

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

**CARACTERÍSTICAS PROLIFERATIVAS, ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS DE LA
COLÁGENA, EXPRESIÓN DE LAS METALOPROTEASAS E INHIBIDORES DE LAS
METALOPROTEASAS EN LOS CULTIVOS PRIMARIOS Y EN SUS CLONAS OBTENIDAS DE
FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON ESCLEROSIS GENERALIZADA PROGRESIVA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:

CAMILO SEBASTIÁN ZURITA SALINAS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JORGE ALCOCER VARELA

MÉXICO D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO
BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. JORGE ALCOCER VARELA
EN EL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA
DEL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN Y LA
CO-DIRECCIÓN DEL DR. LINO DÍAZ DE LEÓN +
EN EL LABORATORIO DEL TEJIDO CONJUNTIVO
DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR
DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

A Alejandro Sebastián

A Gonzalo Camilo

A Marilú

A mis papis: Gonzalo y Elsa

XI. AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Alcocer-Varela. Departamento de Inmunología y Reumatología. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Al Dr. Lino Díaz de León. Laboratorio del Tejido Conjuntivo. Departamento de Biología Celular. Instituto de Investigaciones de Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Luis Llorente. Departamento de Inmunología y Reumatología. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Al Dr. Rolando Hernández. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

A la QFB Susana Bahena. Departamento de Inmunología y Reumatología. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Al Dr. Javier Cabiedes. Departamento de Inmunología y Reumatología. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

A la QBP Araceli Martínez. Departamento de Inmunología y Reumatología. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

A la QC Yvonne Richaud-Patin. Departamento de Inmunología y Reumatología. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Al Dr. Edgar Kröttsch-Gómez. Laboratorio del Tejido Conjuntivo. Departamento de Biología Celular. Instituto de Investigaciones de Biomédicas, UNAM.

A la MC Sandra Gavilánez Parra. Departamento de Salud Pública, Universidad Autónoma de México.

Al Dr. Julio Granados A. Departamento de Inmunología y Reumatología. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Al Dr. Angel Manjarrez. Departamento de Salud Pública, Universidad Nacional Autónoma de México.

A la MC Ana Luisa Weckmann. Departamento de Inmunología y Reumatología. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

A la QFB Claudia Martínez, Laboratorio de Patología Experimental. Departamento de Patología. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Al MC Fabián Arechavaleta, Departamento de Biología de la Reproducción. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Al Dr. Salvador Uribe, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

A mis compañeros de laboratorio, residentes y personal del Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Al personal del laboratorio del Tejido Conjuntivo del Departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones de Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado. Dirección General de Asuntos del Personal Académico. Programa de Becas para Estudios de Posgrado. Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado. Subdirección de Apoyo al Posgrado. Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado. Tesis Doctorales. Universidad Nacional Autónoma de México.

Mi más profundo agradecimiento a mi familia.

ÍNDICE

ÍNDICE	4
I. ABREVIATURAS.....	6
II. RESUMEN.....	7
III. GENERALIDADES	9
Esclerosis generalizada progresiva (esclerodermia)	9
El fibroblasto	15
La matriz extracelular	17
Síntesis de la matriz	17
Degradación de la matriz	18
Metaloproteasas.....	19
Control y regulación	19
Inhibidores tisulares de las metaloproteasas	20
Control y regulación	20
IV. HIPÓTESIS	26
V. OBJETIVOS	27
Objetivos principales	27
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	27
Pacientes y controles	27
Características clínicas	27
Biopsia de piel y obtención de cultivos primarios	28
Preparación de las clonas de fibroblastos a partir de los cultivos primarios	29
Características de crecimiento <i>in vitro</i> del cultivo primarios de fibroblastos	30
Características de crecimiento <i>in vitro</i> de las clonas de fibroblastos	31
Cuantificación del ADN	31
Conteo celular	31
Microensayo para la cuantificación de la síntesis de colágena (Incorporación de prolina [¹⁴ C])	32
Determinación de colágena tipo I y colágena tipo III	32
Zimogramas en gelatina	33
Inmunotransferencia (western-blot) para MMP-1, MMP-2 y MMP-3	35
Cuantificación de los niveles de TIMP-1 y TIMP-2	36
Análisis estadístico	36
VII. RESULTADOS	37
Características de los pacientes	37
Características clínicas de los pacientes	38
Cuantificación de ADN	39
Características de crecimiento <i>in vitro</i> de los cultivos primarios	40
Características del procedimiento de la clonación	43
Características de crecimiento <i>in vitro</i> de las clonas de fibroblastos	44
Síntesis de colágena	48
Identificación de colágena tipo I y colágena tipo III en los cultivos primarios de fibroblastos	52
Actividad de las metaloproteasas	53
Cuantificación del TIMP-1 y del TIMP-2	56
VIII. DISCUSIÓN	64
IX. CONCLUSIONES.....	71

X. BIBLIOGRAFÍA..... 73

XI. AGRADECIMIENTOS..... 87

I. ABREVIATURAS

ACA	Anticuerpos anti-centrómero
ANA	Anticuerpos antinucleares
Anti-topo-1	Anticuerpos anti-topoisomerasa 1
APMA	Ácido femil metil mercurico
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
[¹⁴ C]	Carbono 14
CMN	Células mononucleares
cpm	cuentas por minuto
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
EE	Error estándar
EGP	Esclerosis Generalizada Progresiva, esclerodermia
F/M	Relación femenino masculino
FACS	citometría de flujo
FR	Factor reumatoide
g	Aceleración de la gravedad
GAG	Glicosaminoglicanos
HEPES	Ácido n-(2-Hidroxietil(piperazina-N' - (etanosulfónico)
VIH	Virus de la inmunodeficiencia adquirida
HLA	Antígeno leucocitario humano
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleucina
IL-1 α	Interleucina-1 alfa
IL-1 β	Interleucina-1 beta
kDa	kilodaltones
MCC	medio de cultivo de crecimiento modificado (D-MEM)
MCCS	medio de cultivo de crecimiento suplementado
MCF	medio condicionado de fibroblasto
MEC	Matriz extracelular
min-max	mínimo-máximo
MMP	Metaloproteasas
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PMA	Acetato de forbol miristato
PMN	Polimorfonucleares
PPO	2,5-difeniloxazole
r _s	Coefficiente de correlación de Spearman
SBF	Suero bovino fetal
TCA	Ácido tricloroacético
TGF- β	Factor de crecimiento transformante-beta
TIMP	Inhibidor tisular de las metaloproteasas
TNF- α	Factor de necrosis tumoral-alfa
UD	Unidades densitométricas

II. RESUMEN

Objetivo. Investigar en cultivos primarios de fibroblastos y sus clonas, derivados de pacientes con esclerosis generalizada progresiva (EGP), la proliferación, la síntesis de colágena y la expresión de metaloproteasas y sus inhibidores.

Materiales y Métodos. Los fibroblastos se obtuvieron de piel de 10 pacientes con EGP (con un promedio de la evolución de la enfermedad de 4.95 años) y de 7 controles, pareados por edad, sexo y sitio de obtención de la biopsia. El método de dilución limitante se utilizó para obtener las clonas de fibroblastos. Las características de crecimiento *in vitro* se determinaron por tres métodos diferentes. La síntesis de colágena se determinó por la incorporación prolina marcada con [¹⁴C]. Las colágenas tipo I y III se distinguieron por su reducción diferencial. La actividad de las metaloproteasas se determinó mediante zimogramas en gelatina y se confirmó por inmunotransferencia (western-blot). En los sobrenadantes de los cultivos se determinó la concentración de los inhibidores tisulares de las metaloproteasas 1 y 2 (TIMP-1 y TIMP-2) mediante ELISA.

Resultados. Los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP tuvieron mayor proliferación, aumento en la síntesis de colágena, mayor cantidad de colágena tipo I y tipo III e incremento de TIMP-1, todos estos cambios tuvieron un valor de $p < 0.05$ al compararlas con los cultivos primarios de controles. No se observó un aumento en la relación colágena tipo I/colágena tipo III al comparar con los controles. La actividad de la colagenasa intersticial (MMP-1) y la expresión de la gelatinasa de 72 kDa estuvieron ligeramente disminuídas en el cultivo cantidad de fibroblastos de pacientes comparadas con los controles. No hubo diferencias significativas en la expresión de la gelatinasa de 92 kDa ni del TIMP-2 en los fibroblastos de pacientes al compararlos los controles. Además, se observó la presencia de dos bandas con actividad gelatinolítica con un peso molecular aproximado de 62 kDa y 59 kDa.

Los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes de corta evolución de la enfermedad (menos de 2.5 años) producen mayor cantidad de colágenas tipo I y III, y de TIMP-1 comparados con los de larga evolución (7 a 13 años) o con los controles. En los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con larga evolución se observó que los niveles de las colágenas tipos I y III así como la concentración de TIMP-1 y la actividad de las MMPs fueron similares a los controles.

En relación a las clonas de fibroblastos, se observó que la clonogenicidad de estos en los pacientes no fue diferente a la de los controles. La frecuencia de clonación fue baja. Existió una marcada heterogeneidad en la proliferación, síntesis de colágena, expresión de MMPs y en la concentración de TIMP-1, tanto en clonas de fibroblastos derivados de pacientes como de controles.

Conclusión. Estos datos sugieren que anomalías tanto en la producción de enzimas que degradan a los componentes de la matriz, así como de su inhibidor, pueden tener una función importante en la acumulación de colágena en la piel y en otros órganos afectados en pacientes con EGP. Estas anomalías guardan una relación con el tiempo de evolución de la enfermedad.

Por otro lado, existe heterogeneidad entre las clonas de fibroblastos en relación a la proliferación, síntesis de colágena, expresión de MMPs y concentración de TIMP-1. Esto nos indica que la piel de pacientes con EGP está compuesta por clones de fibroblastos que no son capaces de regular la síntesis y la degradación de los componentes del tejido conjuntivo y este desequilibrio en el recambio pueden ser importante en la patogenia de esta enfermedad. Además, esta heterogeneidad observada sugiere que los fibroblastos están compuestos de diferentes poblaciones.

II. ABSTRACT

Objective. To investigate the proliferation, synthesis of collagen metalloproteinases and their inhibitors in primary cultures of fibroblasts and derivated clones obtained from skin from patients with systemic sclerosis (SSc).

Materials and Methods. Fibroblasts were obtained from skin biopsies of ten patients with the diagnosis of SSc with an average duration below 5 years, and seven controls matched by age, sex and biopsy site. A limiting-dilution assay was used to determine cloning frequencies in the microcultures of plated dermal fibroblasts. The *in vitro* proliferation characteristics were determined by three methods. The collagen synthesis was determined by [¹⁴C]-proline incorporation. Delayed reduction was employed to distinguish the type I from the type III collagen. The activity of the metalloproteinases (MMPs) was determined by gelatin zymography and confirmed by Western-blot. In the culture supernatants the concentration of the tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 (TIMP-1 and TIMP-2) were determined by ELISA.

Results. Primary fibroblast cultures had higher proliferation when derived from SSc patients. The primary fibroblast cultures derived from patients with SSc synthesized collagen in greater amount than those from control subjects. The fibroblasts of SSc patients also produced higher amounts of type I and III collagens, when compared to those from normal controls. SSc fibroblasts had a decreased interstitial collagenase (MMP-1). TIMP-1 expression was significantly higher than that found in control fibroblasts. There were no significant differences in the 92 kDa and 72 kDa gelatinase nor in the TIMP-2 expression between fibroblasts from SSc patients and controls. The presence of two bands with gelatinolytic activity with relative mobilities of 62 kDa and 59 kDa was also observed in cultures derived from patients with SSc. Fibroblasts from patients with an early stage of the disease (less than 2.5 years of disease evolution) exhibited higher levels of collagens type I and III, as well as of TIMP-1 when compared to those from late-stages of the disease (7 to 13 years of disease evolution) or to control subjects. Collagen synthesis and MMP-1 activity were increased, but type I and type III collagens, as well as TIMP-1 expression were decreased in fibroblasts with late-stages of SSc. In relation to the fibroblasts clones, the clonogenicity of those derived from SSc patients was not significantly different from that of fibroblasts derived from normal individuals. In all cases the frequency of cloning was low. Besides their heterogeneity, control fibroblasts clones were characterized in general by presenting "normal" levels of collagen synthesis, expression of MMP-1 and TIMP-1 (compared with their respective cultures). In contrast, the clones from SSc patients were frequently characterized by being high producers of collagen and TIMP-1.

