad Sci 1995;92:6768-72.
- Wilkinson LS, Edwards JCW. Microvascular distribution in normal human synovium. J Anat 1989;167:129-36.
- Woessner JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this iminoacid. Arch Biochem Biophys 1961;93:440-7.
- Woessner JF Jr. The family of matrix metalloproteinases. Ann NY Acad Sci 1994;732:11-21.
- Worrall JG, Bayliss MT, Edwards JCW. Zonal distribution of sulphated proteoglycans in normal and rheumatoid synovium. Br J Rheumatol 1991;29Suppl,2:34
- Yoshihara Y, Obata K-I, Fujimoto N, Yamashita K, Hayakawa T, Shimmei M. Increased levels of stromelysin-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in sera from patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1995;38:969-75.
- Youssef PP, Triantafillou S, Parker A, Coleman M, Roberts-Thomson P, Ahern MJ, Smith MD. Variability in cytokine and cell adhesion molecule staining in arthroscopic synovial biopsies: quantification using color video image analysis. J Rheumatol 1997;24:2291-8.

Investigación experimental de la regeneración ósea en fémures de rata después de la aplicación de colágena 1 polimerizada: Estudio radiológico, histológico e histoquímico

Dr. Arturo Almazán Díaz,* Dr. Juan Carlos de la Cruz García,* Dr. Juan Manuel Lira Romero,* Dr. Gerardo Arrelin,** Dr. Jesús Chimal Monroy,** Dr. Lino Díaz de León,** Dra. Jannette Furuzawa Carballeda,** Dr. Fernando Krötzh Gómez**

RESUMEN. En este trabajo estudiamos el efecto de colágena 1 polimerizada sobre la reparación de fracturas femorales en ratas por métodos radiográficos, histológicos e histoquímicos. Se realizaron fracturas diafisarias femorales en ratas. Se les inyectó intralesionalmente colágena 1 polimerizada durante los primeros tres días. Se les tomaron radiografías los días 3, 10, 16, 23 y 30 después de la última inyección (DUI) y después de los estudios radiográficos se fijaron los fémures para procedimiento histológico. Los tejidos fueron cortados a 5 micras y teñidos con hematoxilina/eosina, tricrómica de Masson y citoquímicos para la determinación de osteopontina, fibronectina, osteonectina y colágena 1. Nuestros resultados mostraron signos radiológicos de consolidación a los 16 días DUI en 12.5% con incremento a 20% hasta el término del estudio en controles. En el grupo experimental la consolidación se observó a los 23 días DUI en el 25% con incremento a 67% antes del término del estudio. El análisis histológico del grupo experimental mostró un recambio temprano de las células mesenquimatosas, por tejido cartilaginoso. El reemplazo por osteoblastos y hueso trabecular ocurrió entre los 16 y 23 días DUI. Mediante la identificación de osteopontina y osteonectina en animales tratados con colágena 1 polimerizada observamos mayor abundancia de éstos durante todo el proceso de reparación, mientras la fibronectina y colágena 1 es similar en ambos casos. Estos resultados sugieren que colágena 1 polimerizada modula factores de crecimiento en células mesenquimatosas evocando una señal sobre la migración, proliferación y diferenciación de células condrogénicas y osteoblásticas, acelerando la consolidación ósea.

Palabras clave: fémur, regeneración ósea, colágena 1.

La consolidación ósea está dada por una bien definida secuencia de cambios histomorfológicos, que ocurren alrededor del sitio de fractura. Cuando por alguna circunstancia esta secuencia de cambios se ve interrumpida, la consolidación ósea no se lleva a cabo adecuadamente desarrollándose lo que se

SUMMARY. In this work we study the effect of the polymerized collagen 1 on the repair of femoral fractures in rats using radiographic, histological and histochemical methods. Diaphysary femoral fractures were provoked in rats. The rats received polymerized collagen 1 by intralesional injection during the first three days. Radiographies were performed on days 3, 10, 16, 23 and 30 after the last injection (ALI); after the radiographical studies, the femures were prepared for histological procedures. Tissues were cut in 5 micron sections and stained with hematoxylin-eosin, Masson's trichrome, and citochemicals to discern osteopontin, fibronectin, osteonectin and collagen 1. Our findings shown radiological signs of consolidation at 16 days ALI. in 12.5%, increasing to 20% to the end of the study, in control rats. In the experiment group we found consolidation in 25% at 23 days. ALI, increasing to 67% to the end of the study. Histological study of the experiment group shown an early turnover of cartilaginous tissue, blast cells, and trabecular bone instead of mesenchymal cells between 16 and 23 days ALI. By means of indentification of osteopontin and osteonectin in animale treated with polimerized collagen 1 we saw a greater amount of these substances during the repair process, while fibronectin and collagen 1 value were similar in both groups. The results suggest that polymerized collagen 1 modulates growth factors in mesenchymal cells evoking a signal over the migration, proliferation and differentiation of chondrogenic and osteoblastic cells, fasten bone consolidation.

Key words: femur, bone consolidation, collagen 1.

conoce como falta de consolidación o pseudoartrosis.

Buscando la solución a este problema se han tratado de desarrollar sustancias con poder osteoinductivo, tales como las proteínas morfogenéticas óseas (BMP's), los aspirados de células osteoprogenitoras de médula ósea o sustancias osteoconductoras como las cerámicas, los fosfatos tricálcicos de hidroxapatita, cuyo resultado sobre la respuesta osteogénica ha sido variable.

La colágena tipo I es la mayor proteína de la matriz extracelular (MEC) ósea, comprende un 90% de ésta y juega un papel importante en la reparación ósea. ¿Es posible utilizar una mezcla de colágena tipo I-polivinilpirrolidona en-

* Médicos residentes del cuarto año de la especialidad de Traumatología y Ortopedia, Hospital de Traumatología y Ortopedia "Lomas Verdes", IMSS.

** Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

tre cruzada por radiación gamma como un nuevo biomaterial capaz de modificar la respuesta osteogénica, favorecer la consolidación ósea adecuada y tener las bases para su aplicación terapéutica?

Una de las complicaciones más graves en la evolución natural de la reparación ósea es la pseudoartrosis. Diversas sustancias se han tratado de utilizar para la solución de esta complicación, algunas con propiedades osteoinductivas u osteoconductoras. Los resultados reportados en la literatura han sido variados ya sea por las características del biomaterial utilizado, por la técnica o por vía de administración.

Es por ello que pretendemos evaluar el uso de colágena I polimerizada sobre la consolidación ósea al ser aplicada intralesionalmente (inyectada) en una fractura creada en el fémur de una rata adulta y dado que es una sustancia biológicamente activa, modificar la respuesta osteogénica.

Nuestra hipótesis consiste en que la mezcla de colágena tipo I y polivinilpirrolidona es un material biológico que actúa como una matriz extracelular en la regeneración ósea, que aplicada localmente en el sitio de la fractura podría modificar favorablemente la respuesta osteogénica.

La hipótesis de nulidad indicaría que, la mezcla de colágena tipo I y polivinilpirrolidona es un material biológico que no influye en la respuesta de regeneración ósea al ser aplicado en el sitio de la fractura.

El objetivo general de este estudio es evaluar a través de un análisis radiográfico, histológico e histoquímico la consolidación ósea en fractura del fémur de ratas, inyectadas intralesionalmente con colágena I polimerizada.

Los objetivos específicos son: conocer las características radiográficas de la consolidación del tejido finalmente formado, conocer las características histológicas de la consolidación del tejido finalmente formado, conocer las características histoquímicas de la consolidación del tejido finalmente formado y comparar los resultados del grupo control con el grupo testigo.

Antecedentes científicos. El hueso es un tejido de alta capacidad de autorrenovación, la formación ósea puede ocurrir de dos formas: la primera es directamente a través de las células mesenquimáticas, como en el caso de los huesos del cráneo, lo que se conoce como osificación intramembranosa y segundo por intervención de un estadio cartilaginoso que precede a la formación ósea, este es el caso de la mayoría de los huesos, este proceso es conocido como osificación endocondral. Los huesos largos durante el desarrollo embrionario se forman por este último proceso, el que inicia con la formación de un primordio cartilaginoso que se calcifica y es sustituido por hueso y médula ósea.³ La capacidad de regeneración del hueso es un fenómeno importante que facilita la reparación cuando ocurre la fractura del hueso. La reparación de la fractura implica una cascada de respuestas tisulares que están diseñadas para efectuar la eliminación del tejido muerto y el restablecimiento de la vascularización para producir una MEC apropiada para el establecimiento del tejido esquelético. Un fractura ocurre cuando se sobrepasan los límites de resistencia del hueso, lo que inicia una

secuencia de respuestas tisulares sistémicas y específicas las cuales concluyen con la competencia biomecánica del tejido finalmente formado.²⁰ Simmons establece que la reparación de las fracturas ocurre a través de una serie de transiciones celulares: fibrogénesis-condrogénesis-osteogénesis y mineralización, mediante una secuencia que incluye una etapa de reacción inflamatoria del día 0 al 5 postfractura; la etapa de formación del callo del día 4 al 40 postfractura y la fase de remodelación del día 23 al 50 postfractura.²⁷

La formación ósea es un proceso completo regulado por hormonas y factores de crecimiento, los efectos de estas hormonas y factores han sido extensamente revisados. La primera etapa de la consolidación ósea que corresponde a la etapa inflamatoria incluye la fase de hematoma y es de vital importancia para el inicio de la reparación ósea como lo demostró Grundres.¹⁰ Durante esta etapa se observa la presencia de 2 factores de crecimiento. El factor de crecimiento derivado de macrófagos (MDGF), que es mitogénico para los osteoblastos y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), que es un mitogénico para los fibroblastos. El factor de crecimiento ácido de los fibroblastos (aFGF) es un potente estimulador de la división celular de fibroblastos y células con características condro y osteoprogenitoras, este factor está presente en la etapa de duplicación fibroblástica y de células condroprogenitoras. En la etapa de condrogénesis la producción de una matriz cartilaginosa está dada por el factor de crecimiento relacionado con insulina (IGF-I) y por último el factor de crecimiento tumoral beta (TGF-beta) es un potente estimulador de la división celular y productor de MEC.²

La colágena es el mayor constituyente de la MEC, algunos de sus fragmentos son quimiotácticos para poblaciones celulares normales y neoplásicas y tienen una actividad mitogénica directa en cultivos de osteoblastos, lo que sugiere que la colágena y algunos de sus fragmentos juegan un papel importante en la formación ósea.^{21,23} La matriz ósea contiene un número importante de otras glicoproteínas no colágenicas como la osteopontina (OPN), osteonectina (ON), y proteína GLA del hueso. La OPN es sintetizada por una variedad de diferentes células y se estimula su síntesis durante la resolución así como durante la formación ósea. La expresión de ON está esencialmente relacionada con la mineralización ósea y la proteína GLA es sintetizada y depositada en la mineralización del tejido conectivo.^{4,13,26} La osteopontina está localizada específicamente en la MEC y se desarrolla en la osificación endocondral e intramembranosa. La fibronectina es sintetizada durante la formación y mineralización ósea y está presente alrededor de los osteoblastos durante la osteogénesis.

El desarrollo de varios biomateriales ha sido de gran ayuda para tratar de modificar la respuesta osteogénica en los casos de pseudoartrosis o defectos óseos. La primera descripción se debe a Urist quien demostró que la implantación de matrices óseas desmineralizadas en sitios ectópicos era capaz de producir hueso nuevo,²⁹ estableciendo como osteoinducción la diferenciación de células osteogénicas y el comienzo

de la producción de hueso nuevo y osteoconducción como la sustitución progresiva y crecimiento de hueso nuevo dentro de una estructura que sirva como matriz.⁹

El aislamiento e identificación de los componentes de la matriz ósea con potencial osteoinductivo ha dado lugar al conocimiento de las proteínas morfogenéticas óseas, que al ser implantadas en sitios ectópicos inducen la formación de hueso. La capacidad de inducción de hueso y cartílago en sitios ectópicos por BMP ha sugerido su aplicación terapéutica en la consolidación ósea.^{24,25} Otras alternativas terapéuticas han sido desarrolladas a partir de materiales bioactivos como el caso de matrices óseas desmineralizadas con resultados alentadores.^{6,11,12} Otro biomaterial que comúnmente ha sido utilizado es la hidroxiapatita, esta cerámica se ha empleado como material de implantación en defectos óseos, sin embargo debido a la diferencia con las apatitas desarrolladas en el hueso su uso ha estado limitado.¹⁷ Otra hidroxiapatita obtenida de corales marinos denominada coralina ha demostrado poseer propiedades osteoconductoras y su uso terapéutico ha demostrado resultados alentadores en el tratamiento de defectos óseos y retardos de consolidación.¹⁴⁻¹⁶ Algunos otros biomateriales se han desarrollado a partir de sustancias bioactivas como la colágena y han demostrado su importancia en la consolidación ósea y su utilidad terapéutica tanto en animales como en humanos en el tratamiento de defectos óseos, es el rellenado de cavidades óseas y en ciertos casos de pseudoartrosis.^{1,7,18,28,30} Algunas otras alternativas de sustancias osteoinductivas aplicadas a solucionar los problemas de las alteraciones en la reparación ósea ha sido el uso de injertos de material aspirado de médula ósea aplicado percutáneamente en el sitio de la fractura; al inyectar las células osteoprogenitoras se ha observado que la reparación ósea es acelerada.²²

Recientemente Constanz y col. (1994) han obtenido un biomaterial de aplicación percutánea compuesto por una combinación de fosfatos y calcio inorgánico y una solución de fosfato de sodio el cual es preparado en pasta e inyectado en el sitio de las fracturas, este material solidifica en pocas horas y posee las mismas características biomecánicas del hueso, además de que favorece el crecimiento celular y el reemplazamiento por hueso nuevo.⁵

En México se ha desarrollado a través de la división FARMA de los Laboratorios ASPID un producto a base de colágena y polivinilpirrolidona llamado Fibroquel^{MR} que tiene propiedades de favorecer la regeneración ósea. Este material tiene un efecto diferente en la reparación ósea que la colágena sola (manuscrito sometido a publicación Chimal y ed.).

Material y métodos

Diseño metodológico

Se trata de una investigación básica observacional, longitudinal, comparativa, que se desarrolló en el laboratorio de tejido conectivo del Instituto de Investigación Biomédica de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Como universo de trabajo se utilizaron 24 ratas adultas Wistar de 200 gramos de peso sin patología demostrable.

Las variables que se estudiaron fueron: fractura, consolidación ósea, Fibroquel^{MR}, osteoinducción y osteoconducción.

Definición operacional de las variables: Fractura. Pérdida de la continuidad del tejido óseo debido a la aplicación de una fuerza que sobrepasa los límites elásticos del hueso.

Consolidación ósea. Cascada de procesos sistémicos y locales encargados de reparar la lesión del tejido óseo.

Fibroquel^{MR}. Mezcla de colágena tipo I de piel porcina extraída y purificada a partir de cerdos jóvenes, con un polímero inerte como lo es la polivinilpirrolidona (PVP), la mezcla colágena-PVP es esterilizada con irradiación gamma a partir de una bomba de cobalto 60 que produce el entrecruzamiento de la colágena misma y la producción de enlaces covalentes entre la proteína y el polímero.

Osteoinducción. Formación de hueso dentro de un implante o en las cercanías de éste.

Osteoconducción. Propiedad del tejido óseo de crecer dentro de una estructura que sirva como matriz cuando ésta se coloca dentro o cerca del hueso.

Fuente de obtención de la colágena tipo I polimerizada. Fue proporcionado por los Laboratorios ASPID, S.A. de C.V. en su División FARMA, que tiene la patente, investigación y desarrollo de Fibroquel^{MR}.

Descripción del procedimiento. A un total de 24 ratas adultas Wistar de 200 gramos de peso sin patología previa demostrable se les produjo una fractura en el fémur derecho mediante la siguiente técnica quirúrgica: bajo anestesia con Ketamina a dosis de 80 mg/kg/dosis intraperitoneal se procedió a realizar rasurado del muslo derecho y previa antisepsia del mismo con Timerosal al 0.1% se realizó incisión longitudinal lateral de aprox. 2 cm; se abordó a través de tabique intermuscular externo hasta el fémur y se disecó el mismo en su porción diafisaria; con minisierra se realizó osteotomía transversal y en forma retrógrada se procedió a la fijación de la fractura con un clavillo de Kirschner rosca-do de 1 mm, suturándose en un solo plano con nylon 000.

A 12 ratas se les administró 0.2 mL de Fibroquel^{MR} intralesional a los 0, 1 y 2 días postfractura. Otras 12 se mantuvieron como grupo control. A todos los animales se les realizaron radiografías en vistas AP y lateral a los 3, 10, 16, 23 y 30 días postfractura, sacrificándose una muestra pareada después de la toma de radiografías en cada ocasión.

Fueron extraídos los fémures y se fijaron en formalina neutra al 10% (2-3 días) con solución de Bouin (2 días) y sometidos a descalcificación en ácido acético (10%), NaCl (0.85%) y formalina (10%) en agitación durante 5 días. Se procesaron para su inclusión en parafina.

Se realizaron cortes de 4-6 micras y se colocaron sobre portaobjetos recubiertos de silano, se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena al incubar los tejidos con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos, después se lavaron con PBS 0.01 M, pH 7.2 para detener la reacción. Los sitios del pegado inespecífico fueron bloquea-

dos con albúmina de huevo al 1% (Sigma) durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo primario, una inmunoglobulina policlonal preparada en conejo, de clase IgG antifibronectina diluida 1:50 (Chemicon), o una inmunoglobulina antiosteopontina (LF87 donadas por Larry Fischer, NIH, Bethesda USA) diluidas 1:200. Posteriormente las laminillas se sometieron a 3 lavados de 3 minutos cada uno con PBS 0.01 M, pH 7.2 y en agitación suave.

Como anticuerpo secundario se empleó una IgG antiinmunoglobulina de conejo preparada en chivo, conjugada con biotina (Sigma) diluida 1:20 en PBS-albúmina. los tejidos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Las laminillas se lavaron 3 veces durante 3 minutos cada una con PBS y agitación suave. A continuación se empleó estreptavidina-peroxidasa diluida 1:20 en PBS-albúmina (Sigma), con el que se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las laminillas se lavaron nuevamente y la reacción se visualizó incubando los tejidos durante 10 minutos, con una solución de 3,3'-tetrahidrocloreuro de diaminobencidina que produce un precipitado color sepia en las regiones inmunorreactivas.

Para detener la reacción, las laminillas se sumergieron en agua destilada, se contratiñeron con hematoxilina de Harris durante 10 minutos, se viraron con una solución de carbonato de litio y finalmente se montaron con bálsamo de Canadá. Durante el ensayo se corrieron un control negativo en el

que se sustituyó el primer anticuerpo por uno no relacionado (suero normal de humano diluido 1:100) y un blanco de reactivos en el que se reemplazó el anticuerpo primario por albúmina de huevo al 1% en PBS 0.01 M, pH 7.2. Las laminillas se observaron en microscopio con lente de 20x.

Se evaluaron las radiografías AP y lateral por un observador imparcial al estudio bajo la siguiente clasificación:

- I. Sin signos radiográficos de consolidación.
- II. Reacción perióstica.
- III. Callo externo, se observa línea de fractura y las trabéculas no cruzan la fractura.
- IV. Callo externo, no se observa la línea de fractura y las trabéculas cruzan la fractura.³⁰

Resultados

Resultados radiográficos. El grupo control mostró signos radiográficos de consolidación grado IV a los 16 días de la última inyección en 12.5% con un incremento a 20% al término del estudio.

El grupo experimental mostró consolidación grado IV a los 23 días de la última inyección en 25% con un incremento a 66.7% al término del estudio (Figura 1).

Los resultados radiográficos se muestran en los cuadros 1 a 5.

Resultados histológicos e histoquímicos. Fueron identificados tres distintos estadios en la reparación de la fractura

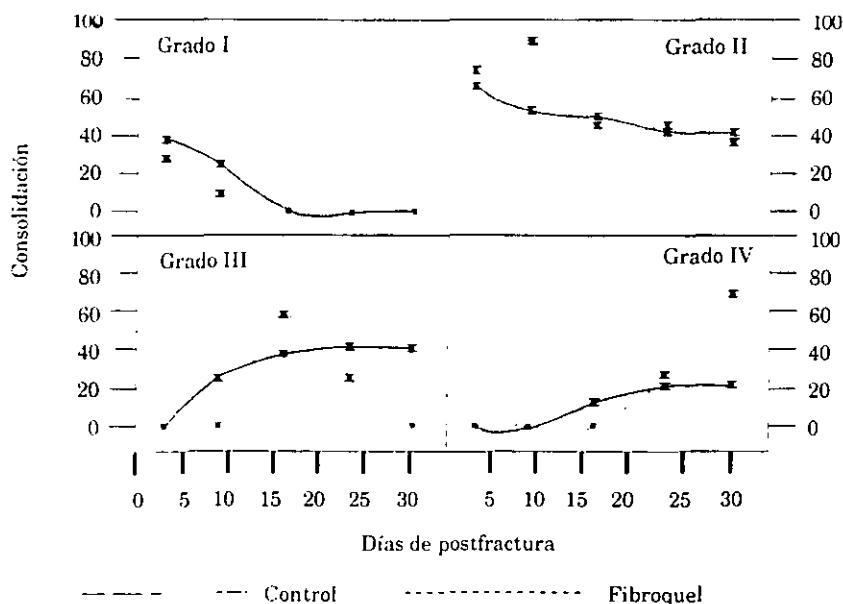


Figura 1. Porcentaje comparativo de consolidación en fracturas experimentales del fémur de rata tratadas y no tratadas con Fibroquel^{MR}

Cuadro 1. Grado de consolidación ósea a los 3 días postfractura

	Controles	Colágena 1 polimerizada
Grado I	37.5%	Grado I 28.6%
II	62.5%	II 71.4%
III	0.0%	III 0.0%
IV	0.0%	IV 0.0%

Cuadro 2. Grado de consolidación a los 10 días postfractura

	Controles	Colágena 1 polimerizada
Grado I	28.6%	Grado I 14.3%
II	42.8%	II 85.7%
III	28.6%	III 0.0%
IV	0.0%	IV 0.0%

Cuadro 3. Grado de consolidación ósea a los 16 días postfractura

Controles		Colágena 1 polimerizada	
Grado I	0.0%	Grado I	0.0%
II	50.0%	II	42.9%
III	37.5%	III	57.1%
IV	12.5%	IV	0.0%

Cuadro 4. Grado de consolidación ósea a los 23 días postfractura

Controles		Colágena 1 polimerizada	
Grado I	0.0%	Grado I	0.0%
II	80.0%	II	50.0%
III	0.0%	III	25.0%
IV	20.0%	IV	25.0%

Cuadro 5. Grado de consolidación ósea a los 30 días postfractura

Controles		Colágena 1 polimerizada	
Grado I	0.0%	Grado I	0.0%
II	40.0%	II	33.0%
III	40.0%	III	0.0%
IV	20.0%	IV	66.7%

en este estudio. En el primer estadio la presencia de células mesenquimáticas es muy evidente. En el segundo la presencia de tejido condrogénico sustituye el tejido fibroso. En el tercer estadio el tejido condrogénico es sustituido por tejido óseo. Los resultados nos muestran que el tratamiento con colágena 1 polimerizada promueve una aceleración en la consolidación ósea.