Conclusion. Data suggest abnormalities in the production of the enzymes that degrade the matrix components and their inhibitors, which may have an important role in the accumulation of collagen in the skin and other organs affected by SSc. All the observed abnormalities are related to disease evolution.

There was heterogeneity among the clones of human dermal fibroblasts, with regard to proliferation, collagen synthesis, and the expression of MMP-1 and TIMP-1. Furthermore, these data show that SSc skin is composed of fibroblast clones that upregulate the synthesis and degradation of connective tissue components and this turnover imbalance might be important in the pathogenicity of this disease.

III. GENERALIDADES

Esclerosis generalizada progresiva (Esclerodermia).

La esclerosis generalizada progresiva (esclerodermia, EGP) es una enfermedad autoinmune, del tejido conjuntivo, de etiología desconocida, caracterizada por lesiones vasculares proliferativas, lesiones microvasculares obliterativas y atrofia residual con fibrosis del múltiples órganos (1-3).

La primera descripción detallada de esta enfermedad se realizó en 1753 por Curzio. Posteriormente, Grinrac en 1847 introdujo el término esclerodermia (*skleros*: duro; *derma*: piel), con énfasis en que la piel es el órgano blanco más afectado [citado por Perez (2)]. Posteriormente, Klemperer la incluyó en lo que denominó como "Enfermedades de la Colágena" (4). En los últimos años el interés acerca de su patogénesis ha ido en aumento, sin dilucidarse completamente (1).

La prevalencia de la EGP varía, dependiendo de los estudios, entre 4 a 286 afectados por millón de personas (5). Mientras que la incidencia va entre 0.6 a 19.1 afectados por millón de personas (5). La incidencia es más alta en personas de raza negra que en blancos, aunque estas diferencias son mínimas a todas las edades (6) y su pico se observa entre los 45 y 62 años (5, 6). En relación a la distribución por sexo, las mujeres son las más afectadas. La relación F/M varía dependiendo de las series, de 3:1 a 14:1 (5). La probabilidad de supervivencia en pacientes con EGP varía de acuerdo a la edad del diagnóstico, a los 7 años es del 72% y del 40 % al 50 % a los 10 años (5, 7). La tasa acumulada de supervivencia fue menor al 80% a los 2 años, 50% a los 8.5 años y 30% a los 12 años (8).

La patogénesis de la EGP se desconoce; sin embargo, se han implicado cuatro factores, a saber: 1.- La activación persistente de fibroblastos, que da como resultado la producción de cantidades excesivas de proteínas de la matriz extracelular (MEC), como colágena y otras proteínas que se acumulan en la dermis y en órganos internos (9-11); 2.- La existencia de disfunción vascular y microvascular, caracterizadas por la proliferación

de la capa íntima y obliteración capilar (12, 13); 3.- La existencia de anomalías autoinmunes, con producción de autoanticuerpos (para revisión vea ref. 14), hipergammaglobulinemia, hiperactividad de linfocitos T y citocinas secretadas por células del sistema inmune que modulan la fibrosis o promueven el daño vascular (15-18) y 4.- Cambios proliferativos y activación de las células cebadas (19, 20). Al parecer todos estos componentes están directamente relacionados y su interacción funcional determina la extensión y la localización de la respuesta fibrótica (21). Revisaremos brevemente estos mecanismos patogénicos (Figura 1).

La EGP es una enfermedad heterogénea del tejido conjuntivo de etiología desconocida, caracterizada por una sobreproducción de proteínas de la matriz extracelular (MEC) por parte de los fibroblastos, daño del endotelio de vasos de pequeño calibre, así como hiperplasia de la íntima, así como isquemia y activación del sistema inmune (22-25).

Existe predisposición genética basada en la relación con ciertos tipos de HLA con la esclerodermia (5, 26-29), en informes de familiares con EGP (5, 30, 31) y en informes de casos múltiples (5, 32, 33). Finalmente, hay tres modelos de animales que desarrollan espontáneamente esclerodermia (3, 34, 35). Posiblemente, la predisposición genética puede ser un prerrequisito para el desarrollo de la EGP, pero las evidencias sugieren que otros factores directos o indirectos también intervienen en su evolución. También se ha encontrado que varios factores ambientales y químicos se asocian con el desarrollo de la EGP (36).

Hay evidencia directa que los virus pueden desempeñar un papel patogénico en esta enfermedad debido al mimetismo molecular entre antígenos virales y componentes celulares que conducirían al desarrollo de autoanticuerpos en pacientes con EGP (37-41).

Además, se ha mostrado que pacientes con EGP tienen reactividad, aunque débil, contra las proteínas retrovirales del virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH)

determinadas por inmunotransferencia (western-blot), sin signos de infección (42). Los cambios vasculares se observan tempranamente en el curso de la enfermedad, antes del inicio de la fibrosis, lo que sugiere que ellos son primarios en la patogénesis. A pesar de que hace más de 20 años se ha propuesto la hipótesis vascular en la patogénesis de la esclerodermia (13), aún no se conoce el evento que dispara el daño endotelial directo o si es a través de los mediadores del sistema inmune. Es evidente que la interacción célula-célula y célula-MEC son fundamentales para la activación del sistema inmune, daño endotelial y fibrosis. Estos elementos iniciales activan al sistema inmune, dando como consecuencia acumulación de células mononucleares y linfocitos ($CD4^+$ y $CD8^+$ activados) en los espacios perivascular e intersticial (43, 44).

Las células $CD4^+$ predominan en la piel, mientras que las células $CD8^+$ predominan en el lavado bronquial. El incremento de la expresión de DR y CD45 en los linfocitos T de la piel (44), así como, los niveles aumentados en suero de desaminasa de adenosina (45), y la presencia de los receptores de la IL-2 (46), como la síntesis aumentada de citocinas (3, 11, 18, 47) nos sugieren activación linfocitaria. Además, varias citocinas de diferente origen celular [interleucinas (IL)-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral-alfa ($TNF-\alpha$), factor de crecimiento transformante-beta ($TGF-\beta$), interferón gamma ($IFN-\gamma$), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), entre otras (17, 46, 48-51)], así como la síntesis de autoanticuerpos (52), (anti-topoisomerasa-I, anti-centrómero y RNA polimerasas) han mostrado ser potentes efectores de la respuesta inmune. Toda esta evidencia indica que hay activación inmune de linfocitos T y secundariamente activación de los linfocitos B. Es difícil determinar si los mediadores inmunes causan daño endotelial o si es el daño vascular el que induce activación del sistema inmune con su consecuente liberación de mediadores y proliferación de fibroblastos. En este sentido, hay informes en la literatura que apoyan estas dos posibilidades. Así, Kahaleh y colaboradores (53) mostraron que ciertos componentes del

suero de pacientes con EGP pueden destruir las células endoteliales de vena umbilical humana *in vitro*. Los linfocitos T de piel de pacientes con EGP secretan granizima A, molécula citotóxica para las células endoteliales (54). Las moléculas de histocompatibilidad de clase II, marcadores de activación endotelial, se encuentran en la vecindad de los vasos sanguíneos durante la fase inicial de la enfermedad (55). Además, el daño vascular está documentado por el incremento del factor de von Willebrand y por la activación de las plaquetas (frecuente en presencia de daño endotelial) (23). Las plaquetas, *per se*, pueden activar a los fibroblastos, mediante la liberación del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y del TGF- β . Las células endoteliales sintetizan la IL-1 α y la IL-1 β y expresan moléculas de adhesión. Estas moléculas pueden facilitar la migración y adhesión de los linfocitos al endotelio y por consiguiente aumentar la activación del sistema inmune y la liberación de sus mediadores. Además el endotelio produce endotelina 1, que induce proliferación de fibroblastos y producción de colágena. Cualquiera que sea el caso, los mediadores inmunes se encuentran en el sitio adecuado para actuar, y actúan en concierto para establecer las condiciones que permite al fibroblasto desarrollar un fenotipo de EGP. Aquí se muestran estos aspectos en forma separada, pero ellos actúan simultáneamente e interactivamente. Así, la migración de las células mononucleares de la circulación al sitio de reparación tisular y/o de la inflamación, está finamente regulada. Esto requiere la expresión apropiada de ciertas moléculas, aumento de receptores particulares y contra-receptores en los linfocitos, células endoteliales, fibroblastos y tejido conjuntivo. El paso inicial, sea la activación de los linfocitos y la modulación de la expresión de los ligandos de adhesión en estas células. Es posible que, después de la activación de los linfocitos, o en respuesta a otro estímulo (previo y/o posterior), las células endoteliales se activen y expresen sus ligandos y contra-receptores para los ligandos de los linfocitos y/o fibroblastos. Después de la unión celular, puede existir una activación recíproca de las células inmunes y células del tejido conjuntivo mediada por el contacto celular y por la liberación de citocinas, por parte de estas

células. Todos estos elementos son importantes para el desarrollo de la fibrosis en la esclerodermia, pero no es una explicación completa. Los fibroblastos obtenidos de las lesiones y mantenidos en cultivo persisten su fenotipo anormal (de incremento de síntesis de proteínas de la MEC) por varias generaciones, sin un estímulo continuo de las células inmune o sus productos (56,57). Una explicación posible es que una vez activado los fibroblastos, sus productos actúen en forma autócrina y sirvan como una retroalimentación positiva. Otra posibilidad es que los eventos inflamatorios e inmunes seleccionen a una subpoblación de fibroblastos, que sintetice cantidades elevadas de colágena (58) y proponemos que dentro de una subpoblación también seleccionen a otras proteínas que intervienen en la patogénesis, dando un fenotipo fibrótico característico de la enfermedad. También se ha demostrado la expresión aumentada de genes que codifican a los componentes de la MEC (59).

El conocimiento de la regulación transcripcional de los genes de la colágena es importante, debido a que los mecanismos de expresión de estos genes de la colágena puede ser blanco terapéutico. Por último, la función de las células cebadas no es del todo clara en la generación de la fibrosis. Estas células son potentes activadores de los fibroblastos, así como de las células endoteliales. La colágena tipos I y IV y los mismos fibroblastos pueden activar a los linfocitos T, induciendo activación permanente en pacientes con EGP (25). Así, estos mediadores producidos por las células presentes en el sitio inducen proliferación de fibroblastos, incremento en la síntesis de las proteínas de la MEC, inhibición de la degradación de la MEC, dando como resultado final fibrosis de piel y de órganos internos.

El fibroblasto

Los fibroblastos se derivan del mesénquima embrionario. El término fibroblasto describe a un grupo de células que incluyen a las del tejido conjuntivo (fibrocitos), a las células contráctiles (miofibroblastos) y ocasionalmente a las células fagocíticas de los tejidos (histiocitos) (60). Durante la embriogénesis, las células fibroblastoides no sólo sintetizan la

matriz extracelular, sino también determinan la estructura esquelética, la localización de las células musculares, las vías de las fibras nerviosas y la organización de la piel (61). Durante el crecimiento y maduración de los tejidos, los fibroblastos continúan la síntesis y el mantenimiento de los componentes de la MEC. Estos componentes son constantemente degradados y remodelados por varias enzimas que también son producidas por los fibroblastos (ver adelante). Está bien establecido el papel principal que tienen los fibroblastos en la producción excesiva de la síntesis de la colágena y de otras proteínas de la MEC. Además, los fibroblastos desempeñan una función activa en el sistema inmune, sintetizando, respondiendo a citocinas (50, 51) y a través de la presentación antigénica (62). Varias citocinas y factores de crecimiento pueden modular o regular una variedad de funciones de los fibroblastos y sus productos, incluyendo proliferación, quimiotaxis, síntesis de proteínas de la MEC, síntesis de otras moléculas como las prostaglandinas, moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), síntesis de enzimas proteolíticas, entre otras (50, 51).

Los fibroblastos difieren de un tejido a otro, Castor y colaboradores (63) encontraron diferencias en los cultivos de fibroblastos derivados de la dermis, tejido articular, superficies mesoteliales y periosteo. Estas diferencias incluían morfología, proliferación y producción de ácido urónico. Smith y colaboradores (64) mostraron diferencias entre los fibroblastos dérmicos y los retro-oculares en relación a la regulación hormonal de la síntesis del hialuronato. También, los fibroblastos derivados de la piel difieren de los derivados en pulmón, en términos, de morfología, proliferación y síntesis de citocinas (65). Aún más, los fibroblastos son también heterogéneos dentro del mismo sitio anatómico, en este sentido se ha mostrado que fibroblastos derivados de la dermis reticular y de la papilar son heterogéneos en su crecimiento *in vitro* (66). Los fibroblastos de piel de sujetos normales son heterogéneos en su crecimiento, proliferación, expresión de moléculas de superficie, unión a C1q y síntesis de proteínas en respuesta hormonal, así como de mitógenos (67-70). También

se ha observado heterogeneidad en la morfología, proliferación, síntesis de proteínas en fibroblastos derivados de la mucosa gingival (67, 71-74). Se ha descrito características proliferativas heterogéneas en los fibroblastos de pulmón obtenidos de sujetos normales; así como obtenidos de pacientes con fibrosis pulmonar (75). Por último, las subpoblaciones de fibroblastos de la línea celular de pulmón fetal WI-38 han mostrado heterogeneidad en la morfología (tanto citoplásmica como nuclear) y en la distribución de orgánulos (81). Por otro lado, hay evidencia que existe heterogeneidad en los fibroblastos obtenidos de animales (76-80).

En relación a subpoblaciones de fibroblastos obtenidos de pacientes con EGP, Fleischmajer y colaboradores (82) mostraron que los fibroblastos aislados de diferentes estratos de la piel de pacientes con EGP, producían colágena y fibronectina en forma heterogénea. Posteriormente, Botstein y colaboradores (58) observaron que el suero de pacientes con EGP favorecía al crecimiento de clonas de fibroblastos-altas productoras de colágena, derivadas de prepucio de neonatos sanos. Los autores proponen un modelo alternativo de fibrosis (los fibroblastos en EGP son sujetos de selección que favorecen el crecimiento de las células-altas productoras de colágena) (58). Maxwell y colaboradores (83) mostraron unión a C1q en proporción diferente en fibroblastos derivados de cultivos primarios de pacientes con corta evolución (8 y 18 meses) y las obtenidas de pacientes con larga evolución (4 a 8 años). Whiteside y colaboradores (84) obtuvieron, mediante dilución limitante, clonas de fibroblastos derivadas de pacientes con EGP, en las que la mayoría de clonas eran altas productoras de glicosaminoglicanos y proteína sensible a colagenasa, sugiriendo que la piel de pacientes con EGP esta compuesta por clonas de fibroblastos que son incapaces de regular la síntesis de componentes de la MEC. Estudios posteriores, con metodologías diferentes, han confirmado la heterogeneidad en la síntesis de colágena de fibroblastos de pacientes con EGP (86-87).

No se conoce si toda la masa de fibroblastos o subpoblaciones son responsables de la producción y expresión diferencial de las metaloproteasas y los inhibidores tisulares de las metaloproteasas en cultivo de fibroblastos derivados de pacientes con EGP. Además, se desconoce si existe heterogeneidad en la expresión de MMP-1 y TIMP-1, tanto en fibroblastos derivados de sujetos normales, como de pacientes con EGP.

La matriz extracelular.

La MEC es una estructura altamente compleja del tejido conjuntivo. Está formada por diferentes componentes, que incluyen varios tipos de colágena, glicoproteínas tales como fibronectina, laminina, entactina, glicosaminoglicanos (GAG) y proteoglicanos (87). Cada uno de los componentes de la MEC se clasifica de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas y fisiológicas: las estructurales, principalmente colágena y elastina; y las adhesivas como la fibronectina y la laminina. Ambas clases se encuentran en una variedad de tamaños y formas, que se derivan de la expresión de diferentes genes y constituyen familias de proteínas. En la piel, existe una gran variedad de moléculas de la matriz que son parte importante del espacio intercelular, que se forman por medio de una red intrincada de macromoléculas y la manera cómo se encuentran organizadas, dan lugar a una diversidad de formas, cada una adaptada a los requerimientos particulares de cada tejido. La piel normal está compuesta por colágenas fibrilares (colágena tipos I, III y V); también la colágena tipo V está presente en la matriz vascular (88). Las proporciones de los diferentes tipos de colágenas extraídas de la dermis en piel adulta son del 80 al 90 % de colágena tipo I, del 8 al 22 % de la tipo III y menos del 5% de la tipo V (89). La alta concentración de la colágena tipo I contribuye a la gran fuerza de tensión de la dermis y su resistencia a la deformación. La colágena tipo V presente también en la dermis, está organizada en filamentos finos que se intercalan con las fibrillas de colágena, y su distribución tan variada, sugiere que tenga una función en la organización de otros componentes de la MEC (90). Además, influye en el citoesqueleto de las células que la producen (90). En lo que respecta a las proteínas

adhesivas, sólo mencionaremos que participan en la interacción célula-MEC y célula-célula. La fibronectina promueve la interacción de los fibroblastos con otros tipos de células con la MEC, mientras que la laminina promueve la unión de las células epiteliales a la lámina basal (91). Las moléculas de GAG y proteoglicanos en el tejido conjuntivo, forman una sustancia fundamental hidratada, tipo gel, en la que se encuentran embebidas las proteínas fibrosas, de tal manera que este gel resiste las fuerzas compresivas en la MEC y las fibras de colágena principalmente proveen la fuerza tensil (91).

Degradación de la matriz.

La degradación de la MEC es un proceso fisiológico normal, así como en procesos patológicos. En el proceso fisiológico normal de la remodelación está asociada con el crecimiento, cicatrización, morfogénesis, angiogénesis, migración celular, implantación del trofoblasto, resorción uterina postparto, remodelación ósea, erupción dental, entre otras. Este proceso requiere de la síntesis y remodelación de varias proteínas que se encuentran finamente controladas (87, 92). En algunos de estos procesos, ocurren de manera altamente regulada y con mínima destrucción tisular (*i.e.* migración celular).

La degradación de la MEC se asocia con algunos procesos patológicos, tales como la formación del granuloma, artritis reumatoide, enfermedad periodontal, aterosclerosis, entre otras. En estas condiciones se debe a la pérdida de la homeostasia por una producción anormal de las proteínas y la velocidad de recambio de estas proteínas (93).

Una regulación anormal pero controlada de la degradación de la MEC, se observa en otras condiciones como la invasión y metástasis de células neoplásicas (94).

La degradación de la MEC se produce por acción de endopeptidasas o proteinasas, producidas por varias células, y pueden subdividirse en cuatro clases: metaloproteasas, cisteín-proteasas, serin-proteasas y proteasas del ácido aspártico (95).

Metaloproteasas.

Control y regulación.

Las metaloproteasas son un grupo de endopeptidasas, dependiente de metal, estructural y funcionalmente relacionadas, las cuales desempeñan funciones importantes en la degradación de los componentes de la MEC (Tabla 1). Las MMPs son producidas por las células mesenquimatosas, hematopoyéticas, queratinocitos, entre otras (Tabla 1). También las MMPs comparten una homología entre sí (~70%). Dentro de esta similitud, las MMPs se dividen en varios dominios (Tabla 1).

Las MMPs han sido clonadas y comparten varias características comunes: (a) son capaces de degradar uno o más componentes de la MEC; (b) son secretadas como proenzimas (zimógenos), la que requiere su activación extracelular; (c) los zimógenos se activan por proteinasas, organomercuriales o por agentes quelantes (*i.e.* EDTA), (d) 1,10-fenantrolina bloquean su actividad, pero se revierte esta actividad agregando Zn^{2+} exógeno; (e) son activas a pH neutro; (f) tienen requerimiento de Zn^{2+} y Ca^{2+} , que son necesarios para la estabilización de estas proteínas; (g) la activación es acompañada de pérdida de una parte de su molécula (cerca de 10 kDa); (h) su actividad es inhibida por los TIMPs, e (i) poseen propiedades y funciones inmunológicas (*i.e.* regulación de secreción por citocinas y otros mediadores, facilitación de la secreción de TNF, y contribuye a enfermedades inflamatorias y autoinmunes) (87, 92-97).

Las MMPs son reguladas a varios niveles: durante la síntesis, la secreción, la activación en el medio extracelular antes de que el sustrato le degrade y por inhibidores naturales, tales como los TIMPS (95). La síntesis y secreción de pro-MMPs son reguladas por varias citocinas, factores de crecimiento, hormonas y mitógenos. Una segunda vía de control del recambio de la matriz por las MMPs es la conversión de proenzimas a sus formas activas. Los organomercuriales activan a la forma latente por cambios conformacionales. Otros compuestos son capaces de activar a las formas latentes (*i.e.* catepsinas B y L, plasmina, elastasa). El tercer control de las MMPs ocurre con la interacción de los inhibidores naturales, tales como la macroglobulina α_2 y los TIMPs. La actividad de las MMPs es

específicamente inhibida por los TIMPs, las cuales se unen con la MMPs activadas en una relación de 1:1 (98). Se ha informado que la expresión del gen de las MMPs se correlaciona con su forma celular, modula la morfología de los fibroblastos, mediante agentes químicos y por las condiciones de cultivo (99).

Inhibidores tisulares de las metaloproteasas.

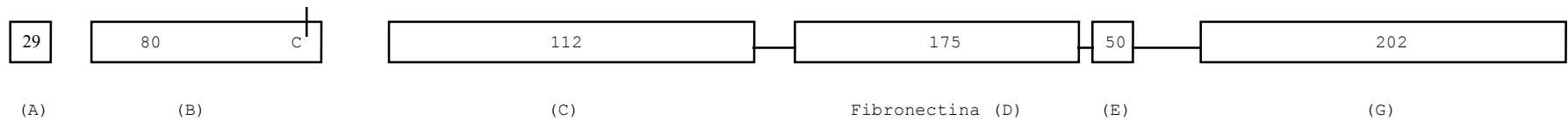
Control y regulación.

Las metaloproteasas son inhibidas específicamente por los TIMPs. Cuatro tipos de TIMPs se han identificados y clonados (100-102). 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 con otros componentes, tales como el dominio C-terminal de las gelatinasas. En el humano el TIMP-1 es una glicoproteína de 28.5 kDa, el TIMP-2 es una proteína no glicosilada de 21 kDa. Ambas son producidas de manera constitutiva por varios tipos de células, como las epiteliales, mesenquimatosas (96), y están presentes en fluidos corporales y en los extractos tisulares (103). Todas las TIMPs inhiben a las MMPs activas, uniéndose en forma no covalente e irreversible produciendo complejos estequiométricos (1:1). En ocasiones, las proenzimas se unen a los TIMPs. Los mecanismos por los cuales los TIMPs se unen, aunque con diferente afinidad, a los centros activos de las MMPs e inhiben sus funciones, son pocos entendidos.

Continuación de la Tabla 1.