Esto es, el reemplazamiento de tejido fibroso (*Figuras A1 y A2*) por condrogénico se inicia de manera más temprana. En los animales no tratados el cartílago se observó al día 10 postfractura (*Figura A3*), mientras que en los animales inyectados con colágena 1 polimerizada el cartílago se evidencia al 7o. día postfractura (*Figura A4*). El reemplazamiento de tejido condrogénico por tejido óseo ocurre en los animales no tratados, al día 23 (*Figura A5*) y en los animales tratados al día 16 postfractura (*Figura A6*). Sin embargo al final en ambos casos se obtiene el mismo resultado con la formación de hueso (*Figuras A7 y A8*).

Para determinar de qué manera la colágena 1 polimerizada promueve la osificación, evaluamos la presencia de osteopontina y osteonectina durante los estadios de la reparación de la fractura. Los resultados nos muestran que al día 3 postfractura existen mayor número de células inmunorreactivas en los tejidos de animales tratados que en los no tratados (*Figuras B1 y B2 OPN*) (*Figuras C1 y C2 OCN*).

De igual manera se observó durante todo el estudio que la osteopontina y la osteonectina son más abundantes en los animales tratados con colágena 1 polimerizada en las etapas de cartílago (*Figuras B3 y B4 OPN*), (*Figuras C3 y C4 OCN*), formación de trabéculas óseas (*Figuras B5 y B6*

OPN) y en el hueso completamente formado (*Figuras B7 y B8 OPN*) (*Figuras C5 y C6 OCN*). Asimismo, la fibronectina es una molécula de la MEC necesaria para la migración de los osteoblastos, por lo que evaluamos la presencia de esta proteína durante la reparación de la fractura. Los resultados nos muestran que esta proteína se expresa de igual manera en ambas condiciones, tanto en tejido fibroso (*Figuras D1 y D2*), tejido condrogénico (*Figuras D3 y D4*) y en la formación de las trabéculas óseas (*Figuras D5 y D6*). La colágena 1, se expresó de igual forma en el grupo control y en el experimental en los tres estadios estudiados (*Figuras E1 y E2*) (*Figuras E3 y E4*).

Diseño estadístico. Se realizó prueba t de student con significancia de 0.05.

Discusión

En este estudio hemos demostrado que la consolidación ósea en el fémur de ratas, que se obtiene después de una fractura, se acelera por la inyección de colágena 1 polimerizada. Durante esta reparación se llevan a cabo una serie de procesos que resultan en la formación de hueso nuevo. Los resultados radiográficos sugieren que la aplicación de colágena 1 polimerizada durante los 3 primeros días de iniciada la fractura, es capaz de acelerar la consolidación ósea, esto es, en un 66.7% de la población tratada con colágena 1 polimerizada *versus* un 20% en los animales no tratados al final del estudio. Estos estudios radiológicos correlacionan de manera importante con los análisis histológicos e inmunohistoquímicos. La consolidación de las fracturas con colágena 1 polimerizada se acelera, con respecto a las fracturas no tratadas, en el reemplazamiento del callo fibroso por callo condrogénico y el reemplazamiento del callo condrogénico por callo óseo, que culmina en la formación de hueso. Para comprobar a qué nivel está actuando la colágena 1 polimerizada evaluamos la expresión de la osteopontina, fibronectina, osteonectina y colágena 1 durante el proceso de reparación. Se sabe que la osteopontina es una proteína que se expresa y sintetiza por los osteoblastos y se deposita en la matriz ósea, participando en la mineralización de la matriz extracelular. Además de los osteoblastos, también se expresa en osteocitos, osteoclastos y condrocitos hipertróficos. Por otro lado, durante la formación del hueso la fibronectina se expresa en aquellos sitios donde ocurre la migración de los osteoblastos. Por lo tanto, los resultados son consistentes con el concepto del papel multifuncional de la osteopontina en el desarrollo del hueso y en la remodelación del mismo.

La alta expresión de la osteopontina y osteonectina en las fracturas tratadas con colágena 1 polimerizada podría indicar que a ese nivel es donde ocurre la aceleración de la consolidación ósea. De manera similar a lo obtenido con osteopontina hemos observado que la osteonectina incrementa su expresión en respuesta al tratamiento con colágena 1 polimerizada. Esta proteína se expresa en osteoblastos, en células de médula ósea y condrocitos hipertróficos. Su función está asociada con la unión a la colágena tipo I, al calcio y a

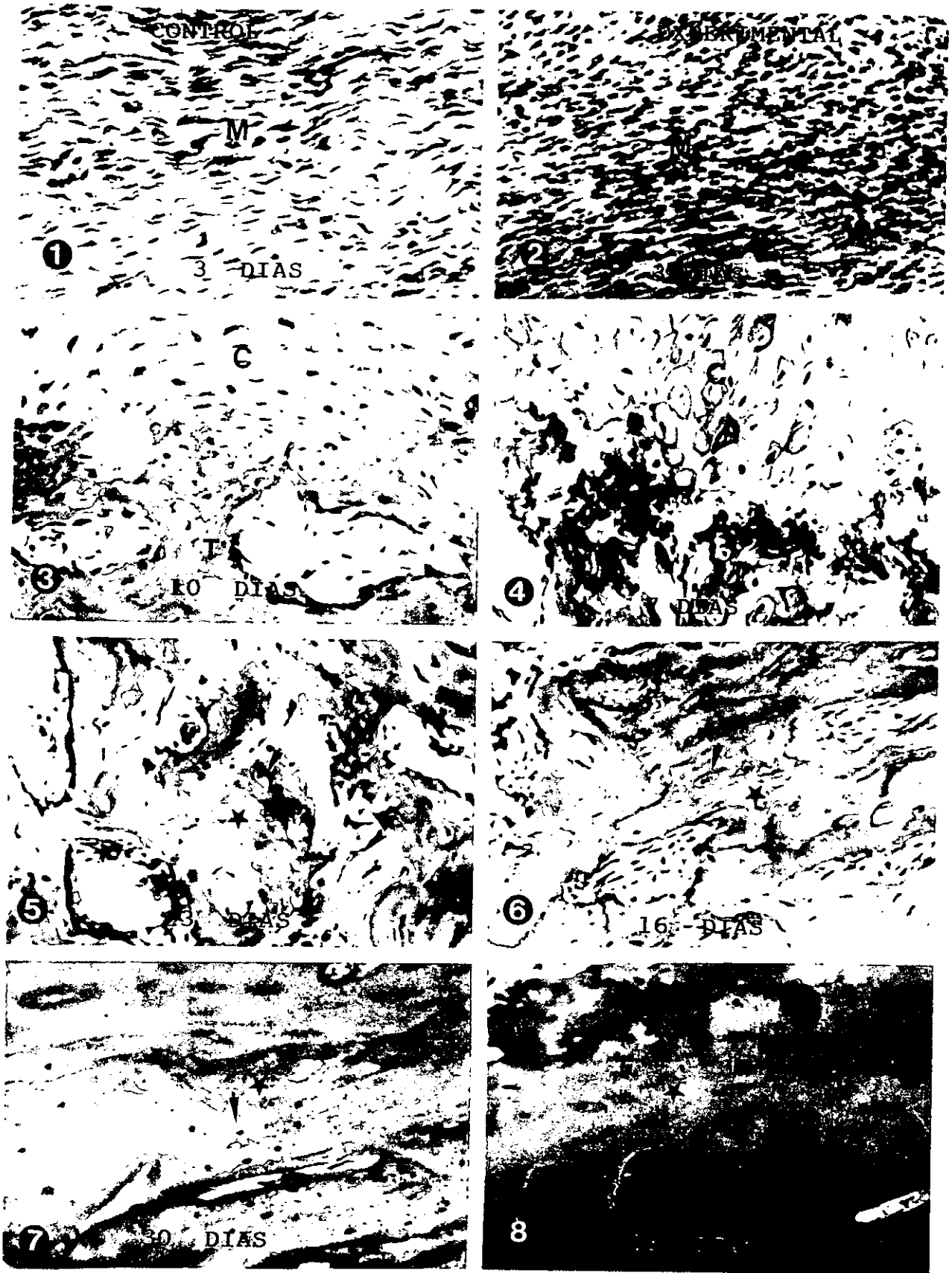


Figura A: M - Células mesenquimáticas
 C - Condrocitos hipertrofos

↑ = Osteoblastos/osteocitos
 ★ = Matriz extracelular

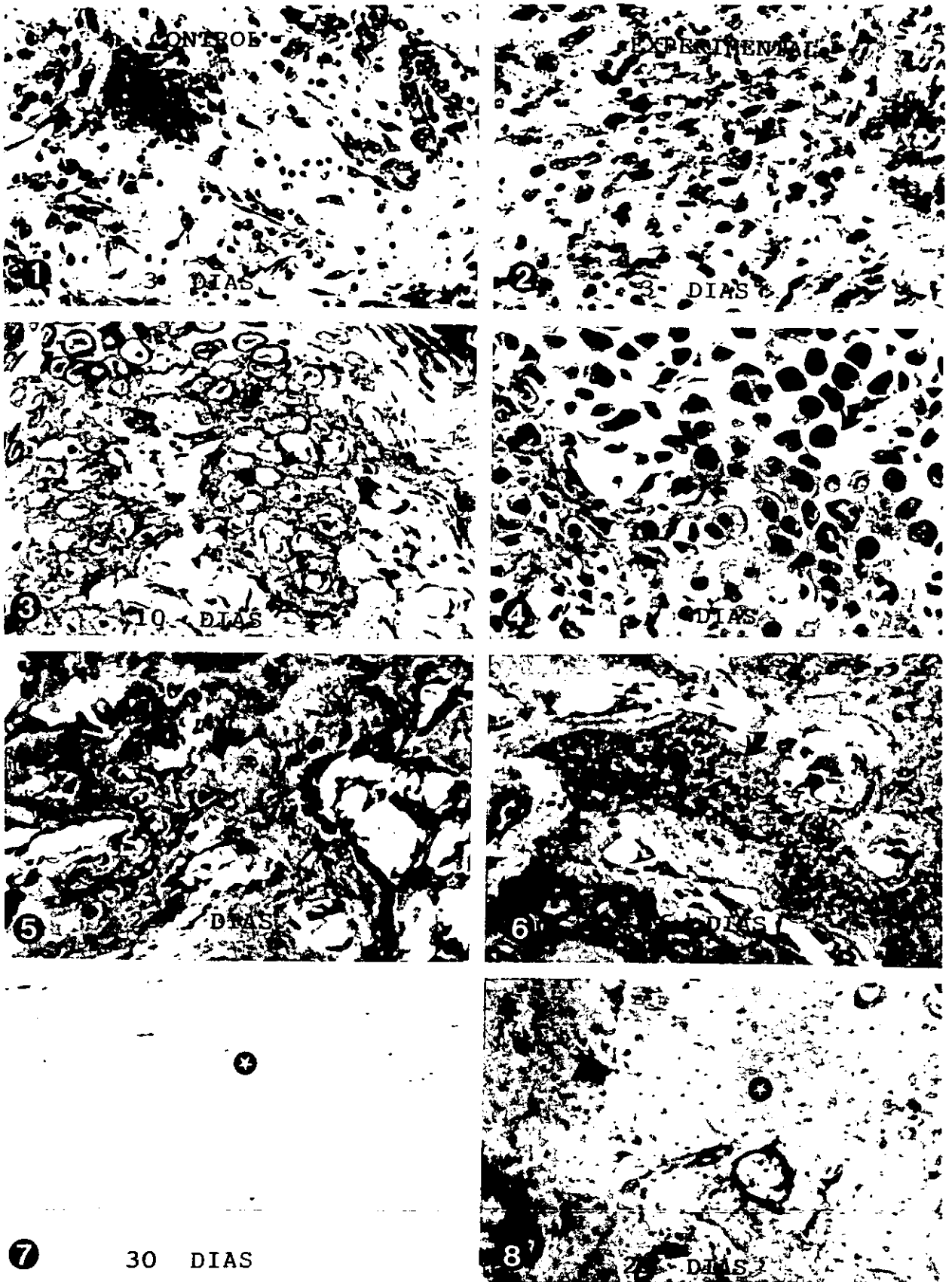


Figura B: ● = Osteopontina
↑ = Matriz extracelular mineralizada

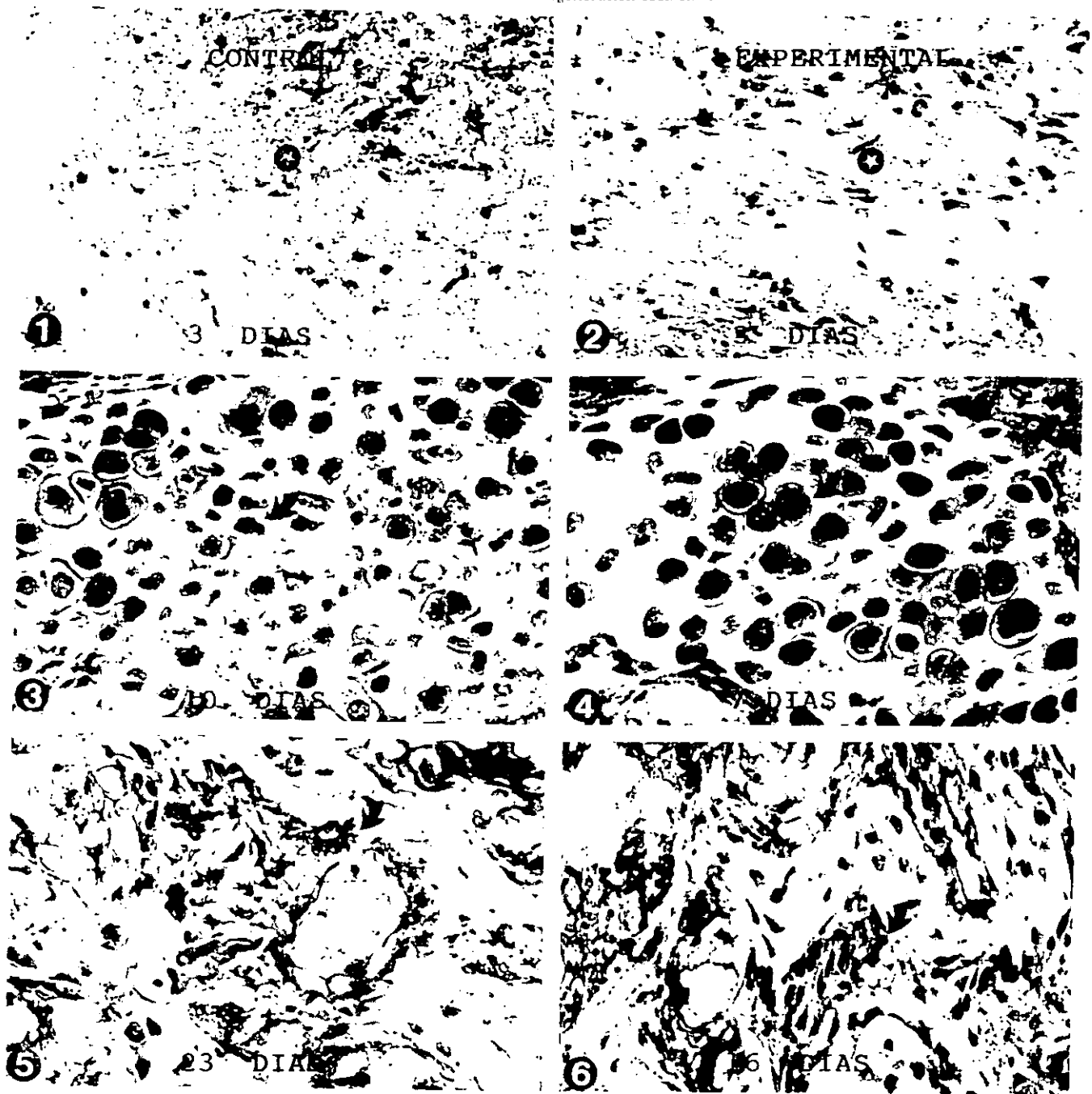


Figura C: ● = Células mesenquimáticas
 ↑ = Fibronectina

la hidroxiapatita sugiriendo un papel muy importante en la mineralización de la matriz ósea. Finalmente, la expresión de la fibronectina y la colágena tipo 1 no se ve alterada por el tratamiento con colágena 1 polimerizada lo que sugiere que éste actúa a nivel de células óseas promoviendo la expresión de moléculas (osteopontina y osteonectina) que participan en la formación, remodelación y mineralización de hueso.

En este estudio consideramos a Fibroquel^{MR} como un biomaterial con actividad de osteoconducción, esto es, un

biomaterial que permite el establecimiento de una biomatriz adecuada para la migración e invasión de células osteoprogenitoras. El Fibroquel^{MR} (colágena tipo 1 y polivinilpirrolidona), probablemente favorece la migración de células inmunorreactivas a la osteopontina y a la osteonectina acelerando el proceso de reparación ósea. Es importante notar que el Fibroquel^{MR} está compuesto de colágena, la cual probablemente cambie sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, durante el proceso de esterilización por irradiación gamma. Este tratamiento puede provocar un entrecruza-

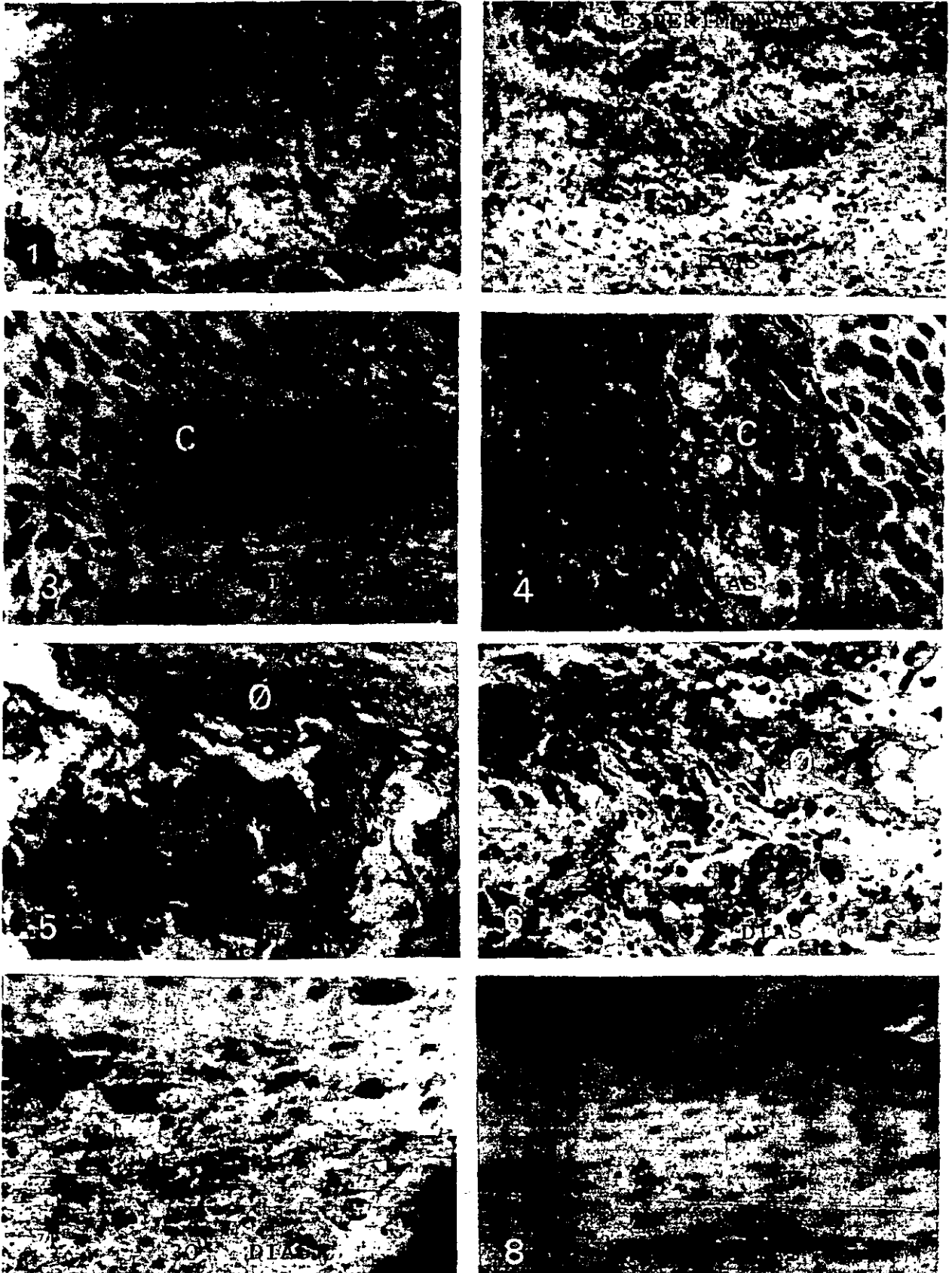


Figura D: M = Células mesenquimáticas
OT = Osteonectina
C = Condrocitos hipertroáficos