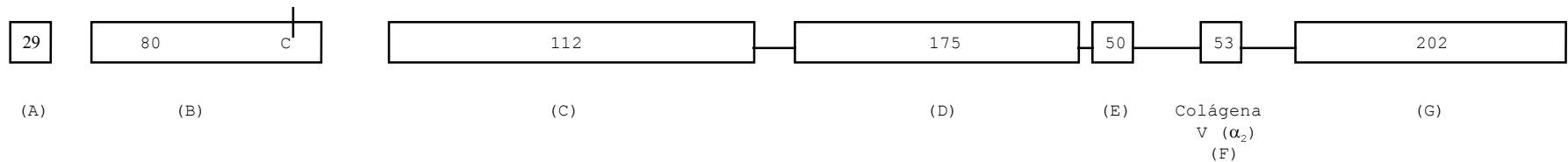
II.	Gelatinasa A MMP-2	72 latente 66 activa	Idem	Gelatina tipo I. Colagenas IV,V,VII,X Fibronectina Elastina.	Células mesenqui- matosas. Del tejido epitelial (restringido)	16q21
-----	-----------------------	-------------------------	------	---	---	-------

Estructura



Gelatinasa B MMP-9	92 secretada 84 activa	Idem	Gelatinas I,V, cola- genas IV,V.	Macrófagos, fibro- blastos, PMN. Célu- las epiteliales.	16q
-----------------------	---------------------------	------	--	---	-----

Estructura

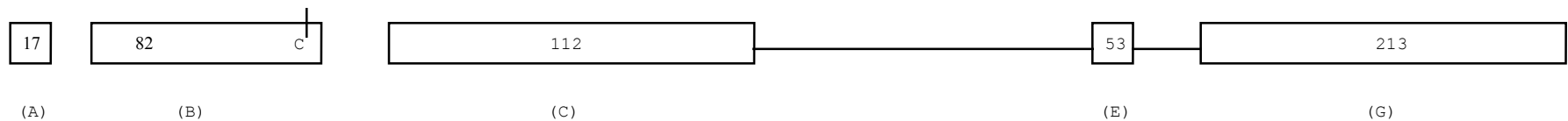


III.	Estromelisina-1 MMP-3	60/57 secretada 50/48 activada 28 activada	Idem	Proteogli- canos. Fi- bronectina.	Células mesenquima- tosas. Macrófagos.	11q22
------	--------------------------	--	------	---	---	-------

Continuación de la Tabla 1.

				Gelatinas I, III, IV, V. Colágenas III, IV, V, IX. Propéptidos de procoláge- na I, II, III. Elastina (li- mitado).	
Estremolisina-2 MMP-10	53 secretado 47 activada		Idem	Gelatinas I, III, IV, V Caolágenas III, IV, V (limitado).	Queratinocitos, Macrófagos alveolares. Células tumorales. 11q22
Estromelisina-3 MMP-11	61		Idem		Células mesenquimato- sas (restringido).

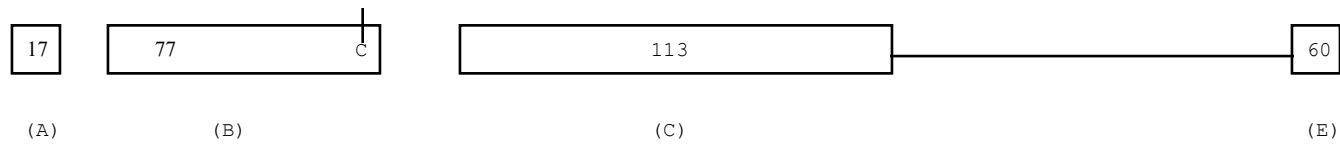
Estructura



IV.	Matrilisina PUMP-1 MMP-7	28 secretada 21/19 activa	Idem. Carece de domi- nio [(G), dominio se- mejante a hemopexina/ vitronectina].	Fagocitos mononuclea- res. Promonocitos. Cé- lulas epiteliales.
------------	--------------------------------	------------------------------	---	---

Continuación de la Tabla 1.

Estructura



El residuo de residuos de aminoácidos se muestra dentro de cada dominio. La línea indica la conexión de dominios conectados. La C indica la posición aproximada del switch de cisteína.

* Secuencia de aminoácidos de la región del switch de cisteína (Se muestra la secuencia para la MMP-1).

** Secuencia de aminoácidos de la región o sitio de unión al zinc (Se muestra la secuencia para la MMP-1. Los aminoácidos conservados se muestran en oscuro).

PMN= polimorfonucleares.

El mecanismo acción de los TIMPs es complejo e involucra numerosos puntos de interacción con las MMPs.

Algunas evidencias del papel de las MMPs y de los TIMPs se han descrito en la EGP. En este sentido, se encontraron niveles elevados de TIMP-1 en suero de pacientes con EGP, los cuales se correlacionó con la actividad de la enfermedad (104). Por otro lado, Bou-Gharios y colaboradores (105) mostraron una disminución de la MMP-3 con un incremento concomitante del TIMP-1 en fibroblastos de pacientes con EGP. Esto fue determinado usando un procedimiento por el cual los fibroblastos fueron cultivados con monesina (la cual previene la secreción de nuevos componentes de la MEC); y se midió mediante citometría de flujo (FACS). Posteriormente, Kirk y colaboradores (106) mostraron incremento de TIMP-1 en miofibroblastos obtenidos de piel de pacientes con EGP. Kikuchi y colaboradores (107) describen que el TIMP puede ser un factor de crecimiento autócrino en el proceso fibrótico de los pacientes con EGP. Por último, recientemente, se encontró que los fibroblastos de pacientes con EGP expresaban niveles elevados de mRNA de TIMP-3 tanto en cultivo como *in vivo* (108).

En conclusión, no se conoce si ciertas subpoblaciones de fibroblastos sean las responsables de la expresión alterada de las MMP-1, así como de TIMP-1; tampoco se conoce si el recambio de las proteínas (MMPs, TIMPs) se encuentra alterado en las diferentes fases de la enfermedad.

IV. HIPÓTESIS.

Existe un recambio alterado del tejido conjuntivo en la Esclerosis Generalizada Progresiva, debido a la síntesis aumentada de proteínas de la matriz extracelular (colágena) y anormalidades en la producción y regulación de las enzimas de la matriz y sus inhibidores. Además, este recambio es diferente en pacientes de corta evolución en relación a los de larga evolución.

En las subpoblaciones de fibroblastos de pacientes con Esclerosis Generalizada Progresiva existen heterogeneidad: [1] en las características proliferativas, [2] en la síntesis de colágena, [3] en la expresión de la actividad de las metaloproteasas y [4] en la concentración del inhibidor tisular de la metaloproteasa-1.

V. OBJETIVOS.

Objetivos principales.

1. Determinar y comparar en los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP y de sujetos normales, la síntesis de colágena tipos I y III, la expresión de la actividad de la colagenasa intersticial y la producción de los inhibidores tisulares de las metaloproteasas-1 y 2.

2. Estudiar y comparar en las subpoblaciones de fibroblastos la heterogeneidad/homogeneidad en: la proliferación celular, síntesis de colágena, la expresión de la actividad de la MMPs y la concentración del inhibidor tisular de la metaloproteasa-1.

3. Caracterizar las subpoblaciones de fibroblastos de los dos grupos de estudio.

4. Establecer la participación de las proteínas de la colágena, de las enzimas de la matriz y sus inhibidores en la patogénesis y en la evolución de esta enfermedad.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

Pacientes y controles: se estudiaron diez pacientes con el diagnóstico de EGP que reunían los criterios de clasificación para esta enfermedad (109). Todos los pacientes tenían EGP de acuerdo a la clasificación propuesta por LeRoy y colaboradores (110). Seis pacientes tuvieron menos de 2.5 años de evolución de la enfermedad y los cuatro restantes menos de 13 años de evolución de la enfermedad. Se consideró inicio de la enfermedad desde la aparición de fenómeno de Raynaud o cualquier síntoma relacionado con la enfermedad. Además, se estudiaron siete sujetos normales. Ninguno de los sujetos estudiados tenía síndrome de sobreposición u otras enfermedades del tejido conjuntivo ni enfermedades de la piel. Los pacientes y los sujetos normales, fueron pareados por edad, sexo, sitio de la biopsia y características socio-demográficas. Las muestras fueron procesadas en paralelo. El tratamiento de los pacientes se suspendió por lo menos tres días antes de la biopsia y todos recibieron información completa del propósito del estudio y firmaron la carta de consentimiento para su participación. Las características demográficas de los grupos estudiados se presentan en la Tabla 2.

Características clínicas: los pacientes se evaluaron por la presencia de daño o afección pulmonar, gastrointestinal, renal, cardíaca o muscular, así como por la pérdida digital. También se evaluaron anticuerpos antinucleares (ANA), anti-topoisomerasa 1 (anti-topo), anti-centrómero (ACA) y factor reumatoide (FR), además se cuantificó las inmunoglobulinas. La afección pulmonar se evaluó por la presencia de fibrosis bi-basal en una radiografía de tórax o por restricción de la capacidad funcional pulmonar determinada por espirometría o pruebas funcionales. La hipertensión pulmonar se evaluó por ecografía bidimensional. El daño gastrointestinal se apoyó en síntomas o hallazgos endoscópicos compatibles con reflujo esofágico o diarrea crónica con malabsorción no debida a otra patología o; alternativamente con anormalidades en la motilidad determinadas por radiografía o hallazgos manométricos o por saculaciones colónicas. La participación renal se consideró cuando los pacientes presentaron hipertensión maligna o reducción en la depuración de la creatinina inferior a 80 ml/min o valor de la creatinina sérica superior a 2 mg/dl. El daño cardíaco se definió por pericarditis, arritmia o

defectos en la conducción en ausencia de enfermedades coronarias conocidas. La miositis se definió por mialgias o debilidad asociada con incremento de los valores en el suero de creatinina o aldolasa y con hallazgos compatibles en la biopsia de músculo o electromiografía.

Los ANA y los ACA se determinaron por inmunofluorescencia indirecta (IFI). Los anti-topo-1 se determinaron por ELISA. Las inmunoglobulinas y factor reumatoide se cuantificaron por nefelometría.

Todos estos datos se obtuvieron del expediente médico de cada paciente y fueron recolectados a la fecha de la realización de la biopsia.

Biopsia de piel y obtención de cultivos primarios: los fibroblastos dérmicos se obtuvieron por biopsia de la piel, mediante un sacabocado de 4 milímetros de diámetro, en los pacientes y en los controles (las muestras se tomaron de las mismas regiones). Previo lavado de la región con solución salina estéril y alcohol, se anestesió con 0.5 a 1 ml de xilocaína al 1%. En los pacientes la biopsia se tomó en una zona de piel afectada. La biopsia se cortó en fragmentos pequeños (10 a 15 fragmentos de una biopsia de 4 mm de diámetro) y se colocaron en cuatro o cinco frascos de cultivo de 25 cm² (Falcon Labware, Becton Dickinson). Se añadieron 3 ml de medio de cultivo de crecimiento (MCC) [medio esencial mínimo modificado por Dulbecco (D-MEM, Sigma, St. Louis, Mo), suplementado con 10% de suero de bovino fetal (SBF, GIBCO BRL), L-glutamina al 2 mM, kanamicina (0.1 mg/ml), gentamicina (0.05 mg/ml) y anfotericina B (0.25 µg/ml)] y se colocó en una incubadora a 37 °C en 5% de CO₂, 95% de aire, en condiciones de humedad. El MCC se cambió cada 7 y/o 10 días en las tres primeras semanas, para luego cambiar cada 3 a 4 días durante 3 a 6 semanas. Cuando los fibroblastos llegaron a la confluencia se despegaron con tripsina-EDTA (0.5 µg/ml de tripsina 1/250 y 0.2 µg/ml de EDTA en solución salina amortiguada (GIBCO BRL) durante 1 a 2 min a 37 °C. La tripsina fue neutralizada con el MCC. Los fibroblastos se lavaron por una ocasión y fueron resuspendidos en 5 o 7 ml de MCC, repartidos en dos o tres cajas de cultivo, dependiendo del número celular y nuevamente colocados en incubación. Este procedimiento de subcultivo fue realizado rutinariamente. Durante estos

subcultivos se congeló una o dos muestra a -70°C . Las células fueron utilizadas para cada estudio comparativo, en paralelo, entre los pases tercero al sexto. Los cultivos en el tercer pase fueron clonados. Por otra parte, se utilizó la línea monocítica humana U937, la cual se cultivo en MCC como se indica arriba. Esta línea se utilizó con o sin tratamiento con acetato de forbol miristato (PMA) a una concentración de 10 ng/ml (111) para los controles positivos de las diferentes MMPs.