★ = Matriz extracelular
Ø = Osteocitos

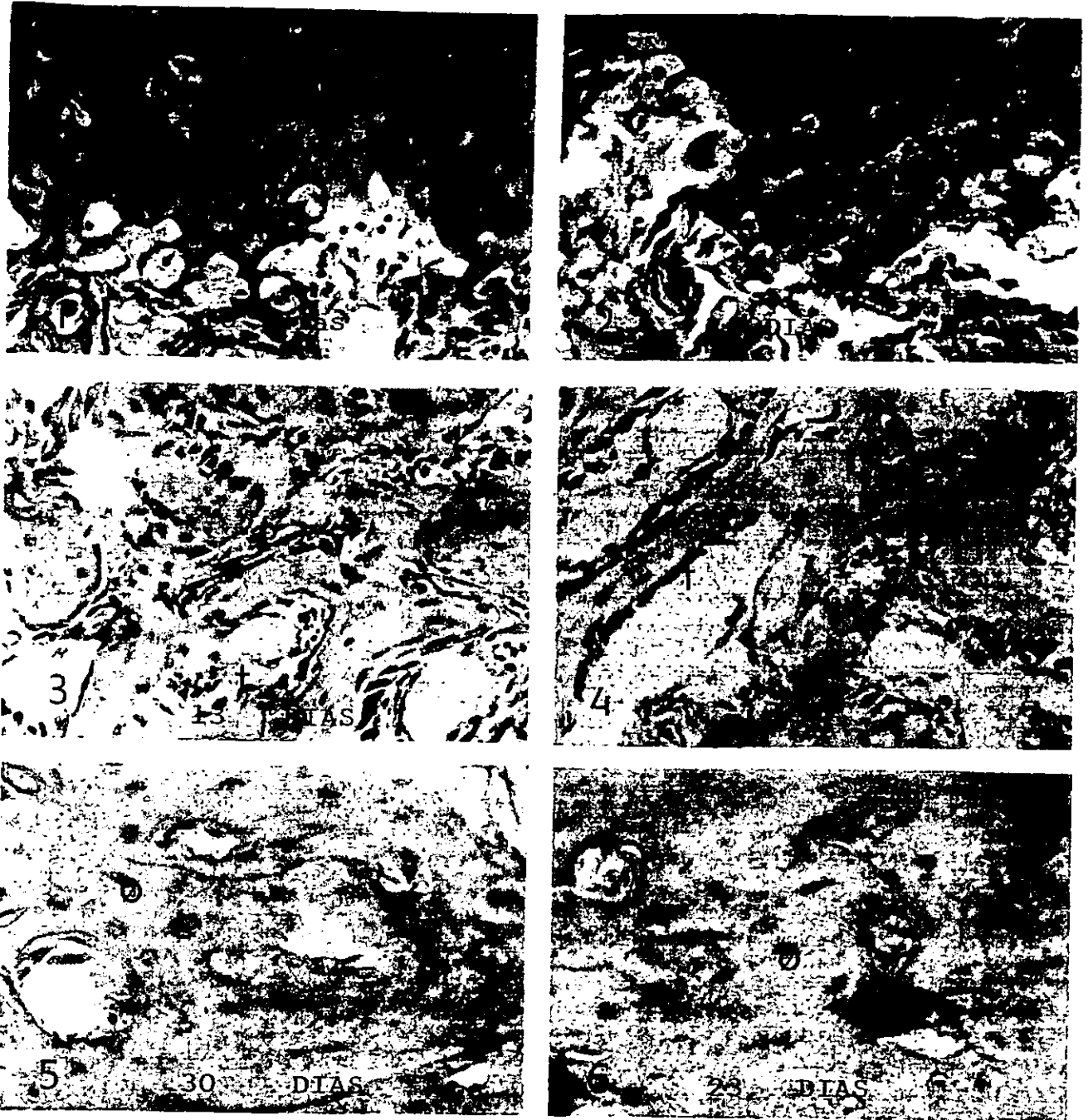


Figura E: C = Condrocitos hipertroficós

† = Osteoblastos

• = Osteocitos

miento entre la colágena y la polivinilpirrolidona. Sin embargo, aunque no tenemos evidencia alguna de dicho entrecruzamiento, hemos observado que algunas de las propiedades fisicoquímicas de la colágena, tales como la formación de geles a 37 °C, se pierde con la mezcla con polivinilpirrolidona. Asimismo, también las propiedades biológicas de la colágena cambian, como se ha observado en la regeneración de defectos óseos en cráneo, que se acelera con esponjas de Fibroquel,^{MR} con respecto a la colágena sola. Por lo tanto, el posible entrecruzamiento entre la colágena y la polivinilpi-

rrolidona podría formar una biomatriz que permita una mayor capacidad de migración e invasividad de células osteoprogenitoras hacia la zona de fractura.

Conclusiones

La colágena I polimerizada acelera la consolidación ósea.

La colágena I polimerizada acelera el reemplazo de tejido fibroso por tejido condrogénico y de tejido condrogénico por tejido óseo.

La colágena I polimerizada incrementa la expresión de osteopontina y osteonectina en todas las fases de la reparación de las fracturas.

La colágena I polimerizada no tiene efecto en la expresión de fibronectina y colágena I en ninguna de las fases de la reparación de las fracturas.

La alta expresión de OPN en las fracturas tratadas con colágena I polimerizada podría indicar que es a este nivel donde ocurre la aceleración de la consolidación ósea.

Consideramos a Fibroquel^{MR} como un biomaterial con actividad osteoconductiva que permite el establecimiento de una biomatriz adecuada para la invasión de células osteoprogenitoras.

Esto abre una línea de investigación que es necesario desarrollar a fondo para determinar las posibilidades de aplicación clínica de colágena I polimerizada.

Bibliografía

1. Ametany K, Stol M. Implantation of (HEMA)-collagen composite in to bone. *Biomaterials* 1992;13(9):639-642.
2. Bounque W. Expression of four growth factors during fracture repair. *Int J Dev Biol* 1993;37:573-579.
3. Carrington JL, Reddi H. Parallels between development of embryonic and matrix induced endochondral bone. *Bioessays* 1991;13:403-408.
4. Chen J, Singh K. Developmental expression of osteopontin (OPN) mRNA in rat tissues: evidence for a role for OPN in bone and resorption. *Matrix* 1993;13:113-123.
5. Constantz B, Inson I. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase bone. *Science* 1967;24(24):1796-1799.
6. Einhorn T, Lane J. The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. *J Bone Joint Surg* 1984;66A(2):274-279.
7. Fabinger A, Krekeler G. Application possibilities of collagen for the treatment of periodontal bone pockets. *Dtsch Zahnarzt ZF (German Odontologic Journal)* 1980;35:139-141.
8. Gebron P. The biochemistry of bone. *Metabolic bone disease. Pat Endoc and Metabolic No. 1*, 1989;18(4):859-901.
9. González R, Guerra J. Materiales bioactivos para implantes óseos, características y aplicaciones. *Centro Nacional de Investigaciones Científicas* 1993;8.
10. Grundes O. The importance of hematoma for fracture healing in rats. *Act Orthop Scan* 1993;64:340-342.
11. Gupta D, Tull M. Osteoconductive of partially decalcified alloimplants in healing of large osteoperioosteal defects. *Acta Orthop Scan* 1982;64:857-865.
12. Harakas N. Demineralized bone-matrix induced osteogenesis. *Clin Orthop* 1984;188:239-251.
13. Helder MA, Antonius L. Dissimilar expression patterns for the extracellular matrix proteins osteopontin (OPN) and collagen type I in dental tissue and alveolar bone of neonatal rat. *Matrix* 1993;13:415-425.
14. Henner J, Bartl R. Bone formation in coralline hydroxiapatite. *Act Orthop Scan* 1994;65(3):246-252.
15. Holmes RE. Bone regeneration within a coralline hydroxiapatite implant. *Plas Recont Surg* 1979;63:626.
16. Holmes R, Moore V. Acoralline hidroxiapatite bone graft substitute. *Clin Orthop* 1984;188:252-262.
17. Hoogendoorn HA. Long-term study of large ceramic implants (porous-hydroxiapatite) in dog femoral. *Clin Orthop* 1984;187:281.
18. Joos Vogel D. Collagen fleece asa biomaterial for mandibular defects in basting. G.W. Williams SD. *Feds proprieties of biomaterial*. John Wiley and Son Ltd. 1980:515.
19. Meller Y, Kesterbaum RS, Mozes M, Mozes G, Yaguil R, Shany S. Mineral and endocrine metabolism during fracture healing in dogs. *Clin Orthop* 1984;187:289-95.
20. Müller ME, Allgower M. *Manual of internal fixation*. Berlin Springer Verlag. 3ra Ed. 1990:66:70.
21. Mundy GR, De Marino S. Collagen and collagen derived fragment are chemotactic for tumours cells. *J Clin Inv* 1981;68:1102.
22. Paley D, Cristine M. Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bony defects. *Clin Orthop* 1986;208:300-312.
23. Rath NC, Reddi A. Collagenous bone matrix is a local mitogen. *Nature* 1979;278:885.
24. Reddi AH. Regulation of cartilage and bone of differentiation by morphogenetic protein current opinion in cell. *Biology* 1992;4:850-855.
25. Ripamonti R. Initiation of bone regeneration in adult baboons by osteogenin, a bone morphogenic protein. *Matrix* 1992;12:369-380.
26. Shapiro H, Chen J. Characterization of porcine bone sialoprotein: primary structure and cellular expression. *Matrix* 1993;13:431-440.
27. Simmons D. Fracture healing perspectives. *Clin Orthop* 1985;200:100-113.
28. Springorum H. Implantation of collagen-fleece for stimulation bone regeneration in standarized bone defects in animal experiments and clinical u 4o Symposium for experimental orthopaedics of Minchened. MH: Hackembranch, Georgthiene, Verlag Stuttgart N.Y., 1982.
29. Urist M. Bone formation by induction. *Science* 1965;150:893.
30. Zetman D, Berthold H. The filling up of large bone defects in the maxillary region with collagen-fleece. *Schweiz. Mschr Zahnheilk* 1982;92:119-126.

Collagen-PVP Accelerates New Bone Formation of Experimentally Induced Bone Defects in Rat Skull and Promotes the Expression of Osteopontin and SPARC during Bone Repair of Rat Femora Fractures^a

J. CHIMAL-MONROY,^b T. BRAVO-RUÍZ, G. J. FURUZAWA-CARBALLEDA, J. M. LIRA, J. C. DE LA CRUZ, A. ALMAZÁN, F. E. KRÖTZSCH-GÓMEZ, G. ARRELLÍN, AND L. DÍAZ DE LEÓN

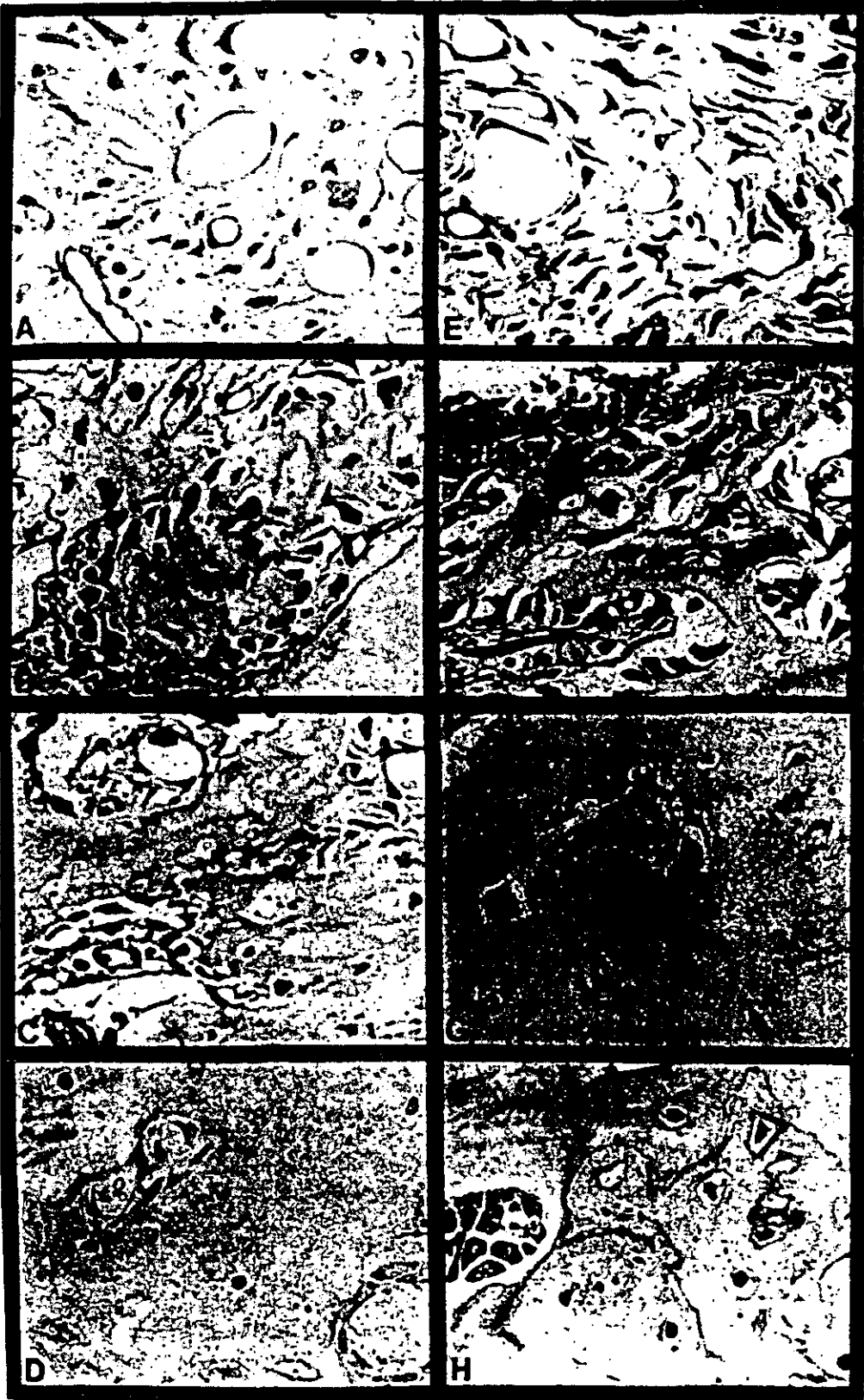
Connective Tissue Laboratory, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70-228, México D.F. 04510, México

All skeletal elements are formed through mesenchymal condensations. In the cranium, these condensations are directly transformed into bone. In contrast, the appendicular skeleton is derived from the initial transformation of mesenchymal condensations into cartilage and the subsequent transformation to bone, through endochondral ossification. Independently of the origin of bone tissue, osteoblasts are the bone-forming cells that produce bone extracellular matrix and the factors that mineralize it.¹ The cellular and molecular events that occur for bone formation during embryogenesis, bone remodeling, and fracture repair are identical. On this basis, we evaluated the effect of γ -irradiated collagen-polyvinylpyrrolidone (PVP) implants on bone regeneration in nonhealing bone defects surgically created in the skull, and on the fracture-healing process in femora of adult male rats. The first model was used because, as these osseous defects do not heal spontaneously, we could thus evaluate collagen-PVP functionality on bone regeneration. In the second model we determined by immunohistologic studies the expression of bone-tissue markers

^aThis work was partially supported by ASPID, S.A. de C.V., and by Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS).

^bTo whom correspondence may be addressed. Phone: 525/622-3819; fax: 525/622-3897; e-mail: jchimal@servidor.unam.mx

FIGURE 1. Bone regeneration after implantation of either lyophilized collagen (A)–(D) or collagen-PVP (E)–(H) at days 1 (A) and (E), 5 (B) and (F), 15 (C) and (G), and 45 (D) and (H) after surgery. Toluidine blue stain; magnification $\times 250$. A total of 54 Wistar rats weighing 200 g were used for bone-defect studies. After anesthesia, circular defects of 5 mm diameter were created in both parietal bones, using a dental drilling machine and under cooling with saline solution. The defects were made without affecting meninges. Bone samples were fixed in 2.5% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and cut at 5 μ m and stained by hematoxylin procedures or were processed for high-resolution microscopy, embedding tissue in Epon resin, and cut into semithin slices. They were stained with Toluidine blue. Bone formation was evaluated by invasion of the created defects by bone-forming cells, and by formation of bone trabeculae.



such as osteopontin (OPN) and SPARC during collagen-PVP treatment. This biomaterial has been used for treatment of hypertrophic scars, causing reduction in the size of scars. Also, treatment with this biomaterial showed an improved wound-healing process. In addition, human hypertrophic and normal fibroblasts *in vitro* produce different levels of cytokines under the effect of collagen-PVP. This response differs from that obtained for collagen or PVP alone, suggesting that collagen-PVP presents different properties to collagen or PVP.

Our results on bone defects showed that rats implanted with lyophilized collagen-PVP exhibited better invasion of mesenchymal cells and blood vessels than those made with collagen alone. At 1 day after surgery the presence of mesenchymal cells was evident in all of the bone-defect zones (FIG. 1) for both treatments. At 5 days after surgery the formation of bone trabeculae occurred more rapidly with collagen-PVP than with collagen implants, while this last one showed incipient bone trabeculae (FIG. 1). At 10 and 15 days after surgery trabeculae were still present, and showed less connective tissue between trabeculae at day 15 postsurgery in collagen-PVP groups (FIG. 1). At the end of the experimental period the histology of bone in collagen implants was almost identical to that obtained with collagen-PVP implants (FIG. 1).

On the basis that collagen-PVP, when implanted in experimentally induced bone defects in rat skulls, accelerates new bone formation, we continued this study to determine whether collagen-PVP administration could play a role in stimulating the fracture-healing process and to determine by immunohistologic studies the expression of bone-tissue markers such as OPN and SPARC during collagen-PVP treatment.

Collagen-PVP-treated fractures showed a greater increase of fracture healing than control fractures. The fibrous tissue was evident at 3 days postfracture in both groups. Osteopontin and SPARC first appeared at this time (FIG. 2). This fibrous tissue was replaced in about 50% of the callus at 7 days postfracture in collagen-PVP-treated fractures, while in controls it occurred at 10 days postfracture. Endochondral ossification was evident at 10 days postfracture in collagen-PVP-treated fractures, and in controls it occurred at 16 days postfracture (FIG. 2). The replacement of cartilage by bone trabeculae occurred at 16 days postfracture in the collagen-PVP group, while in controls it occurred at 23 days postfracture (FIG. 2). Finally, the lamellar bone was evident at the fracture site at 30 and 37 days postfracture in collagen-PVP-treated fractures and controls, respectively (FIG. 2). During this process, OPN and SPARC were more evident in hypertrophic cartilage and in bone trabeculae in collagen-PVP-treated fractures than in controls. Similarly, osteocytes showed high expression of OPN and SPARC in lamellar bone (FIG. 2).