Preparación de las clonas de fibroblastos a partir de los cultivos primarios: las subpoblaciones fueron aisladas del cultivo cantidad de dos pacientes con EGP (A y D, ver Tabla 3) de corta evolución (> 2.5 años) y de dos sujetos controles (A' y D', ver Tabla 3), mediante dilución limitante como previamente describe Korn y colaboradores (70). Brevemente, después de que el cultivo cantidad (segundo pase) llegó a la confluencia se despegaron los fibroblastos como se indicó. Posteriormente, se lavó con MCC con 20% de SBF y amortiguador de HEPES 25 mM (GIBCO-BRL), se tomó una alícuota de 20 μl para determinar viabilidad mediante azul tripano. Quinientas mil células se resuspendieron en 10 ml de MCC con 20% de SFB. Diluciones seriadas se realizaron hasta obtener una concentración final de 50 fibroblastos/10 ml de medio. Cien μl de esta suspensión se pusieron a cada pozo en placa de 96 pozos de fondo plano (Falcon 3070, Oxnard, CA). Se agregaron 100 μl de MCC suplementado (MCCS), el cual contenía MCC con 20% de SBF y amortiguador de HEPES 25 mM/ 25% de SBF / 25% de medio condicionado de fibroblasto (MCF, el sobrenadante de los cultivos confluentes de los cultivos primarios normales crecidos en el MCC). Los pozos fueron examinados mediante un microscopio invertido para asegurar que no haya más de un fibroblasto por pozo. Solamente los pozos sembrados con un fibroblasto fueron usados en la selección de clonas para su expansión. Los pozos con evidencia visual de más de un fibroblasto fueron descartados. Las placas fueron incubadas como se indica arriba y el MCCS se cambió cada semana. Cuando las células alcanzaron la confluencia, estas fueron despegadas como se indica arriba y se expandieron en cajas de cultivo de 24 pozos (Linbro, McLean, Virginia) con el MCCS. Posteriormente los

fibroblastos se transfirieron a cajas de cultivo de 25 cm² (Falcon) en el MCCS, cosechados hasta la confluencia y transferidos a cajas de 75 cm² (Costar, Cambridge, MA) en el MCCS. Al llegar a la confluencia los fibroblastos fueron cosechados y ensayados. Los experimentos se realizaron en los clones de un mismo subpase. Las células que no se utilizaron fueron congeladas en nitrógeno líquido y/o re-cultivadas. Todos los experimentos comparativos entre las clonas de fibroblastos de pacientes y de controles se utilizó el mismo lote de SFB. La viabilidad de todos los experimentos fue superior al 95%.

Características de crecimiento *in vitro* del cultivo cantidad de fibroblastos: para cuantificar el crecimiento celular, el cultivo cantidad de fibroblastos se sembró en placas de 96 pozos con 2×10^4 células/pozo. Las células se incubaron desde las 12 horas hasta las 96 horas. En todos los casos, 1 μCi /pozo de timidina tritiada (6.70 Ci/mmol, Dupont, Boston, MA) se añadió durante las últimas doce horas del período total de incubación. Las placas se congelaron y las muestras se ensayaron posteriormente. Las células fueron removidas y colectadas en un cosechador automático de células. La incorporación de timidina tritiada fue detectada mediante un contador beta y los resultados fueron expresados en cuentas por minuto (cpm) como el promedio y la desviación estándar (DE) de 12 pozos.

También se utilizó el índice de proliferación celular: las células fueron sembradas 10^5 células/caja de cultivo de 25 cm² en MCC con 10% de SBF e incubadas 24, 48, 72 y 96 horas de incubación. Al final de cada período de incubación, las células fueron despegadas y contadas en un hemocitómetro. Además se guardó una alícuota para la cuantificación del ADN. El índice de proliferación se obtuvo incorporando el número real de células contadas a las 96 horas en una curva logarítmica estándar. Por ejemplo, si el número de células contadas a las 96 horas fueron 2×10^5 ó 4×10^5 . El índice de proliferación se designó como 2 ó 4 respectivamente. El mismo procedimiento se realizó para las 24, 48, 72 y 96 horas. Las muestras se congelaron para la determinación del ADN.

Características de crecimiento *in vitro* de las clonas de fibroblastos: para examinar el crecimiento celular de las clonas de fibroblastos, se sembraron 10^5 células en 3 ml de MCC en cajas de cultivo de 25 cm². Las células se incubaron por 96 horas a 37 °C, en condiciones antes mencionadas, posteriormente se colocó tripsina-EDTA y se contaron manualmente. Los resultados se expresaron como el índice de proliferación celular, como se indica arriba. Estos experimentos se realizaron por una ocasión y repetidos posteriormente para observar la reproducibilidad. Una alícuota se guardó para la cuantificación del ADN.

Por otro lado, también, se sembraron en placas de 96 pozos con 2×10^4 células/pozo en 200 µl de MCC por 96 horas. La incorporación de timidina tritiada (1 µCi/pozo) se realizó 12 horas antes del tiempo total de incubación (96 horas) y los resultados se expresaron en cpm como el promedio y la DE de tres pozos.

Cuantificación del ADN: del extracto de los cultivos de fibroblastos se obtuvieron 100 µl para la cuantificación del ADN, como describe Labarca y Paigen (112). A los 100 µl se les agregaron 3.9 ml de amortiguador de muestra (Na₃PO₄ 0.05 M, NaCl 2.0 M, 0.4 µg del reactivo de Hoechst 33288, pH 7.4). Además, se preparó un blanco de reactivo y contra éste se leyó en un fluorómetro (Perkin Elmer, USA) a 360 nm de excitación y a 460 nm de emisión. Se realizó una curva de calibración con estándares de ADN para determinar la cantidad de ADN existente en cada muestra.

Conteo celular: para determinar la cantidad de células en los pozos después de cada incubación, previo al experimento de la cuantificación de TIMP-1 y de TIMP-2 se guardó el sobrenadante y se levantó la monocapa con tripsina-EDTA, como se menciona arriba. Se lavó por dos ocasiones con PBS. De la suspensión se tomó una alícuota de 20 µl y se mezcló con 20 µl de azul tripano y se realizó el conteo celular en un hemocitómetro.

Microensayo para la cuantificación de la síntesis de colágena (Incorporación de prolina [¹⁴C]): de los cuatro cultivos primarios de fibroblastos clonados se escogieron seis clonas de cada cultivo de acuerdo a su capacidad de crecimiento (dos clonas de alto crecimiento, dos de

intermedio y dos de bajo crecimiento). Todos los cultivos primarios de fibroblastos como las clonas escogidas se sembraron en placas de 24 pozos con 5×10^5 células/cm² en 0.5 ml de MCC con 10% de SBF e incubadas por 48 horas. El medio fue removido y las células fueron lavadas por dos ocasiones con PBS y se agregaron 0.5 ml de MCC con 2 % de SBF y ácido ascórbico (50 µg/ml), se incubó por tres horas. Posterior a la incubación, el sobrenadante se eliminó y se lavó por dos ocasiones con PBS. Para la incorporación de prolina [¹⁴C] (250 µCi/5 ml, Amersham, UK) se agregaron 50 µl de ácido ascórbico y 1 µCi de prolina [¹⁴C] por pozo y se incubaron por 18 horas, como describe Diegelmann y colaboradores (113, 114) y descrito previamente en detalle (48, 115). Estos experimentos (para el cultivo cantidad) se realizaron por triplicado y para las clonas de fibroblastos se realizaron por duplicado.

Determinación de colágena tipo I y colágena tipo III: los fibroblastos del cultivo cantidad se sembraron en placa de 24 pozos (5×10^5 células/cm²) en 0.5 ml de MCC con 10% de SBF por 48 horas. Posteriormente el medio se eliminó, se lavó por dos ocasiones con PBS, se agregaron 0.5 ml de MCC con 2% de SBF y ácido ascórbico (50 µg/ml) y se incubó por tres horas. Posterior a la incubación, el medio se removió, se agregaron 0.5 ml de MCC con 2% de SBF que contenía 50 µg/ml de ácido ascórbico y 1.25 µCi de prolina [¹⁴C] (Amersham) por pozo y se incubaron por 18 horas en las condiciones antes mencionadas. Las células se sonicaron por 20 segundos, al 40% de potencia de un sonicador (Sonic dismembrator, modelo 50, Fisher Scientific, USA). Del homogenizado de fibroblastos obtenido se tomaron 100 µl para la cuantificación de ADN. El resto del homogenizado, la monocapa y el sobrenadante se trataron con pepsina (0.6 mg/ml, Sigma) en ácido acético 0.5 M y se incubó en agitación vigorosa y constante durante 24 horas a 4 °C. Este homogenizado se precipitó con ácido acético y albúmina bovina sérica a una concentración final de 10 % y 0.03 % respectivamente. Se centrifugó a 13,600 g por 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, se resuspendió en 100 µl de ácido tricloroacético 0.5 M y se dializó contra ácido acético 5 mM a 4°C por 48 horas. Las muestras se normalizaron por la cantidad del ADN y se corrió en condiciones reductoras en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS)

al 7.5% como describe Miller y Rhodes (116). Se realizó la reducción diferencial, para diferenciar de la colágena tipo I y de la colágena tipo III (116). Cuando las muestras migraron 5 mm (cámara de electroforesis, Bio-Rad Miniprotean II) en el gel concentrador, se detuvo la corrida y se agregó 5 μ l de β -mercaptoetanol (Bio-Rad) a cada carril. Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, luego de lo cual se continuó con el corrimiento (a 50 mA para dos geles). Posteriormente, el gel se fijó en metanol/ácido acético/agua (3/1/6) por toda la noche. Se lavó en agua corriente en dos ocasiones. Luego, se incubó con DMSO por cuatro ocasiones por 20 minutos cada vez. Se trató con PPO al 20% en DMSO por una hora, para su intensificación. El gel se secó y se expuso a una película de autorradiografía a -70 °C por 15 días en oscuridad. Se reveló la placa de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Los experimentos de extracción de la colágena y de la electroforesis en reducción diferencial se realizaron por duplicado con similares resultados.

Zimogramas en gelatina: tanto las formas activas como las proenzimas de las MMPs se determinaron mediante el uso del zimograma. Este proceso, por sí mismo, (una desnaturalización de la enzima por electroforesis y una renaturalización antes de la incubación para determinar la actividad) activa varias proenzimas, las cuales pueden ser determinadas (117). Los cultivos primarios de fibroblastos y las clonas escogidas se sembraron en placas de 24 pozos (5×10^4 células/cm²) en 0.5 ml de MCC con 10% de SFB y se incubaron por 48 horas. Luego, el sobrenante se eliminó, se lavó por dos ocasiones con PBS, se añadió 0.5 ml de MCC con 2% de SBF e incubados por 24 horas. Las células se tripsinizaron y se sonicaron como se indica arriba. Se tomaron 100 μ l para la cuantificación del ADN. Las muestras fueron precipitadas con sulfato de amonio concentrado al 60% de saturación y centrifugadas a 13,600 g por 10 minutos a 4 °C. El sobrenandante se eliminó y se resuspendió en 100 μ l de ácido acético 0.5 M por 48 horas. Este extracto se dializó contra ácido acético 5 mM por 48 horas a 4 °C. Cada muestra fue normalizada de acuerdo a la cantidad del ADN y el zimograma se realizó de acuerdo a la técnica de Heussen y Dowdle (118). Brevemente, las muestras activadas [con el ácido fenil

metil mercúrico (APMA), concentración final 1 mM] y no activadas (se agregó agua destilada en vez de APMA) se incubaron en baño maría a 35 °C por 30 minutos, se corrieron en un gel de poliacrilamida al 7.5% y gelatina (Sigma) al 0.125% como sustrato y separadas por electroforesis (a 70 mA para dos geles). Subsecuentemente, los geles se lavaron (Triton X-100 al 2.5%, Sigma) por dos horas en agitación a temperatura ambiente. Luego se incubó por 18 horas a 25 °C con amortiguador (Trisma-base 0.05 M, CaCl₂ 0.005 M, pH 8). Los geles se colorearon con una solución de azul Coomassie y decoloradas con la misma solución sin el colorante hasta que los patrones de las enzimas sean visibles. Las zonas claras contra un fondo azul indican la presencia de las enzimas (principalmente gelatinasas). Las actividades relativas de las gelatinasas de cada muestra se cuantificaron por un scanning densitométrico (Stratagene, Gel Documentation System, GDS 7600, UK) de las bandas claras de los geles coloreados. La actividad relativa de las MMPs de cada muestra se semi-cuantificaron y se expresaron en unidades densitométricas (UD). El peso molecular de las bandas se estimaron usando marcadores de peso molecular como referencia (BioRad). Por otro lado, la actividad gelatinolítica observada representa una verdadera actividad de MMPs, dado que todas las bandas no mostraron su actividad en varios experimentos. En este sentido, los geles se incubaron por 18 horas a 35 °C, en presencia del amortiguador (Trisma-base 0.05 M, EDTA 0.01 M, CaCl₂ 5 mM) (119). Completa inhibición de la actividad enzimática se observó con este amortiguador, lo cual sugiere que la proteólisis es debida a la acción de las MMPs.