It is interesting to note that the mixture of collagen with a polymer such as PVP elicits higher velocity of ossification than that obtained by collagen alone, suggesting that collagen-PVP implants could form a better matrix for invasion and migration of osteoprogenitor cells, than collagen. These differences may be due to the formation of cross-links between collagen and PVP caused by γ -irradiation. Also, under microscopy we observed that both biomaterials have distinct geometry. This statement is supported by Anselme *et al.*,² who demonstrated that cross-links between collagen and glycosaminoglycans showed different tendencies to calcify in subcutaneous places depending on the cross-link method used. Glutaraldehyde-pre-

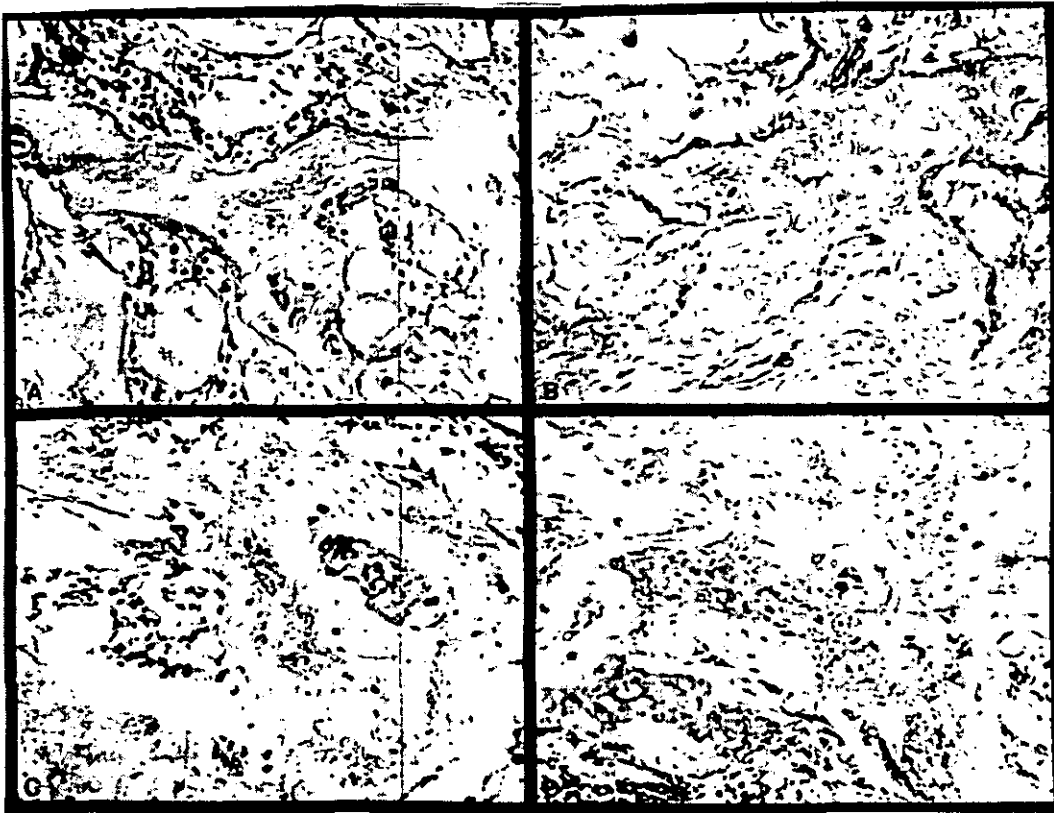


FIGURE 2. Identification of OPN with the antibody LF-123 in sections prepared from control and collagen-PVP-treated fractures at day 16 (A) and (B) postfracture. The expression of OPN is evident in bone trabeculae. At all times in collagen-PVP-treated fractures the staining for OPN was higher than controls. Identification of SPARC with the antibody BONI in sections prepared from control and collagen-PVP-treated fractures at day 16 (C) and (D) postfracture. The expression of SPARC is evident in bone trabeculae. At all times in collagen-PVP-treated fractures the staining for SPARC was higher than controls. Forty-eight healthy male Wistar rats, 8 weeks old, were selected and femoral fractures were created by a longitudinal incision manually made over the middle portion of the right femur. A Kirschner wire (1.1 mm in diameter and 2.7 cm long) was introduced into the intramedullary canal through the intercondylar notch. After the fracture was made, 24 rats were injected intralesionally for three consecutive days with 0.2 mL collagen-PVP (Aspid S.A. de C.V.), while the other 24 rats were not injected and served as controls. Rats were killed under ether anesthesia and the femora were harvested at days 1, 3, 7, 10, 16, 23, 30, and 37 postfracture and were evaluated by histologic and immunohistologic methods.

treatment of collagen glycosaminoglycan sponges generates dystrophic calcification; however, the acyl azide cross-linking method of collagen glycosaminoglycan increases the persistence of the sponge *in vivo* up to 90 days and inhibits its calcification.

On the other hand, we showed that collagen-PVP injected intralesionally in the fracture site stimulates the fracture-healing process. Bone union occurred in 65% of the collagen-PVP-treated animals, with an increase in the expression of OPN and SPARC.

Osteopontin has been detected at high levels in mature osteoblasts at sites of bone remodeling.³ This protein is increased during collagen-PVP-treatment, suggesting that it may stimulate the mineralization process and bone remodeling. Also, OPN is expressed in monocytic lineage and activated T lymphocytes.⁴ Thus, the high expression of OPN, with collagen-PVP-treatment, could be important to stimulate bone repair since it is involved in inflammation, bone formation, and bone remodeling.

SPARC is one of the noncollagenous proteins synthesized by bone cells; it plays an important role in the initiation of mineralization, calcium turnover, and bone remodeling.⁵ During development it is more abundant in proliferative than in differentiated bone. In this study, we identified SPARC in the fibrous callus tissue, probably in proliferating periosteal cells, at 3 days postfracture. Its expression was increased during collagen-PVP-treatment. It has been suggested that SPARC plays an important role in callus formation. It also could be possible that collagen-PVP may accelerate the fracture-healing process.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Larry Fisher for the gift of antibodies to detect bone markers, Mrs. Cleotilde Vargas Lévaro for her technical assistance, and Isabel Pérez-Monfort for her English assistance.

REFERENCES

1. SIMMONS, D. J. 1985. Fracture healing perspectives. *Clin. Orthop. Rel. Res.* **200**: 100-113.
2. ANSELME, K., *et al.* 1992. Inhibition of calcification in vivo by acyl azide cross-linking of a collagen-glycosaminoglycan sponge. *Matrix* **12**: 264-270.
3. CHEN, J., *et al.* 1993. Developmental expression of osteopontin (OPN) mRNA in rat tissues: Evidence for a role of OPN in bone formation and resorption. *Matrix* **13**: 113-123.
4. MIYAZAKI, Y., *et al.* 1990. The mouse osteopontin gene. Expression in monocytic lineages and complete nucleotide sequence. *J. Biol. Chem.* **265**: 14432-14438.
5. TERMINE, J. D., *et al.* 1981. Osteonectin a bone specific protein linking mineral to collagen. *Cell* **26**: 99-105.

Cytokine Expression is Downregulated by Collagen-Polyvinylpyrrolidone in Hypertrophic Scars¹

Fernando E. Krötzsch-Gómez, Janette Furuzawa-Carballeda, Roberto Reyes-Márquez,*
Ernesto Quiróz-Hernández,† and Lino Díaz de León

Department of Cellular Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico City, Mexico; *Department of Plastic and Reconstructive Surgery, CMN 20 de Noviembre, ISSSTE, Mexico City, Mexico; †Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Hospital Militar Regional, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico

We evaluated the *in situ* expression of adhesion molecules (E-selectin and vascular cell-adhesion molecule) and pro-inflammatory/fibrogenic cytokines (IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1, and PDGF) in sections of normal skin, hypertrophic scar, and hypertrophic scar previously treated with an irradiated mixture of collagen-polyvinylpyrrolidone and completely resolved. Expression of these proteins was detected by indirect immunoperoxidase staining. The hypertrophic scar group displayed an increased amount of IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1, and PDGF compared with the normal skin and treated scar groups. Values were statistically significant when cytokines in hypertrophic scar and hypertrophic treated sections were compared. Surprisingly, no differences were detected between normal skin and treated scars. On the other hand, differences in levels of E-selectin and vascular cell-adhesion molecule were not statistically significant between the groups,

except for vascular cell-adhesion molecule, which decreased in treated scars. Also, supernatants from fibroblast cultures derived from treated hypertrophic scar, showed a reduction in TGF- β 1 and PDGF expression, although apparently collagen synthesis was not affected. Based on previous data from clinical studies in human dermal fibrosis remodeling, and the results presented here, we suggest that collagen-polyvinylpyrrolidone modulates extracellular matrix turnover, mainly of collagen, because expression levels of IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1, and PDGF were diminished. We infer that collagen-polyvinylpyrrolidone participation could also modify the inflammatory process observed in hypertrophic scarring, by diminishing the expression of adhesion molecules, as a consequence of lower levels of proinflammatory cytokines, mainly IL-1 β and TNF- α . *Key words: fibrosis/inflammation/therapy. J Invest Dermatol 111:828-834, 1998*

Fibrosis is the pathologic frame of many common disorders, such as cirrhosis, chronic glomerulonephritis, lung fibrosis, post-surgery peritoneal adhesions, vascular restenosis, and dermal fibrosis, including scleroderma or hypertrophic and keloid scars. In affected tissues, inflammation precedes fibrosis with a dramatic increase in the expression of adhesion molecules. The concomitant and excessive synthesis of soluble mediators from inflammatory cells, such as fibrogenic cytokines, induces a loss of balance, involving extracellular matrix (ECM) turnover dysregulation (Kovacs, 1991). Levels of pro-inflammatory and fibrogenic cytokines are high in response to tissue damage, consistent with a chronic inflammatory state that involves fibroblasts, keratinocytes, macrophages, and T lymphocytes. These mediators, in turn, increase cytokine receptors, proliferation, chemotaxis, and synthesis of ECM components. IL-1, TNF- α , PDGF, and TGF- β isoforms actively participate in the wound healing process (Gailit and Clark, 1994). They also show

persistent expression in hypertrophic and keloid scars (Ghahary *et al.*, 1995), as does the intercellular adhesion molecule ICAM-1 (Castagnoli *et al.*, 1994), possibly in response to an irritation of the wound, to an extensive area of damaged tissue [hypertrophic scar (HSc)] or to genetic factors associated with local fibroblasts (keloid) (McPherson and Piez, 1988; Rockwell *et al.*, 1989).

Reparative process research has focused on resolving HSc satisfactorily, on increasing the rate and quality of wound healing, and on avoiding fibrosis formation. In order to relieve these pathologic scars, investigators have developed therapeutic strategies, including: physical therapies, such as radiation, surgery, and pressure; chemical therapies, such as corrosive acids and fixing solutions (formaline); and pharmacologic therapies, such as corticosteroid administration (Darzi and Chowdri, 1992; Soderberg *et al.*, 1982; Ahn *et al.*, 1991; Lawrence, 1991; Tang, 1992). The latter diminishes fibrosis associated with recurrent inflammation by blocking adhesion molecule expression (Chapman and Haskard, 1995), but with the drawback that these immunosuppressors cannot be used for long periods and there is recidivism of scarring. Other therapeutic approaches have tried to block collagen biosynthesis (Rosenbloom *et al.*, 1986; Kawaguchi *et al.*, 1992a, b), but these compounds lack specificity and can therefore affect the metabolism of normal tissues.

Our group has been working with a biologic drug named Fibroquel, which is made of a γ -irradiated mixture of pepsinized porcine type I collagen and polyvinylpyrrolidone (collagen-PVP). The compound has shown beneficial effects when administered to wounds and rat fractures (Almazán Díaz *et al.*, 1996), and to local fibrotic disorders, such as

Manuscript received June 2, 1997; revised May 26, 1998; accepted for publication May 27, 1998.

Reprint requests to: Drs. Fernando E. Krötzsch-Gómez and Lino Díaz de León, Department of Cellular Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad Universitaria, PO Box 70228, Mexico D.F. 04510, Mexico.

Abbreviations: ELAM-1, E-selectin; HSc, hypertrophic scar; VCAM-1, vascular cell-adhesion molecule.

¹The results presented in this work are part of Fernando E. Krötzsch-Gómez's doctoral dissertation.

Table I. Clinical parameters of HSc treated with collagen-PVP

Patient	Age (y)	Sex	Injured area(s)	Scar evolution (y)	Number of injections ^a	After treatment ^b			
						pain	erythema	softness	flattening
1	8	M	Abdomen	4	3	-	-	+/-	+/-
2	7	M	Neck & chin	2	4	-	-	+/-	-
3	8	F	Thorax	2	6	-	-	+	+/-
4	16	F	Neck, chin, & thorax	4	6	-	-	+	+
5	20	M	Thorax	0.5	6	-	-	+	+
6	25	M	Shoulder	3	6	-	-	+	+
7	29	F	Thigh	0.5	6	-	+/-	+	+/-
8	29	M	Hand	0.7	6	-	-	+	+/-
9	43	F	Popliteal space	2	10	-	-	+	+

^aCollagen-PVP was administered once per week.

^b-, absence; +/-, moderate; +, positive.

tendon and dermal fibrosis, where symptoms and volume diminished and the inflammatory infiltrate disappeared in collagen-PVP treated scars, with tissue architecture resembling normal skin.² *In vitro*, collagen-PVP increases collagen synthesis and diminishes the collagenolytic activity of murine fibroblasts, whereas the collagenolytic activity of murine macrophages is increased. These effects are unique and attributable to the compound, because its components (collagen and polyvinylpyrrolidone) do not have the same effect alone when compared with collagen-PVP (Kröttsch-Gómez FE and Díaz de León L, manuscript in preparation). For this reason, we infer that the mechanism of action of collagen-PVP is not a negative feedback, as reported when fibroblasts are treated with collagen gels (Eckes *et al*, 1993).

In this study, the mechanism of action of collagen-PVP was investigated by evaluating cytokine and adhesion molecule expression in HSc. Also, we report the behavior of cultures of fibroblasts derived from the same tissues by the analysis of collagen turnover and cytokine expression.

MATERIALS AND METHODS

Tissue specimens Samples of human tissue were excised during plastic surgery operation. Three were normal skin biopsies, four were HSc with a disease duration of 4.3 ± 1.5 y, and five were HSc with a disease duration of 3.1 ± 1.4 y, previously treated with an intralesional administration of 0.2 ml per week of collagen-PVP if scar length was 5 cm or less, 0.4 ml per week if scar length was between 5 and 10 cm, and 0.6 ml per week if scar length was 10 cm or more, until normalization of the scar by clinical criteria (between 1 and 3 mo). A section of the samples was snap-frozen in liquid nitrogen. Then they were cut at 4–6 μ m and serial sections were mounted on γ -methacryloxypropyltrimethoxysilane (Sigma, St. Louis, MO) coated slides. Finally, sections were fixed in acetone at -20°C .

Histology and immunohistochemistry Herovici staining was performed according to Herovici (1963). Immunohistochemical procedures were assessed by blocking with 3% egg albumin (Sigma), except for the TGF- β 1 assay in which the blockade was done with 3% bovine albumin (Sigma), and then the sections were incubated with a mouse anti-human E-selectin (ELAM-1) or vascular cell-adhesion molecule (VCAM-1) monoclonal IgG at 25 μ g (Genzyme, Cambridge, MA) per ml, or a goat anti-human IL-1 β , TNF- α , or PDGF polyclonal IgG at 20 μ g (R&D Systems, Minneapolis, MN) per ml. Anti-PDGF antibodies recognize all isoforms (AA, AB, and BB). A chicken anti-human TGF- β polyclonal IgG neutralizing antibody (R&D Systems), which recognizes only isoforms 1 and 1.2 and has 100 times less affinity for TGF- β 2, was used at 20 μ g per ml. Antibodies were incubated for 60 min at room temperature. Binding was detected by incubating sections for 60 min at room temperature with rabbit anti-mouse biotinylated IgG diluted 1:20 (Sigma) for the adhesion molecules assay, with rabbit anti-goat biotinylated IgG, diluted 1:100 (Sigma) for IL-1, TNF- α , and PDGF detection or with rabbit anti-chicken biotinylated IgG, diluted 1:750 (Pierce, Rockford, IL) for the TGF- β assay. Avidin-peroxidase complex (Sigma) was used at a 1:20 dilution for 45 min at room temperature. The sections were developed in a solution of diaminobenzidine, and counterstained with hematoxylin. Finally, sections were

dehydrated with alcohol and xylene, and mounted in resin. Negative control staining was performed with normal human serum diluted 1:100, instead of primary antibody. At least two different sections were examined for each patient. Adhesion molecule and cytokine expression was assessed by estimating positively staining cells in blood vessels and cells spreading along one field below the epidermis (see Results), and it was reported as the percentage of immunoreactive cells; results were expressed as the mean \pm SEM. Associations between quantifiable variables were determined using Student's *t* test and Mann-Whitney U test.

Fibroblast culture conditions Fibroblast cultures were established by fractionating with scissors one fragment of normal skin, HSc, or HSc treated with collagen-PVP and incubating the fragments with 0.1% bacterial collagenase type II (Sigma) for 1 h at 37°C . The homogenate was centrifuged at 1250 rpm for 2 min. The supernatant was eliminated and the pellet was resuspended in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) high in glucose, supplemented with heat-inactivated 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, and antibiotics (100 U penicillin per ml and 5 μ g streptomycin per ml). Cells were grown at 37°C in 5% CO_2 in air. Cells between passages 3 and 4 were used for the experiments. Every experimental condition was normalized by DNA content and tested at least in triplicate, except for the cytokine assay, which was tested in duplicate.

Collagen synthesis The assay was achieved by seeding 10^5 fibroblasts from normal skin, HSc, or HSc previously treated with collagen-PVP, in 0.5 ml DMEM with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, and 50 μ g ascorbate per ml in 24 well plates, incubating them for 48 h at 37°C in 5% CO_2 in air. Then the medium was eliminated and the cultures were incubated for 3 h at 37°C in 5% CO_2 in air, in DMEM without fetal calf serum, and with 2 mM L-glutamine and 50 μ g ascorbate per ml. The medium was replaced with the same fresh medium supplemented with 0.5 μ Ci per ml of L-[U- ^{14}C]proline 50 μ Ci per ml (Amersham, U.K.) (Dieggelmann *et al*, 1990). Collagenous and noncollagenous protein synthesis were evaluated in homogenized monolayer and supernatant fractions, and collagen content was calculated according to the Peterkofsky and Dieggelmann formula (Peterkofsky and Dieggelmann, 1971).

Cytokine expression IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1, and PDGF-AB were determined in supernatants of cultures under the conditions mentioned above. Two hundred microliters were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay according to the manufacturer's instructions (R&D Systems).

RESULTS

Clinical observations Features of a group of nine patients with HSc were evaluated. After a mean treatment period of 8 wk with collagen-PVP, as mentioned in *Materials and Methods*, the scars got soft and were flattened until reaching normal skin border (Table I; Fig 1). It is important to note that none of the patients presented relapse of hypertrophy after 2.5 y.

Herovici staining Sections of normal skin, HSc, and HSc previously treated with collagen-PVP and clinically resolved were stained following the Herovici procedure. HSc were quite different from normal skin (Fig 2a, b); the epidermal profile was flattened, whereas in normal skin it was irregular with rete ridges. In scar sections, type I collagen fibers (red in Fig 2b) were present with parallel distributions in papillary dermis with respect to epidermis and in nodular zones all along the deep dermis (Fig 2b, small arrow), and type III collagen (blue fibers)

²Díaz de León HL, Kröttsch-Gómez FE, Guerrero-Padilla E, Cervantes-Viramontes R, Reyes-Márquez R: A novel approach for the treatment of tissular fibrosis. *Matrix Biol* 145:401, 1994 (abstr.)

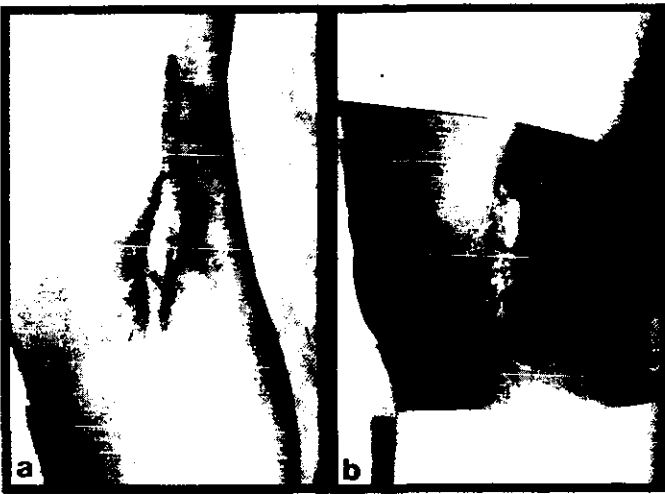


Figure 1. HSc before and after treatment with collagen-PVP. Forty-three year old female patient with HSc in the popliteal space with 2 y of evolution (a). The scar was treated for 10 wk with a weekly intralesional administration of 0.4 ml in the collagen-PVP. Note the mark of the scar is present, although the skin border has been reached, also erythema is absent and the patient reported no pain after the first 3 wk of treatment (b).



Figure 2. Collagen-PVP effect on tissue architecture restoration. Photomicrographs of human skin and scar tissue with or without treatment, stained with Herovici technique. (a) Normal skin exhibiting rete ridges, reticular type I collagen fibers in red, type III collagen fibers in blue in papillary dermis. (b) HSc without rete ridges, type I collagen distributed in whorl-like arrangements and nodular areas (small arrow). (c) HSc treated with collagen-PVP resembles normal skin, with type III collagen present in papillary dermis (big arrow) and showing a hair follicle (small arrow). Scale bar, 1000 μ m.

below the epidermis was reduced. On the other hand, type I collagen distribution in normal skin was characteristically reticular, and type III collagen was more abundant in the papillary dermis than in the HSc sections. Interestingly, collagen-PVP-treated HSc (Fig 2c) showed a type I collagen distribution and a type III collagen zone (big arrow) similar to those observed in normal skin, and in some cases partial recovering of rete ridges and the presence of cutaneous appendages were observed (Fig 2c, small arrow).

In situ expression of proinflammatory and fibrogenic cytokines IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1, and PDGF showed strong differences among the groups (Figs 3–6). HSc sections [part (c) in each montage] revealed more cells expressing these mediators than either normal skin or collagen-PVP treated HSc [parts (b) and (d), respectively, in each montage] (IL-1 β , $p = 0.036$; TNF- α , $p = 0.036$; and PDGF, $p = 0.003$, treated versus untreated HSc) (Fig 7a). On the other hand, blood vessels also exhibited the same pattern as spread cells (IL-1 β , $p = 0.002$; TNF- α , $p < 0.001$; and PDGF, $p = 0.01$, treated versus untreated HSc) (Fig 7b). In both cases, endothelium and spread cells in treated scars had cytokine levels similar to or lower than those of normal skin, although these differences were not statistically significant. Immunoreactivity of tested cytokines (large arrows) was consistently

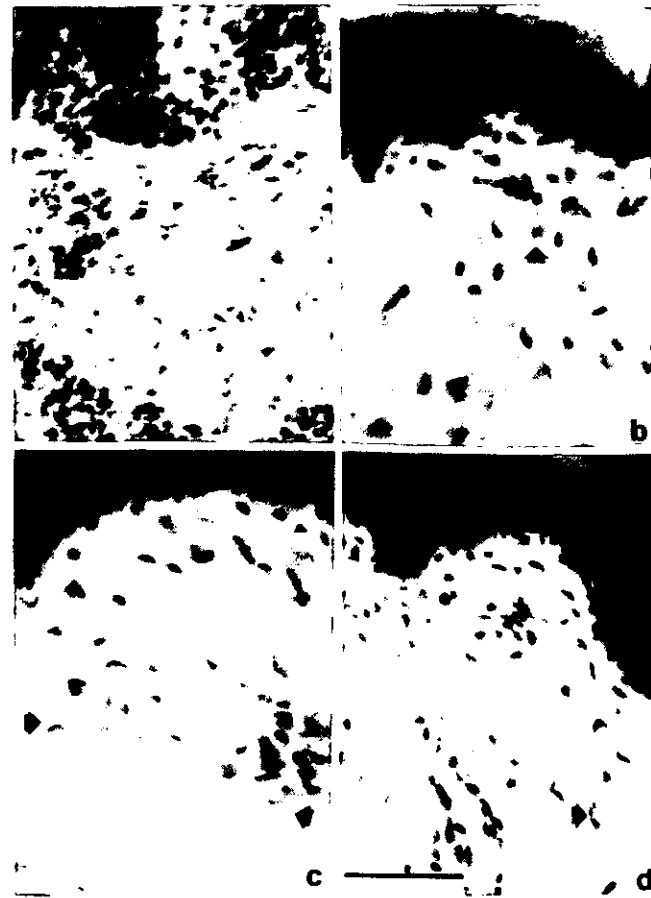


Figure 3. Immunolocalization of IL-1 β in human skin sections frozen with the immunoperoxidase technique (avidin-biotin-peroxidase system). (a) Photomicrograph of negative control; (b) photomicrograph of normal skin; (c) photomicrograph of HSc, arrows indicate immunoreactive cells; (d) photomicrograph of HSc treated with collagen-PVP. Scale bar, 200 μ m.

localized in the papillary dermis, where typical HSc nodules of fibrosis were absent, except for TGF- β 1, which was more widely spread.