Inmunotransferencia (western-blot) para MMP-1, MMP-2 y MMP-3: las muestras fueron preparadas como se indica en el acápite anterior. Las muestras se normalizaron por la cantidad del ADN y se corrieron la electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% con SDS. Las proteínas fueron transferidas sobre papel de nitrocelulosa (0.45 µm, BioRad 162-0115). Las condiciones de la transferencia fueron 100 V, 15 mA (para dos geles) por dos horas en un sistema recirculante de enfriamiento del amortiguador de transferencia (metanol al 20%, glicina 0.192 M y Trisma-base 0.025 M). Se comprobó la transferencia al colorear el papel de

nitrocelulosa con rojo Ponceau. Una vez que se completó la transferencia se retiró el papel de nitrocelulosa y se incubó en una solución de bloqueo [leche descremada (Svelty) al 5% en Trisma-base 100 mM/l, NaCl 150 mM/l, Tween 20 0.1%] por 18 horas a 4 °C en agitación. Posteriormente, se incubaron con la misma solución, pero sin la leche descremada, que contenía el anticuerpo monoclonal cantidad, el cual reconoce las formas latentes y activas de MMP-1 (ratón IgG1, anti-humana, Oncogene Research, Cambridge, MA, catálogo No IM35L) o incubadas con las formas activas y latentes de MMP-2 (ratón IgG1, anti-humana, catálogo No IM33L) o incubadas con las formas activas y latentes de MMP-3 (ratón IgG1, anti-humana, catálogo No IM36L). Se incubó por una hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron por tres ocasiones por 10 minutos con el amortiguador de lavado (Trisma-base 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%, pH 7.5) y luego incubados con el anticuerpo secundario biotinilado (IgG anti-ratón hecho en cabra, Vector Laboratories, Burlingame, CA) por 45 minutos a temperatura ambiente en agitación. Se lavó como se indica arriba y se incubó con la peroxidasa marcada con estreptoavidina (Vector Laboratorios) por 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. Se lavó como se indica arriba y se incubó con el sustrato revelador (DAB 5 mg/ml en el amortiguador de lavado, este se preparó durante el último lavado) aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente con agitación constante, hasta que las muestras o el control positivo mostraron una reactividad bien definida. Finalmente se lavó con agua bidestilada.

Cuantificación de los niveles de TIMP-1 y TIMP-2: para los cultivos primarios de fibroblastos se determinaron los niveles del TIMP-1 y del TIMP-2, mientras que para los clones se determinaron los niveles del TIMP-1. Tanto, para los cultivos primarios de fibroblastos, como las clonas se prepararon como se indica arriba. Luego de la incubación por 24 horas en MCC con 2% de SBF, se recolectó el sobrenadante y se clarificó por centrifugación. Las células se tripsinizaron y se contaron en un hemocitómetro. La concentración del TIMP-1 y de TIMP-2 fue determinada mediante dos kits de ELISA (Fuji Chemical Industries, Takoaka, Japan) que tienen dos anticuerpos monoclonales contra TIMP-1 y TIMP-2 humanos, respectivamente. La

metodología se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los datos se muestran como el promedio \pm DE de dos pozos por duplicado y se informó como la concentración del TIMP-1 y/o TIMP-2 normalizados por la cantidad de células (en $\text{ng}/10^5$ células).

Análisis estadístico: se realizó estadística descriptiva calculando promedio, desviación estándar (DE), intervalo mínimo y máximo (min-máx) y error estándar (EE). Para la comparación intergrupar se utilizó la prueba de U de Mann-Whithney. Para estudiar la asociación de variables se utilizó la prueba de correlación de Spearman. Para los datos de distribución normal se utilizaron pruebas paramétricas (prueba de t de Student y la correlación de Pearson). Se consideró significativo un valor de p inferior a 0.05 (dos colas).

VII. RESULTADOS

Características de los pacientes:

Las características demográficas fueron similares entre los casos y los controles (Tabla 2). Todos los pacientes fueron mestizos con un promedio de edad de ($X \pm \text{DE}$, min-máx) 39 ± 12 , 20 a 61 años; con una relación femenino/masculino (F/M) de 9/1 (F: 90%). La evolución de la enfermedad fue de 4.95 ± 4 , 1.5 a 13 años. Seis pacientes tuvieron menos de 2.5 años de evolución de la enfermedad (2.08 ± 0.37 , de 1.5 a 2.5 años) y cuatro tuvieron menos de 13 años (9.25 ± 2.6 , 7 a 13 años). Los controles fueron mestizos, con un promedio de edad de 36 ± 9.8 , de 23 a 52 años; con una relación F/M: 6/1 (F: 86%).

Tabla 2. Datos demográficos de pacientes con Esclerosis Esclerodermia y de controles.

CODIGO PACIENTE	EDAD/ SEXO	EVOLUCIÓN (años)	SITIO DE BIOPSIA	CODIGO CONTROL	EDAD/ SEXO	SITIO DE BIOPSIA
A*	28/M	2	ANTEB. DER.	A' *	31/M	ANTEB DER
B	36/F	2	BRAZ. IZQ	B'	35/F	BRAZ IZQ
C	34/F	1.5	BRAZ DER	C'	34/F	BRAZ DER
D*	20/F	2.5	ANTEB IZQ.	D' *	23/F	ANTEB. IZQ.
E	29/F	2.5	ANTEB. IZQ	E'	32/F	ANTEB .IZQ.
F	42/F	2	PIERNA DER.			
G	52/F	7	MUÑEC. IZQ.	G'	52/F	MUÑECA IZQ.
H	45/F	8	ANTEB DER	H'	46/F	ABDOMEN
I	43/F	9	ANTEB DER			
J	61/F	13	MUÑEC. DER.			
X±DS	39±12	4.95±4			36±9.8	
LIMITE	20-61	1.5-13			23-52	
SEXO	90% F				86 %F	

* Cultivos primarios de fibroblastos que fueron clonados. F= femenino.

Características clínicas de los pacientes:

De acuerdo a la valoración clínica y de laboratorio, se evaluó la afección pulmonar, gastrointestinal, renal, cardíaca, muscular y la pérdida digital. También se evaluaron anticuerpos antinucleares (ANA), anti-topoisomerasa-1 (anti-Scl-70), anti-centrómero (ACA), factor reumatoide (FR) y niveles de inmunoglobulinas séricas. Todos los pacientes tuvieron por lo menos un órgano afectado (siete tuvieron afectación gastrointestinal, seis con afección pulmonar, uno renal y otro con afección muscular). Nueve pacientes tuvieron por lo menos un autoanticuerpo presente; y un paciente no presentó autoanticuerpos. Las características clínicas y de laboratorio de los pacientes estudiados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos clínicos y de laboratorio de pacientes.

Pacientes	Sistema afectado		Valores de laboratorio				
			HG	ANA	ACA	Scl-70	FR
A	GI		no	-	-	+	-
B	P,GI	si		+	+	-	+
C	GI		no	-	-	-	-
D	GI,P		no	+	-	-	+
E	GI,P		si	+	-	+	+
F	P,R		no	+	-	+	+
G	GI,M		si	-	-	+	+
H	GI	si		-	+	-	-
I	P	si		+	-	+	-
J	P		no	-	-	+	+

HG= hipergammaglobulinemia, ANA= anticuerpos antinucleares, ACA= anticuerpos anti-centrómulo, Scl 70= anti-topoisomerasa 1, FR= factor reumatoide, P= pulmonar, GI= gastrointestinal, R= renal, M= muscular.

Cuantificación del ADN:

La cantidad total del ADN de los fibroblastos en cultivo se cuantificó como se describe en materiales y métodos. La comparación entre los grupos se determinó en pases similares (entre el segundo y el sexto). La cantidad total del ADN de los cultivos cantidades de fibroblastos con EGP fue de $5.46 \pm 0.48 \mu\text{g}$ total (min-máx 4.8 a 6.3); mientras que en los controles fue de $4.47 \pm 0.71 \mu\text{g}$ total (3.7 a 5.9) ($p < 0.05$). Estos experimentos se llevaron a cabo a las 69 ± 2 horas de incubación. Estos datos se muestran en la figura 2.

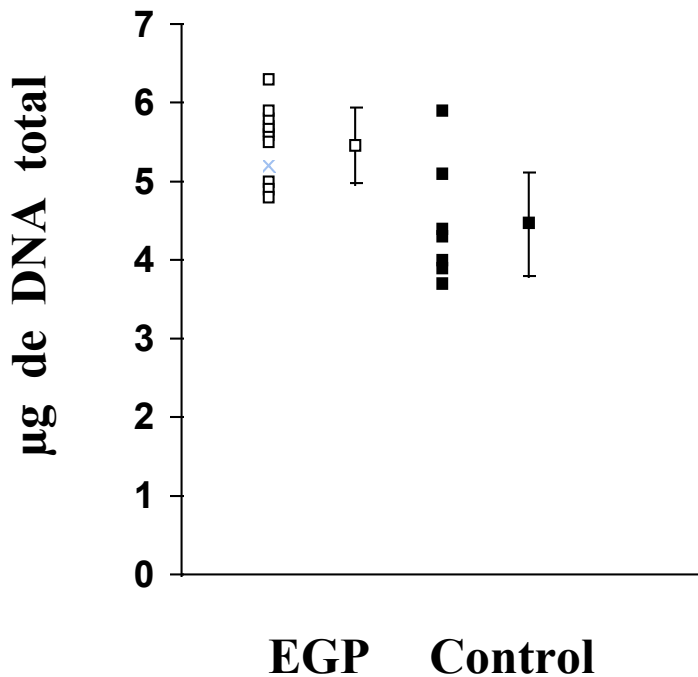


Figura 2. Cuantificación del ADN. Los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP (n=10, cuadrado abierto) y de los controles (n=7, cuadrado cerrado) se cuantificaron de acuerdo a la técnica de LaBarca y Paigen. Se observa un incremento en la cantidad del ADN en los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP ($p < 0.05$). El tiempo de incubación fue de 69 ± 2 horas.

Debido a que los cultivos de fibroblastos de pacientes con EGP tuvieron un aumento en la cantidad del ADN que se asocia al incremento en la proliferación celular, fue necesario normalizar en contenido del ADN total en cada experimento.

Características de crecimiento *in vitro* de los cultivos primarios:

El índice de proliferación de los cultivos primarios de fibroblastos de los 10 pacientes con EGP y de los siete controles fue determinado mediante el conteo celular. Se observó un incremento en el índice de proliferación en los cultivos primarios de pacientes con EGP, cuando se comparó con los controles.

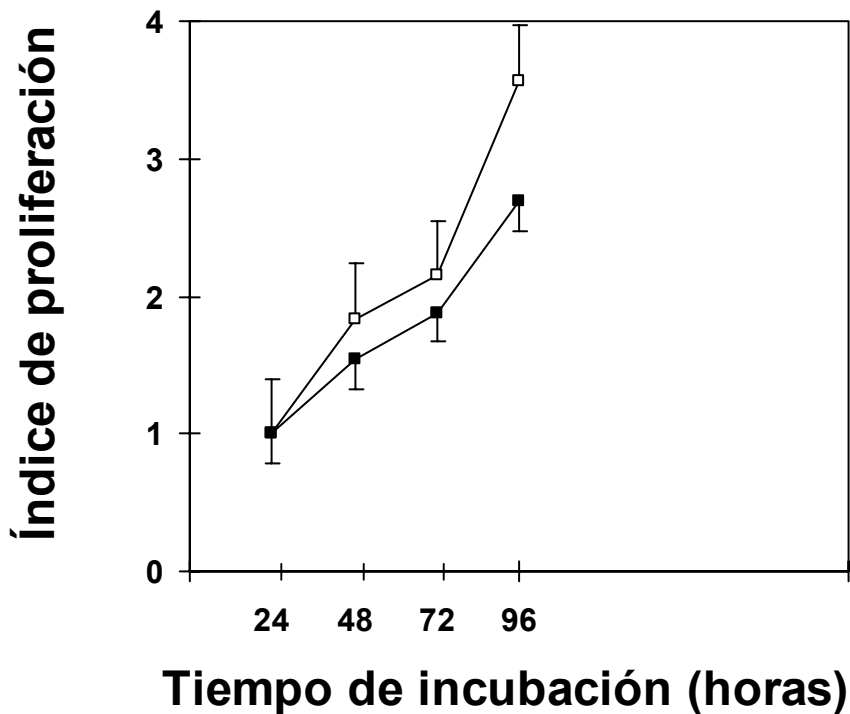


Figura 3. Curva de proliferación celular *in vitro* realizada mediante el conteo celular. Los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP (n=10, cuadrado abierto) y de controles (n=7, cuadrado cerrado). Los resultados se expresan como el promedio \pm DE. Los asteriscos indican *p=0.002, **p<0.002, ***p=0.003, respectivamente.