The stratum basalic of the epidermis also showed reactivity; however, negative controls (Fig 4a, small arrow) were also positive in the basal layers of the epidermis. We attribute these differences to the intensity of skin pigmentation. This artifact did not exclude the possibility of epidermal reactivity, but obscured a quantitative interpretation, because keratinocytes are important producers of several cytokines (Streilein, 1993).

In situ expression of adhesion molecules ELAM-1 and VCAM-1 were detected in normal skin and HSc (Figs 8b, c, 9b, c, respectively). In scars previously treated with collagen-PVP (Figs 8d, 9d), both molecules showed slightly lower levels when compared with normal skin and HSc groups, but only the difference of VCAM-1 levels between normal skin and treated HSc were statistically significant (IL-1 β , $p = 0.036$). In contrast, levels of expression of ELAM-1 were different, although not statistically significant among the groups (Fig 10). Even when we only quantitated the percentage of immunostaining in endothelium, other sites also showed reactivity, such as interstitial inflammatory infiltrated cells and some isolated labels, maybe due to soluble ELAM-1.

Fibroblast culture findings There was no difference in collagen synthesis among the different cultures assessed (Fig 11a); however, there were differences in cytokine expression in the supernatants of fibroblast cultures derived from normal skin, HSc, and treated HSc (Fig 11b), where only TGF- β 1 and PDGF-AB were quantifiable, because IL-1 β and TNF- α were not detected by our enzyme-linked immunosorbent assay systems. TGF- β 1 was 3.5-fold higher in normal skin as well as in HSc when compared with treated HSc fibroblasts,

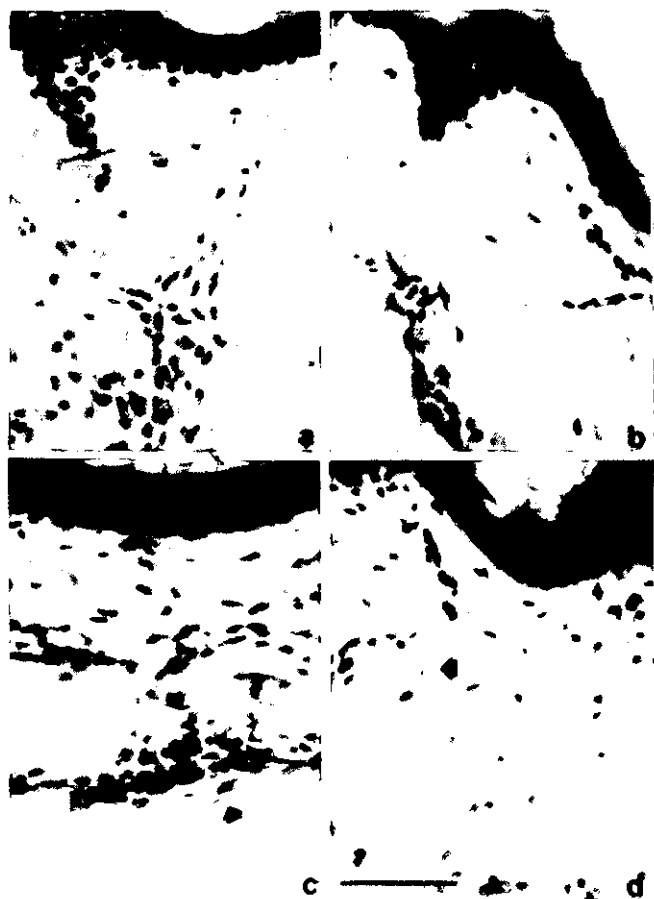


Figure 4. Immunolocalization of TNF- α in human skin sections frozen with the immunoperoxidase technique (avidin-biotin-peroxidase system). (a) Photomicrograph of negative control; (b) photomicrograph of normal skin; (c) photomicrograph of HSc, arrows indicate immunoreactive cells; (d) photomicrograph of HSc treated with collagen-PVP. Scale bar: 200 μ m.

whereas PDGF-AB levels were similar between normal skin and treated HSc fibroblasts, and they were 1-fold higher in HSc.

DISCUSSION

In this study we found that fibrogenic/promflammatory cytokines were predominantly detected in the upper dermis of normal skin (Figs 3, 4, 6), except for TGF- β 1 (Fig 5), which was also found in the deep dermis in nodular zones, as previously described (Ghahary *et al.* 1995). HSc manifested a strong parallel increase of all cytokines measured in spread cells, as well as in blood vessels (Fig 7). Some of these data contrast with those of Castagnoli *et al.* (1993), which indicate similar levels of TNF- α in HSc and normal skin.

TGF- β is synthesized by many cells and tissues, including normal skin and HSc (Ghahary *et al.* 1995). Its localization in fibroblast-like cells derived from fibrotic pathologies like hypertrophic scarring, as well as in endothelial cells adjacent to mononuclear cells, suggests a relationship between factor-producing cells and those responsible for collagen overexpression, where the connection could be either autocrine or paracrine (Zhang *et al.* 1995). Furthermore, TGF- β participates with PDGF in an orchestrated way. Here we have shown that TGF- β 1, as well as PDGF-AB, were diminished in fibroblast cultures derived from treated HSc when they were compared with normal skin and HSc fibroblasts (Fig 11b). This is important, because generally fibroblasts are considered to be effector cells regulated by inflammatory cells. These results could indicate that the fibroblast itself has an ability for autoregulation, perhaps through collagen-PVP modulation. Because collagen synthesis by fibroblasts did not show variations among the different cultures tested (Fig 11a), the results suggest that collagen synthesis is not regulated in an autocrine fashion, at least by TGF- β 1 and/or PDGF-AB. Therefore, it is necessary to evaluate collagen

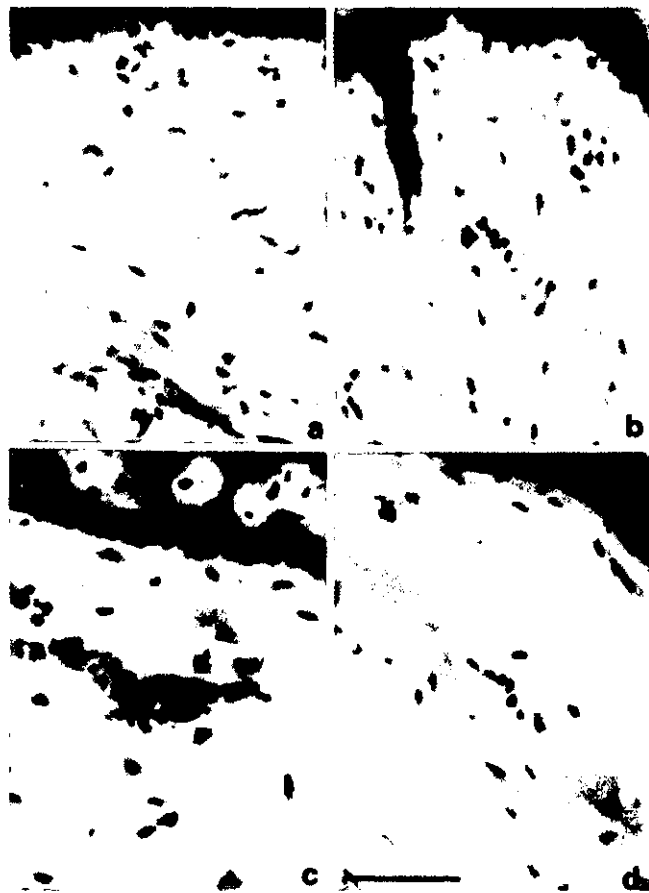


Figure 5. Immunolocalization of TGF- β 1 in human skin sections frozen with the immunoperoxidase technique (avidin-biotin-peroxidase system). (a) Photomicrograph of negative control; (b) photomicrograph of normal skin; (c) photomicrograph of HSc, arrows indicate immunoreactive cells; (d) photomicrograph of HSc treated with collagen-PVP. Scale bar: 200 μ m.

turnover in this lineage, as well as the cooperative effects between inflammatory cells and fibroblasts.

IL-1 and TNF- α have similar fibrogenic activities. These two cytokines participate in ECM turnover and inflammation, their principal source being leukocytes; however, they have also been detected in mesenchymal cells and epidermis as a significant reservoir. Nevertheless, we were unable to detect these cytokines in fibroblast cultures.

Here we report that in collagen-PVP-treated HSc, completely resolved by clinical criteria, all the tested cytokines (IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1, PDGF) analyzed by immunohistochemistry showed diminished expression, even below normal levels, and a similar reduction in the expression of adhesion molecules was observed (Fig 10). This suggests a correlation between them, although only VCAM-1 was statistically significant when normal skin *versus* treated HSc were compared. Because collagen-PVP treatment has been shown to modify human dermal fibrosis, as presented here (Table I), we infer that its mechanism of action can be directly associated with the inflammatory process observed in HSc, possibly by the decrease in the expression of adhesion molecules, which are upregulated in response to proinflammatory cytokines, IL-1 β , and TNF- α . Also, low levels of these cytokines observed in endothelium from treated HSc could downregulate chemotaxis. Therefore, we suggest that the chronic inflammatory process is interrupted by collagen-PVP action, diminishing the partial production of fibrogenic soluble factors, including their self-expression by spreading cells, probably connective tissue cells and inflammatory infiltrates. This mechanism allows the recovery of tissue homeostasis, although it leads to gradual elimination of fibrosis by the increased turnover of ECM components. This is because ECM metabolism is regulated by various mechanisms, including soluble factors or cytokines (Postlethwaite *et al.* 1988; Gailit and Clark, 1994), as well as the ECM itself (Massagué, 1990). It could be possible that the collagen-PVP

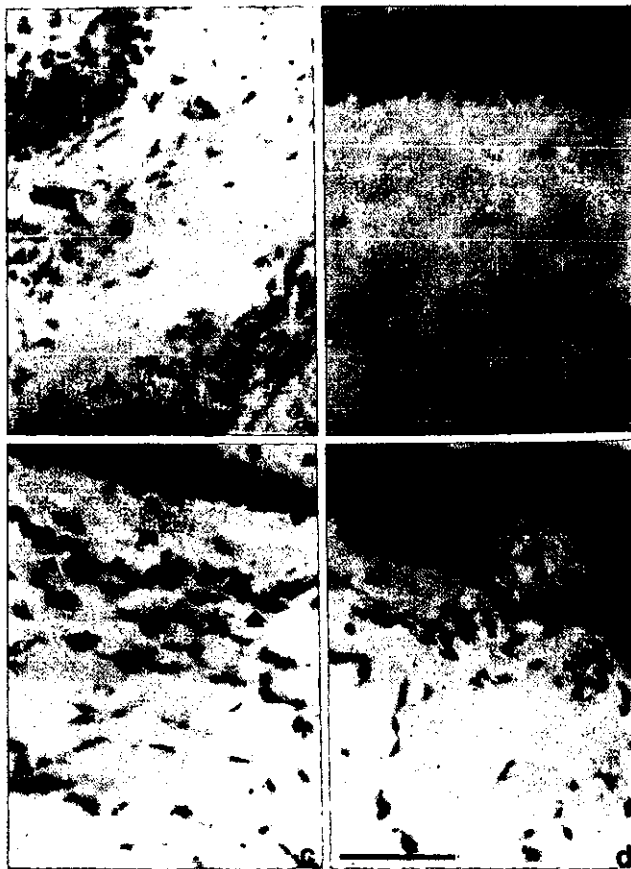


Figure 6. Immunolocalization of PDGF in human skin sections frozen with the immunoperoxidase technique (avidin-biotin-peroxidase system). (a) Photomicrograph of negative control; (b) photomicrograph of normal skin; (c) photomicrograph of HSc, arrows indicate immunoreactive cells; (d) photomicrograph of HSc treated with collagen-PVP. Scale bar: 200 μ m.

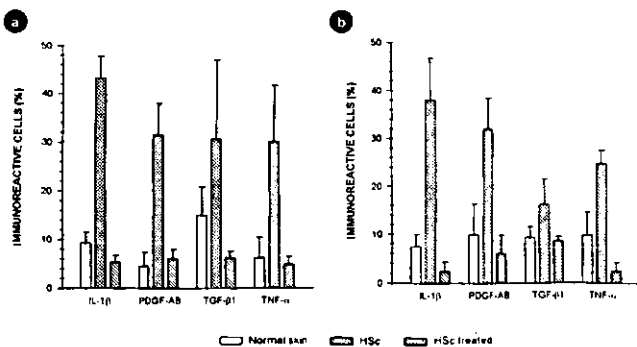


Figure 7. Collagen-PVP effect on pro-inflammatory cytokine expression in HSc. The percentage of cytokine expressing immunoreactive cells was determined for normal skin, HSc, and collagen-PVP treated HSc. Cytokine values were compared between treated and untreated samples as mentioned in *Materials and Methods*. They were different in (a) spread cells (IL-1 β , $p = 0.036$; TNF- α , $p = 0.036$, and PDGF, $p = 0.003$) and (b) blood vessels (IL-1 β , $p = 0.002$, TNF- α , $p < 0.001$ and PDGF, $p = 0.01$, treated *versus* untreated HSc). Results represent the mean \pm SEM of at least two sections of each tissue from normal skin ($n = 3$), HSc ($n = 4$), and HSc previously treated with collagen-PVP ($n = 5$).

complex is recognized by cell receptors, such as integrins, and then this modifies the intracellular signals for cytokine expression and/or ECM and metalloproteases synthesis; however, it is necessary to perform the appropriate experiments to explore these possibilities.

It is evident that these cytokines are associated with the persistence of an inflammatory infiltrate, which generates new signals capable of recruiting more leukocytes and which stimulates the expression of

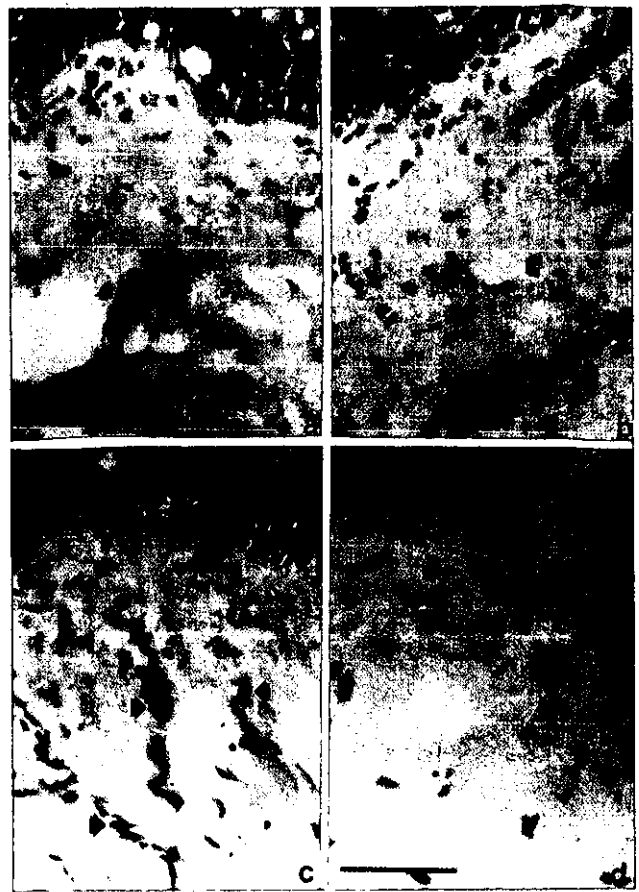


Figure 8. Human skin sections frozen with the immunoperoxidase technique (avidin-biotin-peroxidase system) using an anti-ELAM-1 as primary antibody. (a) Photomicrograph of negative control; (b) photomicrograph of normal skin; (c) photomicrograph of HSc, arrows indicate immunoreactive cells; (d) photomicrograph of HSc treated with collagen-PVP. Scale bar: 200 μ m.

adhesion molecules. This could perpetuate the inflammatory process present in hypertrophic scarring; however, we have found that collagen-PVP is a good choice for treatment not only in dermal fibrosis, as has been shown, but also in other fibrotic processes, such as fibrotic Achilles tendon (unpublished results). Collagen-PVP has the advantage of being a biologic drug with minimal risks, because no side-effects have been detected in healthy volunteers and HSc patients treated for long periods (even 14 y) with the drug. This was judged clinically and by laboratory tests applied before and after treatment (data not shown).

Even though it is well known that nonhuman collagen implants are capable of inducing heterologous anticollagen antibodies (Ellingsworth *et al.*, 1986; Trentham, 1986; Vanderveen *et al.*, 1986; Hyder *et al.*, 1992), no evidence exists to associate them with autoimmune diseases related to collagen dermal implants (Singh and Fries, 1994; Lewy, 1994). Furthermore, little is known about porcine collagen implants, as in the case of collagen-PVP. Generally, collagen implants consist of insoluble fibrillar collagens resuspended in saline solutions, in such a way that the structure of these implants is quite different from that seen in collagen-PVP. Collagen association with polyvinylpyrrolidone, and the cross-linking favored by γ -irradiation, confers on it various physicochemical properties, such as the impossibility of forming a gel when diluted in culture medium at 37°C and neutral pH (data not shown); therefore, collagen-PVP does not behave like other collagen implants. Moreover, electrophoretic analysis demonstrated a change in the relative mobility of collagen-PVP when compared with the mixture without γ -irradiation or the components alone (Chimal-Monroy *et al.*, 1997).

Based on the results obtained in this study, in particular the low levels of fibrogenic cytokines and adhesion molecules in treated *versus*

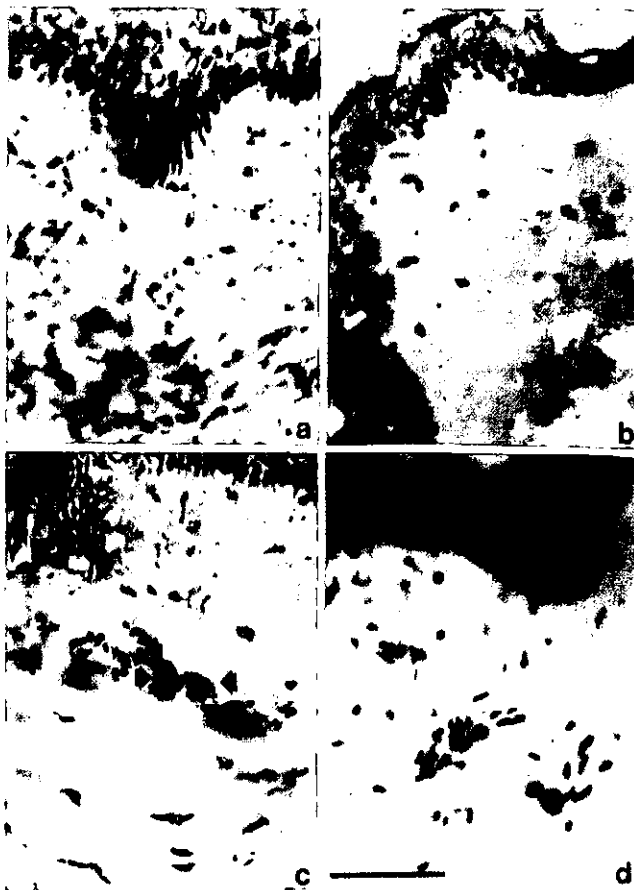


Figure 9. Human skin sections frozen with the immunoperoxidase technique (avidin-biotin-peroxidase system) using an anti-VCAM-1 as primary antibody. (a) Photomicrograph of negative control; (b) photomicrograph of normal skin; (c) photomicrograph of HSc, arrows indicate immunoreactive cells; (d) photomicrograph of HSc treated with collagen-PVP. Scale bar: 200 μ m.

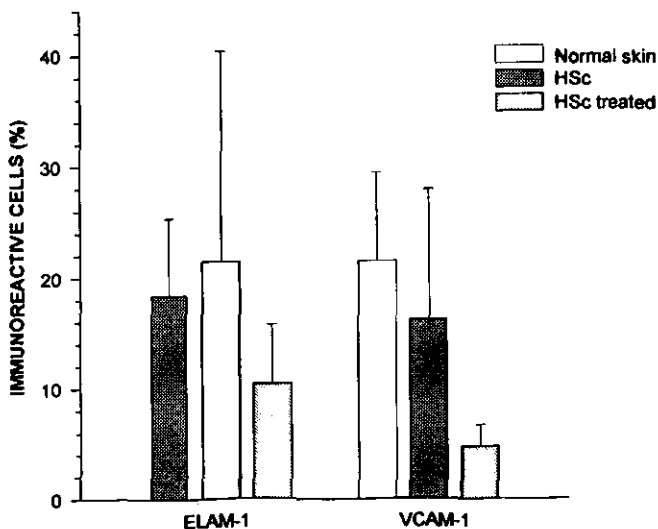


Figure 10. Collagen-PVP effect on adhesion molecule expression in treated HSc. The percentage of adhesion molecule-expressing immunoreactive cells was determined in blood vessels of normal skin, HSc, and collagen-PVP-treated HSc. Adhesion molecule values were compared between treated and untreated samples as mentioned in *Materials and Methods* but they were not different; however, when normal skin was compared with treated HSc, these values were different with a statistical level of $p = 0.036$ for VCAM-1. Results represent the mean \pm SEM of at least two sections of each tissue from normal skin ($n = 3$), HSc ($n = 4$), and HSc previously treated with collagen-PVP ($n = 5$).

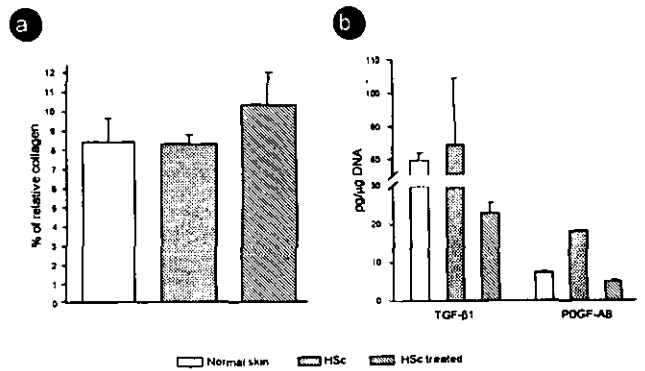


Figure 11. Fibroblasts derived from HSc treated with collagen-PVP were assayed for collagen synthesis and cytokine expression. The percentage of relative collagen was determined by [14 C]-Proline incorporation, values were compared between treated and untreated groups, but they were not significantly different. Results represent the mean \pm SD of triplicates of each culture (a). TGF- β 1 and PDGF-AB levels were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay. Results represent the mean \pm SD of two different experiments performed by duplicate. Where p values for TGF- β 1 are ≤ 0.05 for normal skin or HSc versus HSc treated, and ≤ 0.003 for PDGF-AB for normal skin or HSc treated versus HSc (b), normal skin, HSc, and collagen-PVP-treated HSc.

untreated HSc, we suggest that collagen-PVP can modulate extracellular matrix turnover, mainly of collagen, and thus block the progression of the fibrotic process.

We acknowledge Dr. Jeffrey Davidson, Dr. Carlos Rosales, and Dr. Philip Maini for their critical review of the manuscript, Dr. Miguel Morales for microscopical and cryostat assistance, and Isabel Pérez-Monfort and Ana Luisa Weckmann for correcting the English version of the manuscript. This work was partially supported by grant LDL-94 provided by Aspid S.A. de C.V. and IADEP 030336 (UNAM).

REFERENCES

Ahn ST, Monafó WW, Mustoe TA: Topical silicone gel for the prevention and treatment of hypertrophic scar. *Arch Surg* 126:499-504, 1991

Almazán Díaz A, la Cruz García JC, Lira Romero JM, et al: Investigación experimental de la regeneración ósea en fémures de rata después de la aplicación de colágena I polimerizada: Estudio radiológico, histológico e histoquímico. *Rev Mex Ortop Traum* 10:142-152, 1996

Castagnoli C, Stella M, Berthod Ch, Magliacani G, Momigliano Richiardi P: TNF production and hypertrophic scarring. *Cell Immunol* 147:51-63, 1993

Castagnoli C, Stella M, Magliacani G, Ferrone S, Momigliano Richiardi P: Similar ectopic expression of ICAM-1 and HLA Class II molecules in HSc following thermal injury. *Burns* 20:430-433, 1994

Chapman PT, Haskard DO: Leukocyte adhesion molecules. *Br Med Bull* 51:296-311, 1995

Chimal-Monroy J, Bravo-Ruiz T, Kröttsch-Gómez FE, y Díaz León L: Implantes de Fibroquel^{MR} aceleran la formación de hueso nuevo en defectos óseos inducidos experimentalmente en cráneo de rata: Un estudio histológico. *Rev Biomed* 8:81-88, 1997

Darzi MA, Chowdri NA: Evaluation of various methods of treating keloids and hypertrophic scars, a 10 year follow up study. *Br J Plast Surg* 45:374, 1992

Dieggelmann RF, Graham MF, Bryson GR: An *in vitro* microassay to quantitate collagen synthesis and its utility for analyzing the effects of defined inflammatory mediators. *Ann New York Acad Sci* 580:514-517, 1990

Eckes B, Mauch C, Hüppe G, Krieg T: Downregulation of collagen synthesis in fibroblast within three-dimensional collagen lattices involves transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Febs* 318:129-133, 1993

Ellingsworth LR, DeLustro F, Brennan JE, Sawamura S, McPherson J: The human immune response to reconstituted bovine collagen. *J Immunol* 136:877-882, 1986

Gallit J, Clark RAF: Wound repair in the context of extracellular matrix. *Curr Op Cell Biol* 6:717-725, 1994

Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Tredget EE: Immunolocalization of TGF- β 1 in human hypertrophic scar and normal dermal tissues. *Cytokine* 7:184-190, 1995

Herovici C: Polychrome stain for differentiating precollagen from collagen. *Stain Technol* 38:204-205, 1963

Hyder P, Singh G, Adam S: Humoral responses to type I collagen after surgical curettage procedures employing bovine collagen implants. *Biomaterials* 13:693-696, 1992

Kawaguchi Y, Kitani A, Hara M, et al: Cytokine regulation of prolyl 4-hydroxylase production in skin fibroblast cultures from patients with systemic sclerosis: Contribution to collagen synthesis and fibrosis. *J Rheumatol* 19:1195-1201, 1992a

Kawaguchi Y, Harigai M, Kitani A, et al: Effect of prolyl 4-hydroxylase inhibitor on

- fibroblast collagen production *in vitro*: An approach to the treatment of systemic sclerosis. *J Rheumatol* 19:1710-1715, 1992b
- Kovaics EJ: Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol Today* 12:17-23, 1991
- Lawrence WT: In search of the optimal treatment of keloids: report of a series and a review of the literature. *Ann Plast Surg* 27:164, 1991
- Lewy RI: Autoimmune disease and collagen dermal implants (see comments). *Ann Intern Med* 120:525, 1994
- Massagué J: The transforming growth factor- β family. *Ann Rev Cell Biol* 6:597-641, 1990
- McPherson JM, Piez KA: Collagen in dermal wound repair. In: Clark RAF, Henson PM (eds). *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. New York: Plenum Press, 1988, pp. 471-496
- Peterkofsky B, Dieggelmann R: Use of a mixture of proteinase-free collagenase for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteases. *Biochem* 10:988-993, 1971
- Postlethwaite AE, Raghov R, Stricklin GP, Poppleton H, Seyer JM, Kang AH: Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 α and β . *J Cell Biol* 106:311-318, 1988
- Rockwell WB, Cohen IK, Ehrlich HP: Keloids and hypertrophic scars: a comprehensive review. *Plast Reconstr Surg* 84:827-837, 1989
- Rosenbloom J, Feldman G, Freundlich B, Jimenez SA: Inhibition of excessive scleroderma fibroblast collagen production by recombinant γ -interferon. *Arthritis Rheum* 29:851-856, 1986
- Singh G, Fries JF: Autoimmune disease and collagen dermal implants (see comments). *Ann Intern Med* 120:524, 1994
- Soderberg T, Hallmans G, Bartholdson L: Treatment of keloids and hypertrophic scars with adhesive zinc tape. *Scand J Plast Reconstr Surg* 16:261, 1982
- Streilein JW: Dermal cells: underappreciated components of skin-associated lymphoid tissues (SALT). In: Nickoloff BJ (ed.). *Dermal Immune System*. Ann Arbor, Michigan: CIRC Press, 1993, pp. 26-37
- Tang YW: Intra and postoperative steroid injections for keloids and hypertrophic scars. *Br J Plast Surg* 45:371, 1992
- Trentham DE: Adverse reactions to bovine collagen implants. *Arch Dermatol* 122:643-644, 1986
- Vanderveen EE, McCoy JP, Schade W, et al: The association of HLA and immune responses to bovine collagen implants. *Arch Dermatol* 122:650-654, 1986
- Zhang K, Garner W, Cohen L, Rodriguez J, Phan S: Increased types I and III collagen and transforming growth factor- β 1 mRNA and protein in hypertrophic burn scar. *J Invest Dermatol* 104:750-754, 1995

Interleukin-8, Interleukin-10, Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression Levels are Higher in Synovial Tissue from Patients with Rheumatoid Arthritis than in Osteoarthritis

J. FURUZAWA-CARBALLEDA & J. ALCOCER-VARELA

Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

(Received 25 January 1999; Accepted in revised form 26 March 1999)

Furuzawa-Carballeda J, Alcocer-Varela J. Interleukin-8, Interleukin-10, Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression Levels are Higher in Synovial Tissue from Patients with Rheumatoid Arthritis than in Osteoarthritis. *Scand J Immunol* 1999;50:215–222

The aim of this work was to determine differences in pro- and anti-inflammatory cytokine and adhesion molecule expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis (RA) or osteoarthritis (OA). Synovial tissue samples were obtained from patients with RA and OA, and from healthy individuals. The expression of mRNA of interleukin (IL)-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, tumour necrosis factor- α (TNF- α) and transforming growth-factor- β 1 (TGF- β 1) was evaluated by the polymerase chain reaction (PCR). In addition, IL-8 and IL-10 transcripts were measured by quantitative PCR. The expression of IL-8 and IL-10 proteins was determined by immunoperoxidase staining. To evaluate the inflammatory stage of synovial tissue, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) protein expression was also determined. RA patients were found to display higher levels of adhesion molecules than patients with OA. PCR analysis showed a similar profile of cytokine transcripts between the OA and RA groups. Gene expression of IL-4 and IL-13 in synovium was undetectable. In contrast, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α and TGF- β 1 transcripts were expressed by both groups. Increased levels of IL-8 and IL-10 transcripts and their proteins were observed in synovium from RA patients when compared to patients with OA and healthy controls. Thus, our data show that IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 expression levels are higher in synovial tissue from patients with RA than in similar tissue from patients with OA.

Jorge Alcocer-Varela, Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga no. 15, CP 14000, Mexico City, Mexico

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a generalized autoimmune disorder that predominantly affects synovial joints, displaying a chronic nonsuppurative inflammation associated with erosive destruction of joint cartilage, ligaments, tendons and subchondral bone. It is characterized histologically by extensive infiltration of leucocytes and macrophages and by hyperplasia of the synovial lining layer [1]. In contrast, the pathogenic basis of osteoarthritis (OA), is less clear-cut. Synovial tissue (ST) from patients with OA presents thickening of the lining layer, increased vascularity and variable degrees of inflammatory mononuclear cell infiltration. The inflammatory process at the onset of OA may be the primary

cause or secondary to cartilage destruction. However, inflammatory changes in ST are occasionally almost indistinguishable from those seen in RA patients [2–4]. It has been proposed that OA is a synovial disease where mechanical factors may be of importance and this is supported by experimental models and clinical observations in humans [5]. Moreover, in both pathologies many factors are involved in synovial inflammation, where cytokines have emerged as regulatory factors of particular importance. The final effect of joint destruction in OA and RA may be the result of an imbalance between the proinflammatory cytokines, which perpetuate the influx of cells, and the anti-inflammatory cytokines and their inhibitors. In fact, it has been shown that the presence of many infiltrating leucocytes in

inflamed rheumatic joints is mediated by chemotactic factors released by local activated cells. Thus, T-cell and neutrophil chemotaxis, a crucial process for leucocyte accumulation, is predominantly induced by interleukin (IL)-8 [6–10]. Other cytokines, such as IL-1, IL-6, tumour necrosis factor- α (TNF- α), granulocyte and monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF), transforming growth factor- β (TGF- β) and IL-10, have also been detected in the RA joint [11–25]. Overexpression of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , GM-CSF and epidermal growth factor (EGF) has been described in OA synovium [4, 24–26].

Nevertheless, there are also down-regulators of the pro-inflammatory response, such as IL-10, which has been shown to be an important pleiotropic cytokine with anti-inflammatory and stimulatory activities. IL-10 exerts its anti-inflammatory activity by inhibiting T helper 1 (Th1)-type responses and monocyte functions through the inhibition of proinflammatory cytokine production [27] and by down-regulating the expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules [28] and TNF receptors [29]. However, IL-10 is also a B-cell stimulator, enhancing B-cell proliferation and differentiation [30]. As IL-8 and IL-10 play important roles in the regulation of cellular and humoral immune responses, they represent good targets for studying possible differences in their synthesis and expression in RA and OA pathologies.

On the other hand, ST from patients with OA or RA is characterized by an increased expression of cell adhesion molecules (CAMs) from the selectin (E-selectin) and integrin families (α_{1-6} , α_d , β_{1-4} , etc.), and from the immunoglobulin gene superfamily (intercellular adhesion molecule, or ICAM-1, and vascular cell adhesion molecule, or VCAM-1) [31–36]. Their altered expression in tissue-bound immune cells indicates prior activation by proinflammatory cytokines [37, 38]. Thus, the aberrant production or activation of soluble mediators, altered connective tissue cell responsiveness to those mediators and/or impaired downregulation of proinflammatory/fibrogenic stimuli, lead to the development of synovium pathology.

In the present study, we investigated whether there are qualitative or quantitative differences in cytokine and adhesion molecule expression by RA and OA ST, through:

- (1) the evaluation of mRNA of some proinflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and TGF- β 1 and some anti-inflammatory cytokines, such as IL-4 [29], IL-10 and IL-13 [39–44];
- (2) the measurement of IL-8 and IL-10 mRNA, as well as their proteins; and
- (3) the adhesion molecule protein expression of the immunoglobulin superfamily molecules VCAM-1 and ICAM-1.

PATIENTS AND METHODS

Samples from patients. ST was obtained from five RA patients who fulfilled the revised American Rheumatology Association (ARA) criteria [45]; from five patients with OA, all of whom were rheumatoid factor negative with clinical features of degenerative disease, without articular erosions in X-rays, who underwent total knee or hip joint replacement

surgery; and from five knee synovium fragments from patients with noninflammatory joints who underwent postfracture surgery (controls). Samples were obtained with informed consent and institutional approval. The mean age of RA patients was 34 ± 6 years (mean \pm SEM), of OA patients was 52 ± 7 years and of the noninflammatory controls was 29 ± 3 years, with a mean disease duration of 7 ± 2 and 6 ± 4 years for the first and second groups, respectively. Disease duration for both pathologies was defined as the years that had elapsed since the presentation of the first symptom of the disease (joint pain or arthritis for more than 6 months). Two of the five OA patients were treated with analgesics and the other three with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Two of the five RA patients were receiving methotrexate and the other three nonsteroidal anti-inflammatory drugs only. All RA patients were classified in anatomical stage II. All ST samples were snap-frozen and transported in liquid nitrogen. They were stored at -70°C until sectioned for immunohistochemical procedures or RNA isolation.

RNA isolation. Total RNA from synovial fragments ($0.3\text{--}0.5\text{ cm}^3$) was isolated as described by Chomczynski [46]. Briefly, total RNA was recovered after cell lysis in 2 ml of guanidine isothiocyanate (RNAzolTM; B. Cinna/Biotech, Houston, TX, USA) by chloroform-isopentyl alcohol extraction and ethanol precipitation, followed by DNase I treatment (GIBCO BRL, Grand Island, NY). Enzymes were removed by phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction and RNA was precipitated with ethanol. The ethanol-free RNA pellet was dissolved to a final volume of $20\text{--}50\ \mu\text{l}$ in water. Total RNA was quantified with Fast Check, a nucleic acid quantification system (GIBCO BRL) and concentrations were adjusted to $0.5\text{--}1.0\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Reverse transcription (RT). cDNA was synthesized from each RNA sample in a $20\text{-}\mu\text{l}$ total reaction volume containing $2\text{--}4\ \mu\text{g}$ total RNA. The RNA sample was treated with $5\ \mu\text{g}$ of Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (GIBCO BRL), $10\ \text{mM}$ dithiothreitol, $0.2\ \text{mM}$ dNTPs (GIBCO BRL) and $50\ \text{U}$ Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (GIBCO BRL). After a 60-min incubation at 42°C , samples were heated to 95°C for 5 min and then quickly chilled on ice. The cDNA reaction product was diluted to a final volume of $80\ \mu\text{l}$ with water and $10\ \mu\text{l}$ of this dilution was used for each polymerase chain reaction (PCR).

PCR amplification. For cDNA amplification, $0.2\ \text{mM}$ dNTPs, $30\ \text{nm}$ each of 5' and 3' specific primers (Table 1), and $2.5\ \text{U}$ of *Taq* DNA polymerase (GIBCO BRL) were added to the reaction mixture. Amplification was performed with a thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT, USA) and consisted of: one cycle of 5 min at 94°C for denaturation, 1 min at 57°C for annealing and 1 min at 72°C for elongation; 28 sequential cycles of 1 min at 94°C , 1 min at 57°C and 1 min at 72°C ; and one final cycle of 1 min at 94°C , 1 min at 57°C and 5 min at 72°C .

PCR products were separated by 1% agarose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) gel electrophoresis in $0.5\times$ Tris/Boric acid/EDTA buffer (TBE), containing ethidium bromide, at 80 V for 60 min. Gels were photographed using a Polaroid film (type 665) (Cambridge, MA, USA).

Quantitative PCR. To determine the level of IL-8 or IL-10 mRNA present in the noninflammatory control group and in the OA and the RA samples, total isolated RNA and an internal RNA standard (pQB2 plasmid, a gift from Dr David Shire, Sanofi Elf Bio Recherche, Labège, France) were co-reverse transcribed and co-amplified in the same reaction as the analysed transcripts. This competitive PCR is a sensitive method for quantitative gene expression in small samples of RNA (pg) with the same thermodynamics and amplification efficiency. Briefly, different amounts of a total RNA sample and an identical proportion ($0.020\ \text{pg}$: 50 530 molecules) of the synthetic internal

Table 1. Primer sequences for polymerase chain reaction (PCR) amplification

mRNA	Primers 3'-5'	Primers 5'-3'	Length of the amplified fragment (bp)
β_2 - μ	CCAGCAGAGAATGGAAAGTC	GATGCTGCTTACATGTCTCG	268
IL-1 β	GGATATGGAGCAACAAGTGG	TGTACCAGTTGGGGAAGTC	263
IL-4	TGCCTCCAAGAACAACACTG	AACGTAATCTGGTTGGCTTC	224
IL-6	TCAATGAGGAGACTTGCCTG	GATGAGTTGTCATGTCTCG	260
IL-8	TTGGCAGCCTTCTCTGATT	AACTTCTCCACAACCCTCTG	247
IL-10	AAATTTGGTTCTAGGCCGGG	GAGTACAGGGGCATGATATC	264
TNF- α	ACAAGCCTGTAGCCCATGTT	AAAGTAGACCTGCCAGACT	427
TGF- β 1	TTTCGCCTTAGCGCCCACTG	TCCAGCCGAGGTCCTTGCGG	227

β_2 - μ , β_2 -microglobulin; IL, interleukin; TNF- α , tumour necrosis factor- α ; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1.

standard RNA (srRNA) were reverse transcribed (srRNA consists of a linear array of sequences of upstream primers of multiple target genes, followed by sequences, complementary to their downstream primers, in the same order) [47–51]. cDNA was synthesized in a 20- μ l reaction volume containing 0.5–1 μ g total RNA, 0.015–0.1 μ g srRNA and 5 μ g Oligo(dT)_{12–18}, under the same conditions described above. PCR reactions were carried out in 50- μ l reaction volumes containing: cDNA, specific primers for β_2 -microglobulin (as an external control), IL-8 or IL-10, and Taq DNA polymerase. cDNA was amplified as follows: one cycle of 5 min at 94°C for denaturation, 1 min at 57°C for annealing, 90 s at 72°C for elongation; 33 sequential cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 57°C, 90 s at 72°C; and one cycle of 1 min at 94°C, 1 min at 57°C and 7 min at 72°C.

Amplification products from competitive PCR were analysed by gel electrophoresis and quantification was carried out by densitometric analysis.

The results were expressed as: (the number of mRNA molecules per ng of total ST RNA) per 1×10^5 mRNA molecules of β_2 -microglobulin, as previously described [50].

Histology and immunohistochemical staining. ST biopsies were snap-frozen in liquid nitrogen and cut into 4–6 μ m sections. Serial sections were mounted on γ -methacryloxypropyltrimethoxysilane-coated slides (Sigma Chemical Co.). One frozen section from each biopsy was routinely stained with haematoxylin and the other frozen section was examined after immunohistochemical staining. Briefly, sections were fixed in acetone at –20°C for 3 min. The endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂ in methanol for 10 min and then the cryosections were incubated for 30 min with 1% egg albumin (Sigma Chemical Co.). Tissues were incubated with a rabbit antihuman IL-8 polyclonal IgG (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) or a mouse antihuman IL-10 monoclonal IgG, both at 20 μ g/ml, or with a mouse anti-VCAM-1 or anti-ICAM-1 monoclonal IgG at 25 μ g/ml (Genzyme Corporation, Cambridge, MA), for 60 min at room temperature. Binding was detected by incubating the sections with a kit of goat antirabbit IgG, diluted 1:20, and then with the avidin–biotin peroxidase complex diluted 1:20 for IL-8 detection (Sigma Chemical Co.), or with a kit of goat antimouse IgG and then with the avidin–biotin peroxidase complex diluted according to the manufacturer's instructions for IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 detection (VECTASTAIN Elite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA), for 60 min at room temperature. Immunoreactivity in the sections was detected using a solution of diaminobenzidine tetrahydrochloride (6 mg/ml) in 10 ml of 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, and 10 μ l of

30% H₂O₂, and counterstained with haematoxylin. Finally, sections were dehydrated with alcohol and xylene, and mounted in resin. The negative control reaction was performed by substituting the primary antibody with normal human serum diluted 1:100. The reactive blank was incubated with phosphate buffer saline-egg albumin (Sigma Chemical Co.) instead of the primary antibody. Both controls exclude any nonspecific staining or endogenous enzyme activities. At least two different sections were examined for each ST in all patients in a blind analysis. Cytokine and adhesion molecule expression was assessed by estimating positively staining cells in tissue along one randomly selected field (10 \times), and it was reported as the percentage of immunoreactive cells, as previously described [52].