Existe una diferencia significativa entre los cultivos primarios de pacientes con EGP a las 48, 72 y 96 horas de incubación (1.84 ± 0.12 , 2.15 ± 0.26 , 3.37 ± 0.34 , respectivamente) y los controles (1.54 ± 0.14 , 1.98 ± 0.2 , 2.69 ± 0.44 , respectivamente) (p=0.002, p<0.002, p=0.003, respectivamente). Estos datos se observan en la Figura 3.

El crecimiento de los cultivos primarios de fibroblastos también se evaluó midiendo la cantidad del ADN. Al igual que con el conteo celular se observó un incremento en la cantidad del ADN en los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP (n=10) a las 48, 72 y 96 horas de incubación (5.15 ± 0.52 , 6.3 ± 0.56 , 7.38 ± 0.51 μ g de ADN total, respectivamente)

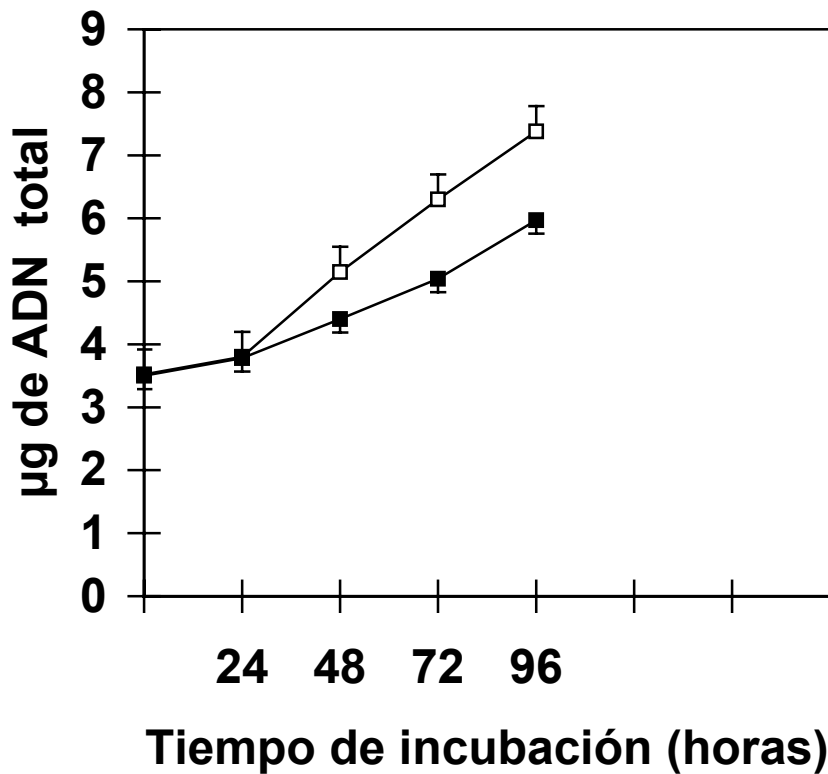


Figura 4. Curva de proliferación de los cultivos primarios mediante cuantificación del ADN. La proliferación se cuantificó mediante la técnica de LaBarca y Paigen, tanto en los cultivos primarios de fibroblastos de EGP (n=10, cuadrado abierto) como de los controles (n=6, cuadrado cerrado). Los resultados se expresan como el promedio \pm DE.

y los controles (n= 6) (4.4 ± 0.55 , 5.04 ± 0.64 , 5.97 ± 0.68 μg de ADN total, respectivamente)

($p=0.02$, $p=0.002$, $p=0.002$, respectivamente. Estos datos se observan en la Figura 4.

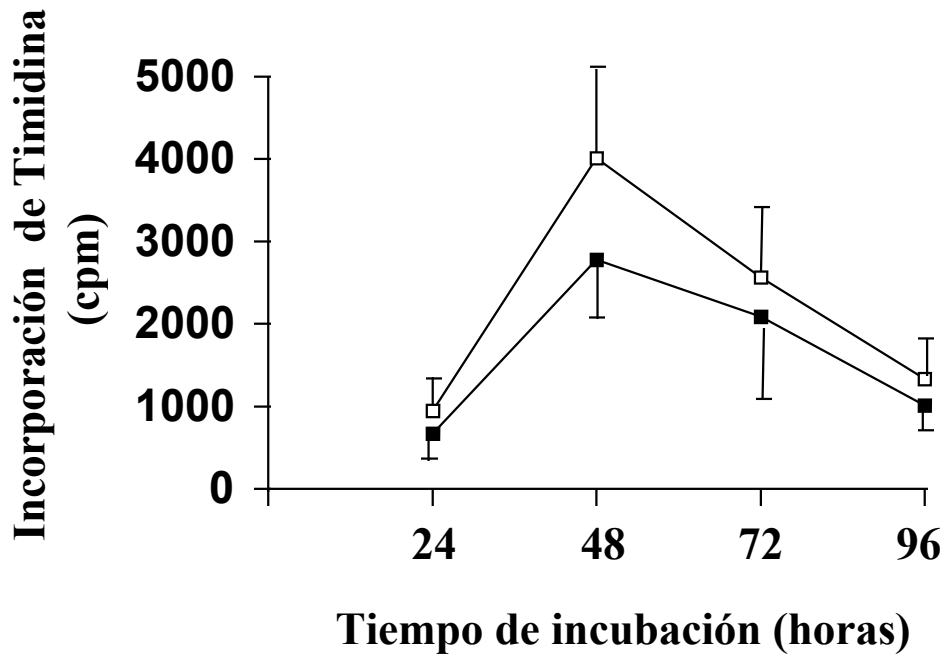


Figura 5. Incorporación de timidina tritiada de los cultivos primarios de fibroblastos. Los resultados se expresan como el promedio \pm DE de cultivos primarios de pacientes con EGP (cuadrado abierto) y de controles, $n = 5$ (cuadrado cerrado). A Las 48 horas de incubación se observa diferencia estadística ($p < 0.05$, control vs. EGP).

La curva de incorporación de timidina fue realizada en cultivo cantidad de fibroblastos de 8 pacientes con EGP y en cinco controles. El patrón de incorporación de la timidina en relación al tiempo, tanto en el cultivo cantidad de fibroblastos de pacientes como de controles fue similar, excepto en los valores correspondientes a las 48 horas de incubación (Figura 5), donde se observó un pico de incorporación de timidina. En general, los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP proliferan más que sus controles. Una diferencia estadística se observó entre

la incorporación de timidina en los fibroblastos de pacientes ($4,013 \pm 1,209$ cpm) y los fibroblastos controles ($2,775 \pm 478$ cpm) a las 48 horas de incubación ($p < 0.05$) (Figura 5).

Características del procedimiento de la clonación:

La eficacia de la clonación, a partir de los cultivos primarios de fibroblastos se muestra en la Tabla 4. La clonación de los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP fue similar a los controles, aunque existió una mejor clonogenicidad en los cultivos primarios de fibroblastos controles. Esta diferencia no es estadísticamente significativa entre los fibroblastos de pacientes y los controles (2.98 % vs 3.38 %, de clonas recuperados respectivamente, $p > 0.05$). Las clonas recuperadas a partir de los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes fueron 23 y 20, mientras que para los cultivos primarios de fibroblastos controles fue de 22 y 17 clonas.

Tabla 4. Eficacia de clonación de los cultivos de fibroblastos.

LÍNEA CÓDIGO	POZOS SEMBRADOS(1) n	CLONAS EXPANDIDAS(2) n	CLONAS (3) n
A ' (4)	576	30 (5.2%)	22 (3.8%)
D' (4)	576	27 (4.68%)	17 (2.95%)
A (5)	768	27 (4.68%)	23 (2.99%)
D (5)	672	26 (3.86%)	20 (2.97%)

(1) Se sembró la densidad celular de < 0.5 células/pozo

(2) Clonas transferidas a placas de 24 pozos

(3) Clonas transferidas a frascos de cultivo (25 cm²)

(4) Cultivo primario de fibroblastos de controles

(5) Cultivo primario de fibroblastos de pacientes

Características de crecimiento *in vitro* de las clonas de fibroblastos:

Las características proliferativas *in vitro* se identificaron mediante conteo celular en 43 clonas derivadas de los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP (A y D) y en 39 clonas derivadas de fibroblastos de controles (A' y D') (Figura 6). Existió una marcada heterogeneidad en el índice de proliferación tanto en las clonas derivadas de pacientes como las controles (Figura 6).

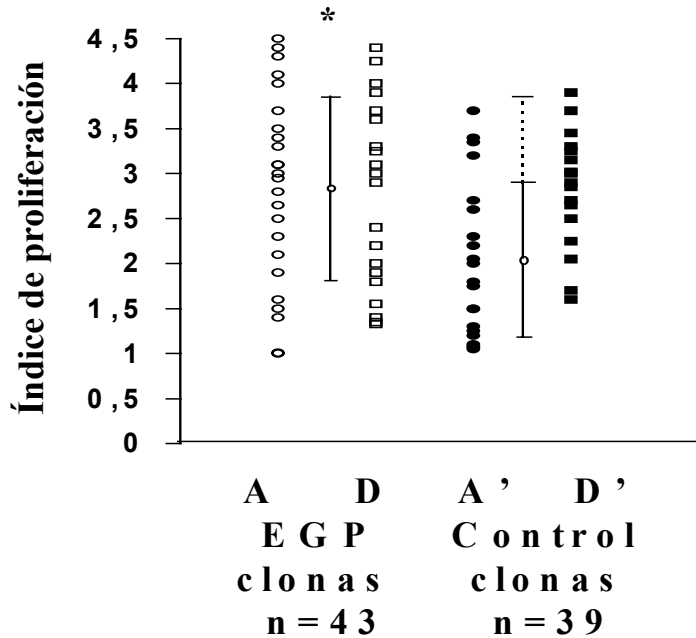


Figura 6. Índice de proliferación de 43 clonas de fibroblastos de EGP (círculos y cuadrados abiertos) y de 39 clonas de fibroblastos controles (círculos y cuadrados cerrados). El eje vertical indica el índice de proliferación a las 96 horas. La comparación estadística se realizó con la prueba t de Student. El asterisco indica $p < 0.05$, entre las clonas de EGP y controles. La barra sólida indica el promedio \pm DE y la línea discontinua indica 2 DE. A y D son los códigos de los pacientes con EGP, los cultivos primarios de estos pacientes fueron clonados (ver Tabla 2). A' y D' son los códigos de los sujetos controles, los cultivos primarios de estos sujetos fueron clonados (ver Tabla 2). DE = Desviación estándar.