Statistics. Results were expressed as the mean \pm SEM. Associations between quantifiable variables were determined using the Mann–Whitney *U*-test and the Student's *t*-test. *P*-values of <0.05 were considered as statistically significant.

RESULTS

Histological and immunohistochemical findings

The inflammatory state was determined by histological analysis from a fragment stained with haematoxylin. The degree of inflammation was classified as scarce, moderate or abundant, according to cellularity, and inflammatory infiltrate type as perivascular or interstitial: acute or chronic. Synovial fragments from the noninflammatory control group displayed basal perivascular and/or interstitial cellularity and they were constituted mostly by peripheral blood polymorphonuclear and mononuclear cells, as previously reported [53]. In contrast, OA and RA ST displayed considerable increased vascularity and cellularity; infiltrates varied from moderate to abundant, they were of perivascular and interstitial types, mainly constituted by mononuclear cells; furthermore, giant cells and lymphoid aggregates were observed. No differences in inflammatory infiltrate type or inflammation degree between OA and RA synovial membrane were observed.

The immunohistochemical staining procedure for ICAM-1 was performed on noninflammatory control, OA and RA synovial cryosections. Basal expression levels were observed in the

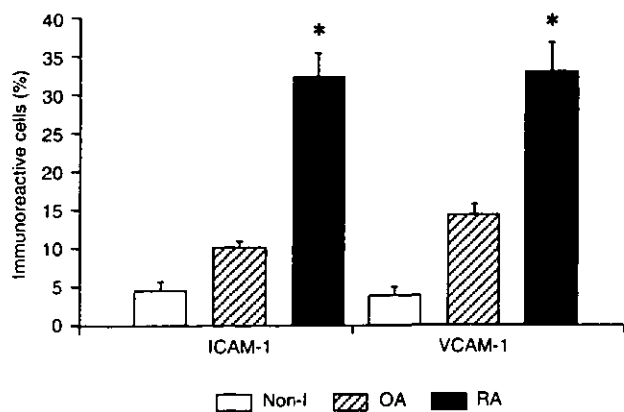


Fig. 1. Adhesion molecule expression in synovial tissue. The percentage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)- and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)-expressing immunoreactive cells was determined in synovial tissue from: Non-I, noninflammatory control group; OA, osteoarthritis patients; and RA, rheumatoid arthritis patients. Adhesion molecule values were compared between Non-I and OA, Non-I and RA, and OA and RA. They were significant for ICAM-1 ($P=0.003$, Non-I versus OA; $P=0.008$, Non-I versus RA; and $P=0.008$, OA versus RA patients), and VCAM-1 ($P=0.001$, Non-I versus OA or Non-I versus RA; and $P=0.002$, OA versus RA patients). Results represent the mean \pm SEM of at least two sections of each tissue from Non-I ($n=5$), OA ($n=5$) and RA ($n=5$) patients.

noninflammatory control group. A twofold increased amount of immunoreactive cells was found in the OA group. However, the highest increase was detected in the RA group (Fig. 1). Morphologically, the most commonly immunostained cells were macrophages, endothelial cells and fibroblasts. Statistically significant differences in the expression of this adhesion molecule were established when the noninflammatory or OA groups were compared with the RA group ($P=0.008$).

The same expression pattern was observed in cells immunoreactive to VCAM-1, where a higher expression level was also determined in RA ST compared with the OA group ($P=0.002$), and the lowest levels of VCAM-1 were obtained in the noninflammatory control group ($P=0.001$, RA versus the noninflammatory group) (Fig. 1).

Cytokine gene expression

The cytokine transcript profile (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF- α and TGF- β 1) was evaluated in all samples by RT-PCR. The results revealed variations in mRNA expression among the noninflammatory control and the OA and RA groups. mRNA for IL-4 and IL-13 were not detected in any of the different groups of ST analysed. However, most of the IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α and TGF- β 1 transcripts were found in RA and OA ST (Fig. 2). mRNA for IL-8 was detected in one of five (20%) and in four of five (80%) of the samples from OA and RA groups. However, it was undetectable in the noninflammatory group. Meanwhile, IL-10 was found in four of five (80%) of the noninflammatory and OA samples, and in all ST from RA patients (100%). The cytokine gene expression profile of RA and OA patients is shown in Table 2.

Quantitative PCR

IL-8 and IL-10 mRNA were measured in the noninflammatory control group and in the OA and RA groups by a competitive PCR technique. Normalization of the results were achieved by an independent amplification of a control or housekeeping gene, such as β_2 -microglobulin [39]. IL-8 transcripts were not detected in the noninflammatory group and were almost undetectable in the OA group, whereas an increased amount of this chemokine was observed in RA synovium ($P=0.014$) (Fig. 3A). However, IL-10 transcript expression was similar in the OA and RA groups, while it was scarce in the noninflammatory group. Nevertheless, statistical analysis did not indicate any significant difference between OA and RA ST because of the high variability (Fig. 3B).

IL-8 and IL-10 immunoperoxidase staining

The presence of IL-8 and IL-10 proteins in ST was determined in this study by an immunohistochemical assay. Results showed that IL-8 (Fig. 3C) and IL-10 (Fig. 3D) were synthesized at significantly higher levels in RA patients than in OA and noninflammatory control groups (IL-8, $P=0.003$ and $P=0.004$, respectively, and IL-10, $P=0.03$ and $P=0.02$, respectively). IL-8 production was undetectable in the noninflammatory control

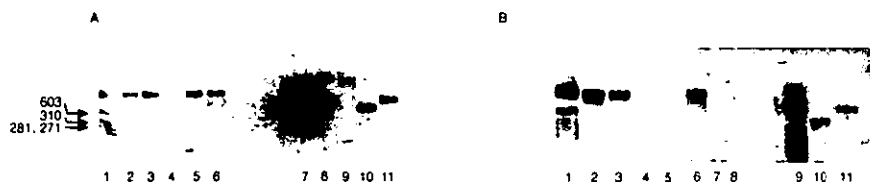


Fig. 2. Cytokine gene expression profile of representative rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) patients. (A) Polymerase chain reaction (PCR) products from RA synovial tissue (ST) in a 1% agarose gel containing ethidium bromide. This panel shows the profile of a selected RA patient who is positive to β_2 -microglobulin (lane 2), interleukin (IL)-1 β (lane 3), IL-6 (lane 5), IL-8 (lane 6), IL-10 (lane 8), tumour necrosis factor- α (TNF- α) (lane 10) and transforming growth factor- β (TGF- β) (lane 11), and negative to IL-4 (lane 4) and IL-13 (lane 9). Lanes 1 and 7, ϕ X174 DNA digested with *Hae*III. (B) PCR products from OA ST in a 1% agarose gel containing ethidium bromide. This panel shows the profile of a selected OA patient who is positive to β_2 -microglobulin (lane 2), IL-1 β (lane 3), IL-6 (lane 5), IL-8 (lane 6), IL-10 (lane 7), TNF- α (lane 10) and TGF- β (lane 11), and negative to IL-4 (lane 4) and IL-13 (lane 8). Lanes 1 and 9, ϕ X174 DNA digested with *Hae*III.

Table 2. Synovial tissue (ST) cytokine gene profile

Group	β_2 - μ	IL-1 β	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IL-13	TNF- α	TGF- β 1
Non-I (n = 5)	5	2	0	5	0	4	0	1	4
OA (n = 5)	5	2	0	4	1	4	0	1	5
RA (n = 5)	5	3	0	2	4	5	0	3	5

β_2 - μ , β_2 -microglobulin; IL, interleukin; n, total number of patients; Non-I, non-inflammatory control group; OA, osteoarthritis group; RA, rheumatoid arthritis group; TGF- β 1, transforming growth factor β 1; TNF- α , tumour necrosis factor- α . Numbers represent the samples expressing the mRNA.

samples, while basal expression levels of IL-10 were observed in this group. Furthermore, cells expressing IL-10 were morphologically identified as macrophages and lymphocytes.

DISCUSSION

The present study analysed the differences in adhesion molecule

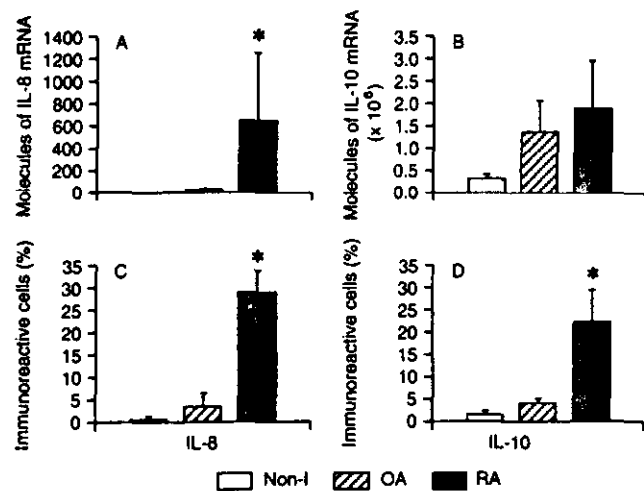


Fig. 3. Synovial tissue transcripts, quantification and cytokine expression in synovial tissue. Non-I, non-inflammatory control group; OA, osteoarthritis patients; RA, rheumatoid arthritis patients. (A) This panel represents the number of molecules of interleukin (IL)-8 mRNA per 1×10^5 molecules of β_2 -microglobulin mRNA ($P = 0.014$, OA or Non-I versus RA patients). (B) This panel represents the number of molecules of IL-10 mRNA per 1×10^5 molecules of β_2 -microglobulin mRNA. Values represent the average \pm SEM. (C) The percentage of IL-8-expressing immunoreactive cells was determined in Non-I, OA and RA groups. IL-8 values were compared between groups and they were significantly different ($P = 0.003$, OA versus RA patients and $P = 0.004$ Non-I versus RA patients). (D) The percentage of IL-10-expressing immunoreactive cells was determined in Non-I, OA and RA groups. IL-10 values were compared between groups and they were significantly different ($P = 0.03$, OA versus RA patients and $P = 0.02$, Non-I versus RA patients). Results represent the mean \pm SEM of at least two sections of each tissue from Non-I ($n = 5$), OA ($n = 5$) and RA ($n = 5$) patients.

and pro- and anti-inflammatory cytokine expression in non-inflammatory joints, and in OA and RA ST samples. IL-8 and IL-10 proteins and adhesion molecule expression in ST were associated with chronic inflammatory infiltrates. The inflammatory ST state was determined by histological analysis and the results were in accordance with the observed overexpression of ICAM-1 and VCAM-1, where increased RA and OA ST adhesiveness may promote interactions with infiltrating inflammatory cells, contributing to the accumulation of leucocytes in the joint tissue [32, 37, 38, 54]. In fact, it is well known that ICAM-1 and VCAM-1 are overexpressed in synovial membrane after stimulation with proinflammatory cytokines such as IL-1 β and/or TNF- α , or IL-6 [31, 35, 55–57]. The data obtained in this study have shown that ICAM-1 and VCAM-1 expression was greater in RA synovium than in OA ST. These results suggest that first, despite significantly higher expression of adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1) in RA compared with OA ST, their ligands in inflammatory cells ($\alpha_1\beta_2$ and $\alpha_4\beta_1$, respectively) may not be overexpressed because they are regulated by other cytokines, such as TGF- β 1; may be absent or inactivated [36, 38]. Probably because of this we could not observe differences in size and type of inflammatory infiltrates in RA ST compared with OA ST. Second, synovial membrane from RA was probably differentially stimulated by overexpressed proinflammatory cytokines than OA synovial tissue, although cytokine gene expression was similar between OA and RA groups. However, differences in the concentration of proinflammatory cytokines may be found. Thus, these data may be directly related to other investigations that have described an imbalance in the expression of collagenase and stromelysin mRNA, as well as the tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) [58, 59], in RA synovial cells (inducible by proinflammatory cytokines such as IL-1, TNF- α , GM-CSF, etc.) [60, 61]. They have suggested that a disturbed balance between both proteases and TIMP is crucial for rheumatoid joint destruction. Accordingly, it has been demonstrated that OA ST produces less metalloproteinase and more TIMP than RA tissue [59, 62]. These data support the hypothesis that OA and RA ST seem to express the same cytokine profile, but each cytokine may be expressed in different quantities and its combination may produce different effects.

IL-4 and IL-13 gene expression was not detected in either RA or OA ST. This contrasts with the findings of Woods *et al.*, which indicate that RA ST expresses low levels of IL-13 transcripts [44]. However, we rejected a possible methodological problem because IL-4 and IL-13 mRNA were detected in RA and OA peripheral blood mononuclear cells (data not shown), and β_2 -microglobulin amplification was used as an internal positive control.

On the other hand, a quantitative analysis of IL-8 and IL-10 gene expression was performed using the competitive PCR technique, unlike previously published studies in which transcripts were only semiquantified [12, 25]. IL-8 and IL-10 mRNA expression showed important differences between RA and OA patients. IL-8 mRNA was expressed in higher levels in ST from RA patients than in ST from the OA and noninflammatory control groups. These results enrich those of Firestein *et al.* because they found a lower gene expression of IL-6 by ST cells from RA compared with OA [25]. In contrast, IL-10 transcripts were present in the ST from the three groups, although more abundantly in RA patients. Hence, some of the differences between cytokine production in OA and chronic inflammatory arthritis seem to be quantitative instead of qualitative.

These data correlate with a more intense staining and a greater number of immunoreactive cells treated with IL-8 and IL-10 antibodies in RA ST compared with OA ST. As in RA the absolute number of cells producing IL-10 and IL-8 seems to be important. Thus, the synovium might produce a similar cytokine profile in both diseases, but the much greater size of the hyperplastic RA synovium and higher vascularity results in higher local concentration of these cytokines. However, it is important to note that there is a certain level of IL-8 reactive cells in OA patients but they express minimal IL-8 mRNA (Fig. 3A,C). On the other hand, the number of immunoreactive cells to IL-8 and IL-10 in RA and OA ST are of the same magnitude (Fig. 3C,D). However, the quantitative PCR (Fig. 3A,B) shows a difference in magnitude. This could be explained by the fact that there may be some differences in the stability of mRNAs in the cytoplasm, differences in the regulation of mRNAs at the transcriptional, post-transcriptional, translational and post-translational level, and differences in the transcription rate or the efficiency of translation [63].

Finally, the differential cytokine and adhesion molecule over-expression, determined in this study, allow the possibility that the RA ST is partially responsible for the cytokines synthesized in the joint during the triggering and perpetuation of the inflammatory process. The IL-8 and IL-10 abundance may be particular to this pathology, which is characterized by chronic inflammation.

The results obtained suggest that the differences in IL-8 and IL-10 production, and in adhesion molecule expression in chronic RA and OA, are basically quantitative rather than qualitative. The similar cytokine profile of RA and OA suggests that no single cytokine is particularly responsible for a single disease.

Hence, this study describes in a quantitative manner, differences in cytokine and adhesion molecule production by RA and

OA ST. However, future studies should emphasize in cytokines their receptors and the concomitant estimation of cytokine inhibitors.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Dr Virgilio Hernández Cuevas and Dr Luis Fernando Carrasco Minchaca for providing many of the clinical specimens used in this study; Yvonne Richaud-Patin, BSc, for technical assistance; Dr David Shire, of Sanofi Elf Bio Recherche Lbg, France, for the pQB2 plasmid; Dr Antonio Villa for statistical analysis; Edgar Krötzsch, PhD, for his critical review of the manuscript; and Ana Luisa Weckmann, MSc, for correcting the English version of this manuscript.

REFERENCES

- 1 Keyszer GM, Heer AH, Gay S. Cytokines and oncogenes in cellular interactions of rheumatoid arthritis. *Stem Cells* 1994;12:75–86.
- 2 Lindblad S, Hedfors E. Arthroscopic and immunohistologic characterization of knee joint synovitis in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1987;30:1081–8.
- 3 Revel PA, Mayston V, Lalor P, Mapp P. The synovial membrane in osteoarthritis: a histologic study including the characterization of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. *Ann Rheum Dis* 1988;47:300–7.
- 4 Smith MD, Triantafyllou S, Parker A, Youssef PP, Coleman M. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *J Rheumatol* 1997;24:365–71.
- 5 Walker ER, Boyd RD, Wu DD, Lukoschek M, Burr D, Radin EL. Morphologic and morphometric changes in synovial membrane associated with mechanically induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1991;34:515–24.
- 6 Seitz M, Dewald B, Gerber N, Baggiolini M. Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1991;87:463–9.
- 7 Akahoshi T, Wada C, Endo H *et al.* Expression of monocyte chemotactic and activating factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:762–71.
- 8 Rathanaswami P, Hachicha M, Wong WL, Schall TJ, McColl SR. Synergistic effect of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on interleukin-8 gene expression in synovial fibroblasts. Evidence that interleukin-8 is the major neutrophil-activation chemokine released in response to monokine activation. *Arthritis Rheum* 1993;36:1295–304.
- 9 Hosaka S, Akaoshi T, Wada C, Kondo H. Expression of the chemokine superfamily in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 1994;97:451–7.
- 10 Al-Mughales J, Blyth TH, Hunter JA, Wilkinson PC. The chemottractant activity of rheumatoid synovial fluid for human lymphocytes is due to multiple cytokines. *Clin Exp Immunol* 1996;106:230–6.
- 11 Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Cytokine expression in chronic inflammatory disease. *Br Med Bull* 1995;51:368–84.
- 12 Chen E, Keystone EC, Fish EN. Restricted cytokine expression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:901–10.
- 13 Cush J, Splawski JB, Thomass R *et al.* Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:96–104.

- 14 Dinarello CA, Wolf SM. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 1993;328:106-33.
- 15 Mizushima N, Kohsaka H, Miyasaka N. Ceramide, a mediator of interleukin 1, tumour necrosis factor α , as well as Fas receptor signalling, induces apoptosis of rheumatoid arthritis synovial cells. *Ann Rheum Dis* 1998;57:495-9.
- 16 Bucale R, Ritchlin C, Winchester R, Cerami A. Constitutive production of inflammatory and mitogenic cytokines by rheumatoid synovial fibroblasts. *J Exp Med* 1991;173:569-74.
- 17 Manicourt DH, Trnki R, Fukuda K, Devogelaer JP, Nagant de Deuchaisnes C, Thonar EJMA. Levels of circulating tumor necrosis factor α and interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:490-9.
- 18 Miossec P, Navilair M, Dupuy D'Angeac A, Sany J, Banchereau J. Low levels of interleukin-4 and high levels of transforming growth factor β in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* 1990;33:305-15.
- 19 Sack U, Kinne RW, Marx T, Heppt P, Bender S, Emrich F. Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 1993;13:45-51.
- 20 Volin MV, Shah MR, Tokuhira M, Haines GK III, Woods JM, Koch AE. RANTES expression and contribution to monocyte chemotaxis in arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;89:44-53.
- 21 Kahle P, Saal G, Schaudt K, Zacherl Fritz P, Pawelec G. Determination of cytokines in synovial fluids: Correlation with diagnosis and histomorphological characteristics of synovial tissue. *Ann Rheum Dis* 1992;51:731-4.
- 22 Berse B, Hunt JA, Diegel RJ *et al.* Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF- β) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 1999;115:176-82.
- 23 Katsikis PD, Chu CQ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1994;179:1517-27.
- 24 Farahat N, Yanni G, Poston R, Panayi G. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1993;52:870-5.
- 25 Firestein GS, Alvaro-García JM, Maki R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1990;144:3347-53.
- 26 Holt Y, Cooper RG, Meager A, Hopkins J. Cytokine inter-relationships and their association with disease activity in arthritis. *Br J Rheum* 1992;31:725-33.
- 27 Wang P, We P, Siegel M, Egan RW, Billa M. IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 1994;153:811-6.
- 28 De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H *et al.* Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991;174:915-24.
- 29 Joyce DA, Gibbons DP, Green P, Steer JH, Feldmann M, Brennan FM. Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. *Eur J Immunol* 1994;24:2699-705.
- 30 De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, De Vries J. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-20.
- 31 Lindsley HB, Smith DD, Cobick CB, Koch AE, Davis LS. Pro-inflammatory cytokines enhance human synovial cell expression of functional intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Clin Immunol Immunopathol* 1993;68:311-20.
- 32 Tak PP, Thirkow EW, Doha MR *et al.* Expression of adhesion molecules in early rheumatoid synovial tissue. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;77:236-42.
- 33 Nikkari L, Haapasalmi K, Aho H *et al.* Localization of the α , subfamily of integrins and their putative ligands in synovial lining cell layer. *J Rheumatol* 1995;22:16-23.
- 34 El-Gabalawy H, Canvin J, Gouping M *et al.* Synovial distribution of α_v /CD18, a novel leukointegrin. *Arthritis Rheum* 1996;39:1913-21.
- 35 Paleolog EM, Hunt M, Elliott MJ, Feldmann M, Maini RN, Woody JN. Deactivation of vascular endothelium by monoclonal anti-tumor necrosis factor α antibody in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39:1082-91.
- 36 Rinaldi N, Schwarz-Eywill M, Weis D *et al.* Increased expression of integrins on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis *in vitro* correlates with enhanced binding to extracellular matrix proteins. *Ann Rheum Dis* 1997;56:45-51.
- 37 Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993;11:767-804.
- 38 Rosales C, Juliano LR. Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes. *J Leukocyte Biol* 1995;57:189-98.
- 39 Minty A, Derocq JM, Dumont X *et al.* Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* 1993;362:248-50.
- 40 McKenzie ANJ, Culppepper JA, De Waal Malefyt R *et al.* Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3735-9.
- 41 Zurawski G, De Vries JE. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today* 1994;15:19-26.
- 42 Hart PH, Ahren MJ, Smith MD, Finla Y, Jones JJ. Regulatory effects of IL-13 on synovial fluid macrophages and blood monocytes from patients with inflammatory arthritis. *Clin Exp Immunol* 1995;99:331-7.
- 43 Isomäki P, Luukkainen R, Toivanen P, Punnonen J. The presence of interleukin-13 in rheumatoid synovium and its anti-inflammatory effects on synovial fluid macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39:1693-702.
- 44 Woods JM, Haines GK, Shah MR, Rayan G, Koch AE. Low-level production of interleukin-13 in synovial fluid and tissue from patients with arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;85:210-20.
- 45 Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA *et al.* The American rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
- 46 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
- 47 Becker-André M, Hahlbrock K. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucl Acids Res* 1989;17:9437-47.
- 48 Bouabouia M, Legoux P, Pessèguè B. Standardization of mRNA titration using a polymerase chain reaction method involving co-amplification with a multispecific internal control. *J Biol Chem* 1992;267:21830-8.

- 49 Chelly J, Montarras D, Pinset C, Berwald-Netter Y, Kaplan J-C, Kahn A. Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction. Application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells. *Eur J Biochem* 1990;187:691-8.
- 50 Lorente L, Richaud-Patin Y, Alcocer-Castillejos N *et al*. Cytokine gene expression in cirrhotic and non-cirrhotic human liver. *J Hepatol* 1996;24:555-63.
- 51 Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9717-21.
- 52 Krötzsch-Gómez FE, Furuzawa-Carballeda J, Reyes-Márquez R, Quiróz-Hernández E, de Díaz León L. Cytokine expression is downregulated by collagen-polyvinylpyrrolidone in hypertrophic scars. *J Invest Dermatol* 1998;111:828-34.
- 53 Lindblad S, Hedfors E. The synovial membrane of healthy individuals - immunohistochemical overlap with synovitis. *Clin Exp Immunol* 1987;69:41-7.
- 54 Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 1990;4:2868-80.
- 55 Gerritsen ME, Kelley KA, Ligon G *et al*. Regulation of the expression of intercellular adhesion molecule 1 in cultured human endothelial cells derived from rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1993;36:593-602.
- 56 Szekanecz Z, Haines GK, Lin TR *et al*. Differential distribution of intercellular adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-2, and ICAM-3) and the MS-1 antigen in normal and diseased human synovia. Their possible pathogenetic and clinical significance in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:221-31.
- 57 Iademarco MF, Barks JL, Dean DC. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 expression by IL-4 and TNF- α in cultured endothelial cells. *J Clin Invest* 1995;95:264-71.
- 58 Gravallese EM, Darling JM, Ladd AL, Katz JN, Glimcher LH. *In situ* hybridization studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1991;34:1076-84.
- 59 McCachren SS. Expression of metalloproteinases and metalloproteinase inhibitor in human arthritic synovium. *Arthritis Rheum* 1991;34:1085-93.
- 60 DiBattista JA, Pelletier J-P, Zafarullah M, Fujimoto N, Obata K-I, Martel-Pelletier J. Coordinate regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in human synovial fibroblasts. *J Rheumatol* 1995;22 (Suppl. 43):123-8.
- 61 West-Mays JA, Strissel KJ, Sadow PM, Fini ME. Competence for collagenase gene expression by tissue fibroblasts requires activation of and interleukin 1 α autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:6768-72.
- 62 Firestein GS, Paine MM, Littman BH. Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase, and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. *Arthritis Rheum* 1991;34:1094-104.
- 63 Farrell RE. Messenger RNA. In: Farrell RE Jr, ed. *RNA Methodologies*. San Diego CA: Academic press Inc., 1993:25-6.

Collagen-PVP Decreases Collagen Turnover in Synovial Tissue Cultures from Rheumatoid Arthritis Patients

J. FURUZAWA-CARBALLEDA,^{a,b} J. ALCOCER-VARELA,^c
AND L. DÍAZ DE LEÓN^a

^a*Department of Cellular Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas,
U.N.A.M. Ciudad Universitaria, P.O. Box 70228, Mexico City 04510, Mexico*

^c*Department of Immunology and Rheumatology,
Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán,
Vasco de Quiroga 15, CP 14000, Mexico City, Mexico*

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic disorder. Affected joints exhibit inflammation, abnormal immune response, and synovial hyperplasia. The perpetuation of the inflammatory process is mediated by the increased expression of cell adhesion molecules (CAM), such as members of the selectin (ELAM-1) and integrin families (α_{1-6} , α_d , β_{1-4} , etc.), and of the immunoglobulin gene superfamily (ICAM-1 and VCAM-1), prior to activation by proinflammatory cytokines.¹ CAM regulate cartilage and bone destruction favoring cellular influx that (concomitantly) overexpress matrix metalloproteinases (MMPs). MMPs are secreted by cells in an inactive form, and they are activated in the extracellular space by the action of other proteinases. The regulation of these enzymes is tightly controlled via cytokines and interactions with tissue inhibitors of the metalloproteinases (TIMPs).² Our aim was to evaluate total collagen content, the relative percentage of types I and III collagen, calcium-dependent and -independent collagenolytic activity, as well as TIMP-1 and adhesion molecule expression in synovial tissue (ST) cultures treated with a γ -irradiated mixture of pepsinized porcine type I collagen and polyvinylpyrrolidone (collagen-PVP). This biocompound has been shown to improve skin wound repair and bone fractures in rats.³ Also, intralesional injection of collagen-PVP in hypertrophic scars diminished pruritus, pain, erythema, volume, inflammatory infiltrates; and improved tissue architecture. Moreover, the biodrug has been demonstrated to modulate extracellular matrix turnover, mainly types I and III collagen, and to downregulate the expression level of IL-1 β , TNF- α , PDGF, and VCAM-1.⁴ Besides, intradermal administration of collagen-PVP to scleroderma lesions has been shown to improve skin texture, appearance, and tissue architecture and to downmodulate IL-1 β and ELAM-1 expressions.⁵ Collagen-PVP has the advantage of being a biologic drug with minimal risks, because no side effects have been determined in healthy volunteers and hypertrophic scar patients treated for long periods with the biodrug. This was evaluated by clinical and laboratory tests. Based on the above-mentioned observations, this study included five RA patients with mean

^bCorresponding author. Address for telecommunication: Phone, 525/6 22 38 19; fax, 525/6 22 38 97; e-mail, furuzawa@servidor.unam.mx

age of 41.0 ± 17.0 years and a mean disease duration of 9.6 ± 5.1 years. All of them fulfilled the American College of Rheumatology criteria for the diagnosis of RA. Disease-modifying antirheumatic drugs and nonsteroidal antiinflammatory drugs were prescribed for all patients before total knee joint replacement surgery. ST fragments of approximately $3\text{--}5\text{ mm}^3$ were obtained and incubated during 7 days with $500\ \mu\text{l}$ of RPMI-1640 with 10% FCS and with or without 1% collagen-PVP (Fibroquel). Supernatants and ST were collected after 3 and 7 days of culture. Total collagen content from ST was quantified by colorimetric reaction of the Woessner micromethod,⁶ and the results were normalized by μg of DNA. The relative percentage of types I and III collagen was evaluated from cultured ST. Duplicate samples were analyzed by interrupted gel electrophoresis and densitometric analysis. Calcium-dependent and -independent collagenolytic activity was measured in the supernatants of tissue cultures by a biochemical assay, determining the degradation of rat N-[propionate-2,3-³H]-labeled type I collagen in CaCl_2 or EDTA buffer, and the results were normalized by μg of DNA. Supernatant concentration of TIMP-1 was assessed by one-step sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system, according to the manufacturer's instructions (Amersham, UK). Immunohistochemical procedures to detect ICAM-1 and VCAM-1 were carried out according to Krötzsch-Gómez *et al.*⁴ Adhesion molecule expression was assessed by estimating positively staining cells in blood vessels and mesenchyma, and it was reported as the percentage of immunoreactive cells. All experiments were performed at least in duplicate. Statistical analysis was performed by paired Student *t*-test. Data were expressed as the mean \pm SEM (standard error of the mean); $p < 0.05$ was considered significant. Histological data indicated that rheumatoid synovium from control cultures presented a variable content of inflammatory cells and fibrosis. ST *in vitro* treatment with 1% collagen-PVP diminished inflammatory infiltrates and increased type III collagen (data not shown). Densitometric analysis of interrupted gel electrophoresis showed a two-fold increase of type III collagen in treated synovium, in a time-dependent fashion versus control cultures ($p = 0.001$, treated compared to untreated cultures; FIG. 1a). However, treated ST did not display changes in total collagen content compared to control cultures, except at 3 days of culture ($p = 0.02$; FIG. 1b). On the other hand, calcium-dependent collagenolytic activity in supernatants from ST-treated cultures exhibited slightly lower levels compared to untreated supernatants, but they were not statistically significant (FIG. 1c). In contrast, calcium-independent collagenolytic activity from treated cultures diminished in a time-dependent manner at statistically significant levels compared to untreated cultures ($p = 0.02$ and $p = 0.04$ for 3 and 7 days of culture, respectively, treated versus untreated; FIG. 1d). TIMP-1 levels were threefold lower in ST supernatants from the collagen-PVP treated group than in those from control samples. Values were statistically significant at 7 days of culture ($p = 0.03$, treated versus untreated cultures; FIG. 1e). ICAM-1 and VCAM-1 were detected in ST in both blood vessels and spread cells. Significant differences between control and treated groups were found, where ST collagen-PVP treated cultures downregulated ICAM-1 and VCAM-1 expression. Values were statistically significant in blood vessel cells (ICAM-1, $p = 0.04$ at 7 days of culture and VCAM-1, $p = 0.05$ and $p = 0.01$ at 3 and 7 days of culture respectively, treated versus untreated cultures; FIGS. 2a and b). Also, spread cells exhibited the same pattern as blood vessel cells (ICAM-1, $p = 0.03$ and VCAM-1,

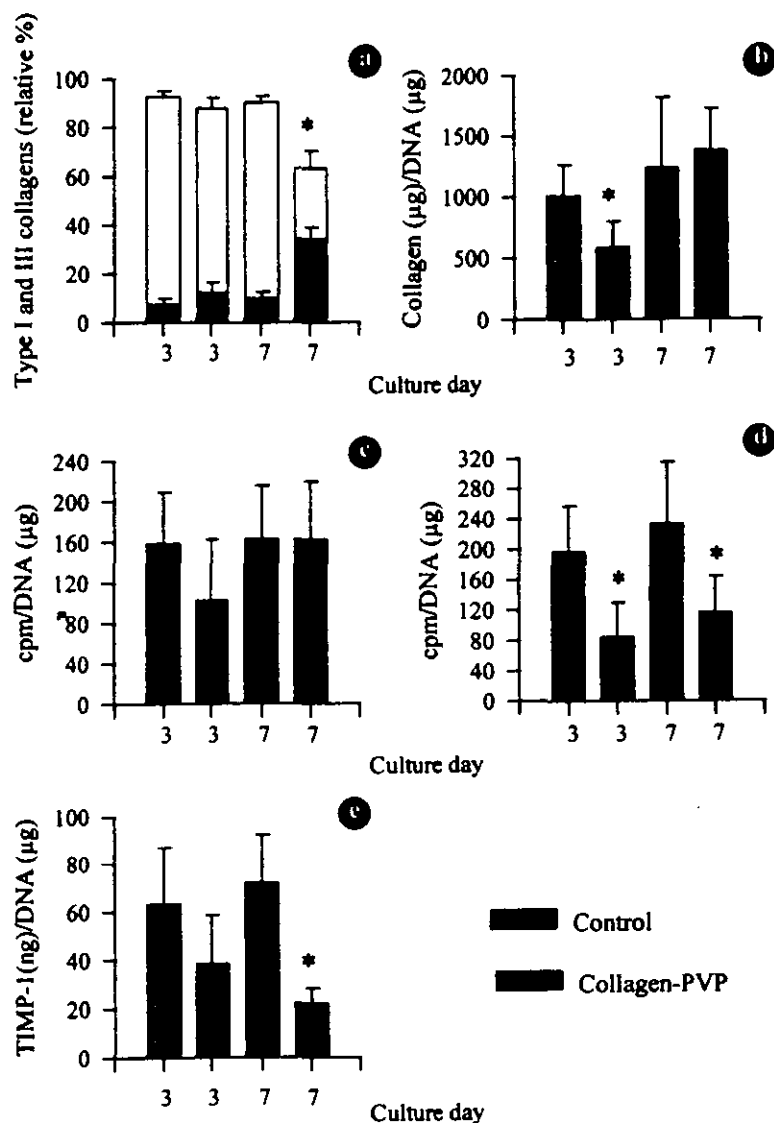


FIGURE 1. Collagen-PVP effect on collagen turnover in ST cultures. (a) Types I and III collagen relative percentage. Homogenates from ST were treated with pepsin for 72 hr and then dialyzed in 5 mM acetic acid. Twenty μ l of ST homogenates were applied in a 0.1% SDS, 7.5% polyacrylamide gel. Gel electrophoresis was interrupted in the middle, then 5 μ l of 5% β -mercaptoethanol solution was applied. Gel was incubated for 15 min, and then the system was switched on. Gel was stained for proteins with silver nitrate, and densitometric analysis was performed. Differences between control and biodrug-treated groups were observed at 7 days of culture ($*p = 0.001$). *Open bars* represent type I collagen percentage, *hatched bars* represent type III collagen in control cultures, and *solid bars* represent type III collagen in treated cultures. (b) Total collagen content in ST cultures with or without 1% collagen-PVP treatment. Collagen concentration was measured by colorimetric reaction in acid hydrolyzates to determine hydroxiprolin content. Comparison between control and treated cultures showed differences at 3 days of culture with $*p = 0.02$. (c) Calcium-dependent collagenolytic activity. To measure the degradation of rat N-[propionate-2,3- 3 H]-labeled type I collagen, the former was incubated with 140 μ l of supernatants from 3 and 7 days of culture and 5 mM CaCl_2 buffer, pH 7.4, for 24 hr at 35°C, in a total volume of 500 μ l. Reaction was stopped by the addition of 50 μ l of 80 mM *o*-phenantroline and incubated for 30 minutes. Then proteins were precipitated with 500 μ l of 1,4-dioxan, and the tubes were centrifuged.

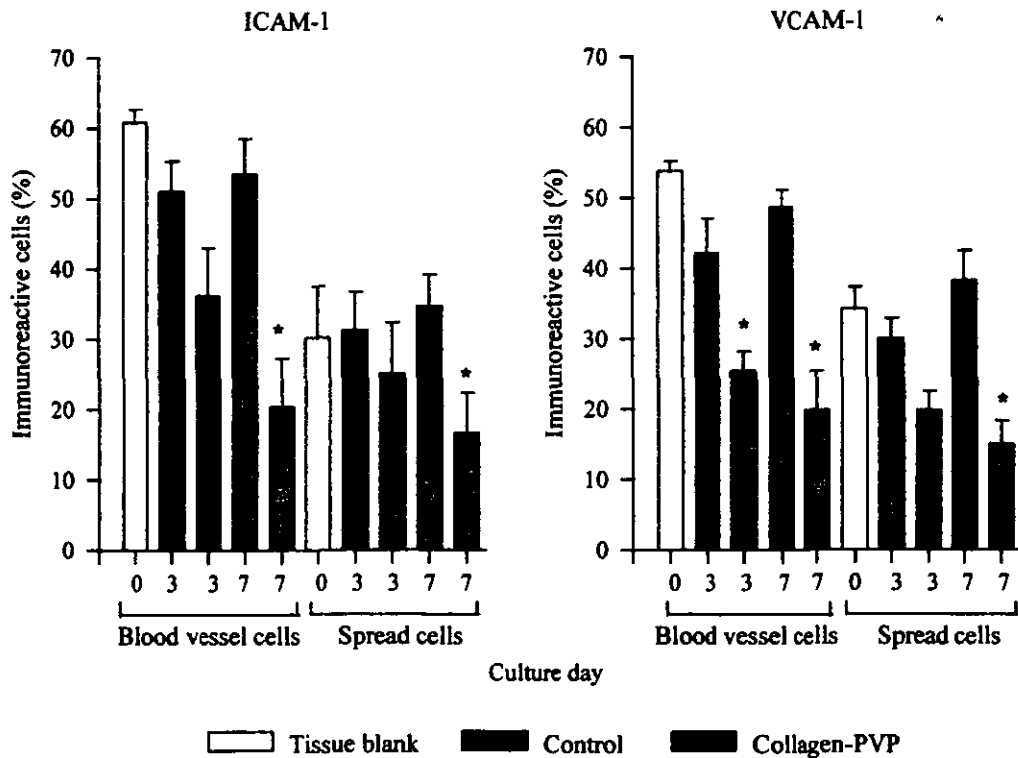


FIGURE 2. Collagen-PVP effect on ICAM-1 and VCAM-1 expression in ST culture. The percentage of adhesion molecule-expressing immunoreactive cells was determined in blood vessels and spread cells of ST cultures with or without 1% collagen-PVP treatment during 7 days, (a) ICAM-1 values were different in blood vessels and spread cells between treated and control cultures, with the following statistical levels: blood vessel cells, $*p = 0.04$ at 7 days of culture; spread cells, $*p = 0.03$ at 7 days of culture. (b) VCAM-1 values in blood vessels: $*p = 0.05$ and $*p = 0.01$ at 3 and 7 days of culture, respectively. In spread cells, $*p = 0.03$ at 7 days of culture. Results represent the mean \pm SEM of at least two tissue sections from each patient.

FIGURE 1/continued. Radioactivity in 150 μ l of each supernatant was measured in a liquid scintillation counter. (d) Calcium-independent collagenolytic activity. Measurement was performed as described above, but 10 mM EDTA buffer was added instead of 5 mM CaCl_2 buffer. Collagen-PVP treated groups were compared with untreated controls, these data were statistically significant with $*p = 0.02$ for 3 days of culture and $*p = 0.04$ for 7 days of culture. (e) TIMP-1 production in ST cultures with or without collagen-PVP treatment. The levels (ng/DNA μ g) were measured in supernatants of cultures diluted 1:5 to 1:20. TIMP-1 expression in biodrug-treated cultures was significantly lower relative to that in control cultures ($*p = 0.03$ at 7 days of culture, treated versus untreated cultures). Results represent the mean \pm SEM of at least two tissue fragments from each patient.

$p = 0.03$ at 7 days of culture, treated versus untreated control cultures; FIGS. 2a and b). Based on these results, we suggest that collagen-PVP modulates collagen turnover, since it decreases collagenolytic activity, as well as TIMP-1 production and increases the amount of type III collagen similar to levels observed in healthy ST controls (data not shown). Possibly the chronic inflammatory process is altered by collagen-PVP action, due to ICAM-1 and VCAM-1 downmodulation. This may be related to the downregulation of IL-1 and TNF- α , since both proinflammatory cytokines are capable of inducing proliferation and migration of synovial cells via CAM,¹ as well as of inducing the expression and activation of collagenolytic enzymes.² This correlates with previous data in hypertrophic scars and scleroderma lesions treated with the biodrug, where these proinflammatory cytokines and adhesion molecules diminished with treatment.⁴ In conclusion, collagen-PVP induces a downmodulation but not an inhibition of inflammatory parameters and probably allows a gradual and better recovery of homeostasis in ST of RA patients.

ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge Dr. Edgar Krötzsch for his critical review; Alejandro Quintana Díaz, B.Sc., for technical assistance; and Ana Luisa Weckmann, M.Sc., for correcting the English version of the manuscript. This work was partially supported by Grants LDL-94 provided by ÁSPID S.A. de C.V., PADEP 030308 and 030352 (UNAM), and PUIS (UNAM).

REFERENCES

1. PALEOLOG, E.M., M. HUNT *et al.* 1996. Deactivation of vascular endothelium by monoclonal anti-tumor necrosis factor α antibody in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **39**: 1082-1091.
2. BRENNAN, F.M., K.A. BROWNE *et al.* 1997. Reduction of serum MMP-1 and MMP-3 in rheumatoid arthritis patients following anti-tumour necrosis factor- α (cA2) therapy. *Br. J. Rheumatol.* **36**: 643-650.
3. ALMAZÁN DIAZ, A., J.C. DE LA CRUZ GARCIA *et al.* 1996. Investigación experimental de la regeneración ósea en fémures de rata después de la aplicación de colágena I polimerizada: estudio radiológico, histológico e histoquímico. *Rev. Mex. Ortop. Traum.* **10**: 142-152.
4. KRÖTZSCH-GÓMEZ, F.E., J. FURUZAWA-CARBALLEDA *et al.* 1998. Cytokine expression is downregulated by collagen-polyvinylpyrrolidone in hypertrophic scars. *J. Invest. Dermatol.* **111**: 828-834.
5. BARILE, L., J. FURUZAWA-CARBALLEDA *et al.* 1998. Comparative study of collagen-polyvinylpyrrolidone vs. triamcinolone acetate in systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **16**: 370.
6. WOESSNER, J.F. 1961. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this iminoacid. *Arch. Biochem. Biophys.* **93**: 440-447.