El índice de proliferación varió de 1 a 4.5 en las clonas derivadas de pacientes; y en controles variaron de 1 a 3.9 (Figura 6). El promedio del índice de proliferación en las clonas derivadas de los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP fue de 2.84 ± 1 , este promedio fue mayor comparado con las clonas de fibroblastos de controles (2.09 ± 0.87 , $p < 0.05$, Figura 6). Diez clonas, 9 derivadas de fibroblastos de pacientes con EGP y una derivada de controles, tuvieron un índice de proliferación superior a 2 DE del promedio del índice de proliferación de las clonas controles (Figura 6). Estas clonas se denominaron de rápido crecimiento que

corresponden a 5 clonas (21.7%) derivadas del cultivo cantidad de fibroblastos obtenida del paciente A y 4 clonas (20%) derivadas del cultivo cantidad de los fibroblastos del paciente D. Por otro lado, tres clonas derivadas de los controles, que estuvieron cerca de 2 DE (3.7, 3.7 y 3.4 respectivamente) fueron también consideradas de rápido crecimiento. Las clonas, cuya proliferación fue similar al promedio de su cultivo cantidad (*i.e.* $1,93 \pm 0.3$) fueron consideradas como clonas de crecimiento intermedio (1.75, 1.8, 1.8, 1.85, 1.9). Las clonas de lento crecimiento se consideraron aquellas cuyo índice de proliferación fue inferior a 1.4.

En la Figura 7, se observa la cuantificación del ADN de las 43 clonas de fibroblastos derivados de pacientes y de las 39 clonas normales, a las 96 horas de incubación. El contenido de ADN de las clonas controles fue de 5.79 ± 1.6 μg de ADN total; mientras que en las clonas de pacientes fue de 6.89 ± 2.21 μg de ADN total ($p < 0.05$, Figura 7). Once clonas, 10 derivadas de fibroblastos de pacientes con EGP y 1 derivada de controles, tuvieron un índice de proliferación superior a 2 DE del promedio de contenido total del ADN de las clonas controles (Figura 7). Estas clonas se denominaron de rápido crecimiento y fueron las mismas clonas que tuvieron un crecimiento rápido en el índice de proliferación. Hubo una buena correlación entre el contenido del ADN y el conteo celular ($r=0.87$). También se observa una amplia heterogeneidad en el contenido del ADN, tanto en clonas de pacientes como de controles. Las clonas de controles varió entre 3.55 a 9.2 μg de ADN total, mientras que las clonas de pacientes varió de 3.6 a 11.5 μg de ADN total (Figura 7).

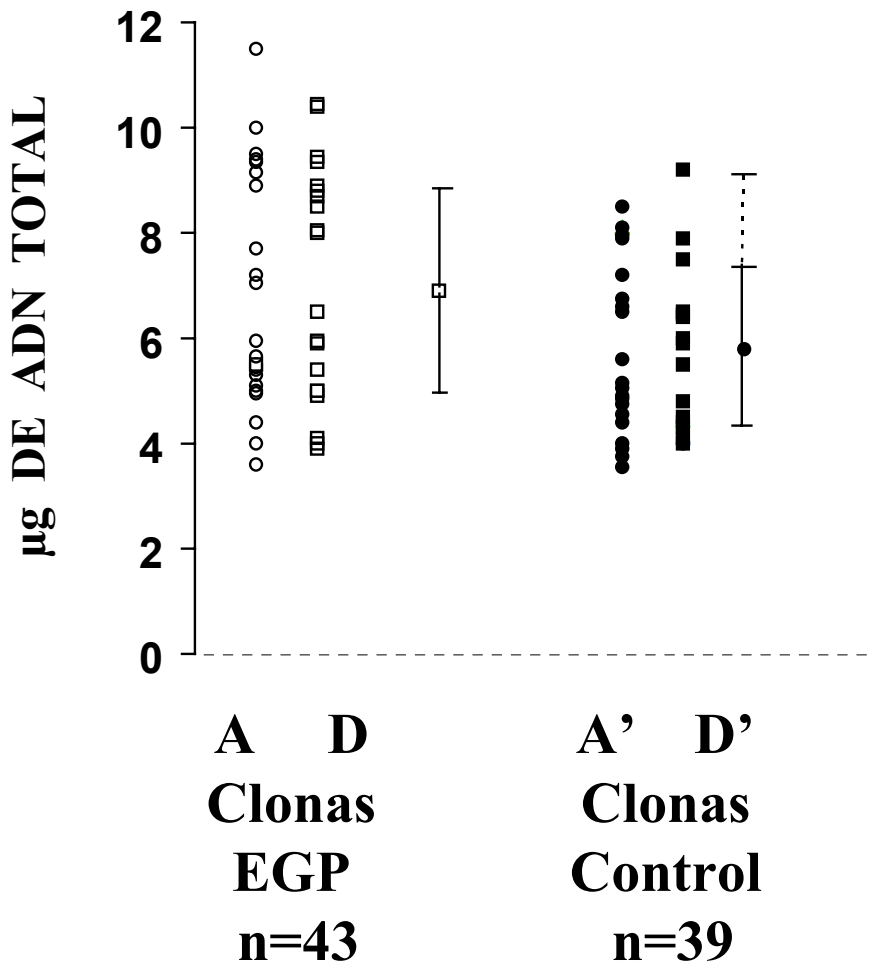


Figura 7. Cuantificación del ADN en las clonas. Cuarenta y tres clonas de fibroblastos de pacientes con EGP (círculos y cuadrados abiertos) y de 39 clonas de fibroblastos controles (círculos y cuadrados cerrados) fueron cuantificadas en el contenido de ADN. El eje vertical indica el número de células que se duplicaron durante las 96 horas en incubación. La comparación estadística se realizó con la prueba t de Student. Hubo diferencia estadística ($p < 0.05$) entre las clonas de EGP y los controles. La barra sólida indica el promedio \pm DE y la línea discontinua indica 2 DE. Los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP se designaron como A y D y fueron los que se clonaron. Mientras que se designó como A' y D' a los sujetos controles.

El crecimiento de 15 clonas de fibroblastos obtenidas de un paciente (A) y de 14 clonas de fibroblastos de su control (A') se determinó mediante la incorporación de timidina tritiada a las 96 horas de cultivo como se indica en Materiales y Métodos. El promedio de la incorporación de

timidina de las clonas de fibroblastos obtenidas del paciente A fue de $1,208 \pm 629$ cpm, mientras que sus clonas controles (sujeto A') fue de 964 ± 775 cpm ($p < 0.05$, Figura 8). En la figura 8 se observa heterogeneidad tanto en las clonas obtenidas de los fibroblastos del paciente A como las clonas del control A'. La incorporación de timidina de las clonas derivadas de los fibroblastos obtenidos del paciente A varió de 528 a 3,100 cpm; y en las clonas controles (sujeto A') varió de 237 a 2,769 cpm (Figura 8).

I
N
C
O
R
P
O
R
A
C
I
O
N

D
E

T
I
M
I
D
I
N
A
T
R
I
T
I
A
D
A

(
C
P
M)

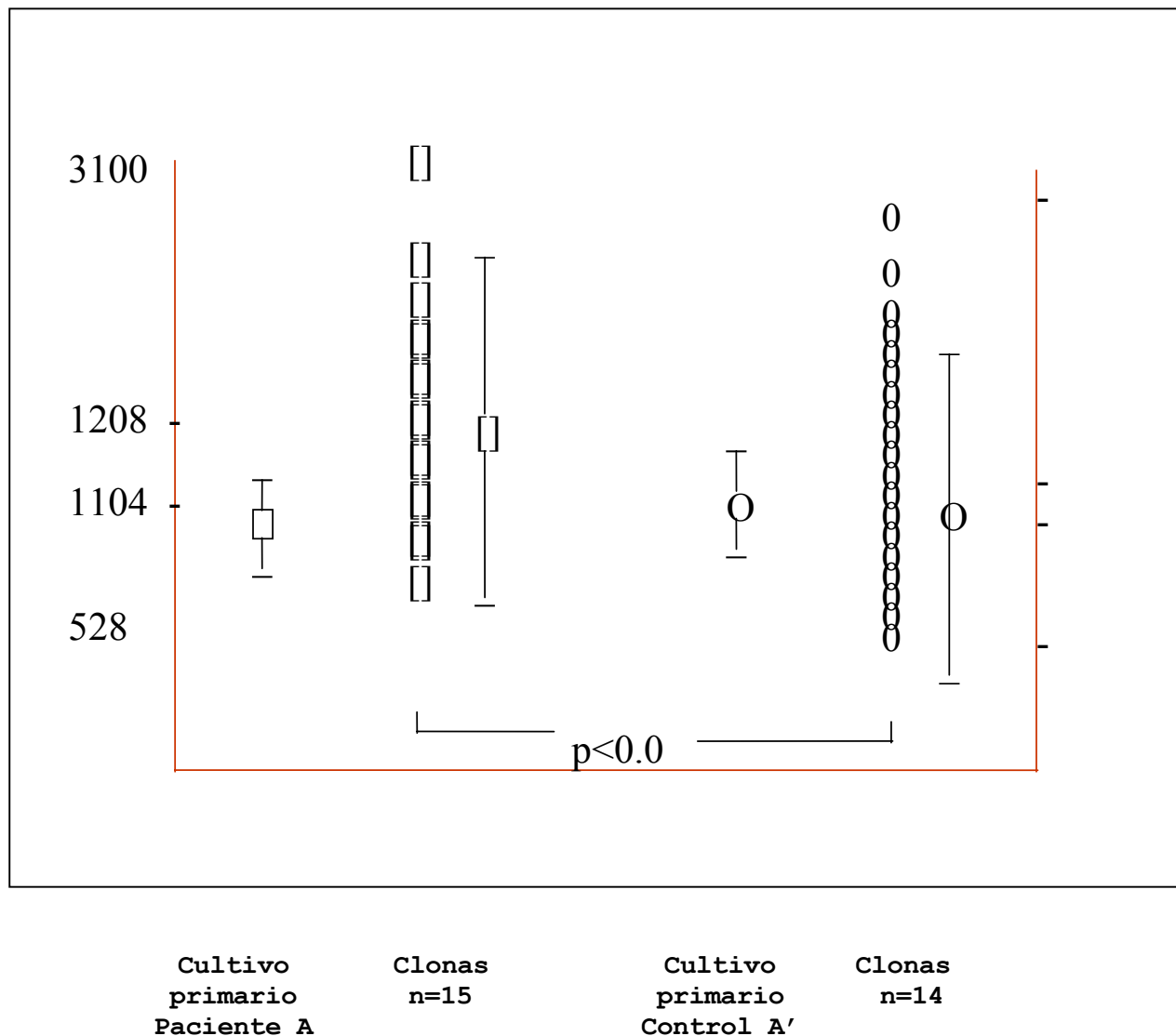


Figura 8. Crecimiento *in vitro* de las clonas de fibroblastos obtenidos del paciente A y su control A', mediante la incorporación de timidina tritiada. Los resultados se expresan como el promedio \pm DE, tanto del cultivo cantidad como la de sus clonas. cpm= cuentas por minuto.

La reproducibilidad de la tasa de crecimiento se determinó en 34 clonas (15 clonas derivadas de fibroblastos de pacientes y 19 clonas controles). Las clonas escogidas tuvieron un amplio intervalo de proliferación, ellas se estudiaron luego de varios pases y también congeladas en nitrógeno líquido. Algunas clonas, caracterizadas especialmente por su crecimiento lento, no se pudieron mantener en cultivo por períodos largos. Estas clonas se perdieron después de aproximadamente 15 pasajes debido, probablemente, a la manipulación y/o a la senescencia natural del fibroblasto. En la primera ocasión, el promedio del crecimiento de las 34 clonas fue de 2.76 ± 1.13 , mientras que en la segunda ocasión el promedio fue de 2.46 ± 1.04 . Los resultados de cada clona individual de las 34 clonas incluidas en estos experimentos se observa en la Figura 9. El coeficiente de correlación de Pearson entre estos experimentos fue de 0.68 ($p < 0.05$).

Por otro lado, hubo una buena correlación entre el índice de proliferación celular *in vitro* y la incorporación de timidina tritiada de las 14 clonas derivadas de los fibroblastos obtenidos del control A¹, a las 96 horas de incubación (a pesar de haber sembrado en número diferente de células, como se indica en Materiales y Métodos). La correlación de Spearman fue de 0.75 ($p < 0.05$). También se observó una buena correlación entre el índice de proliferación celular *in vitro* y la incorporación de timidina tritiada de las 15 clonas derivadas de los fibroblastos obtenidos del paciente A ($r_s = 0.54$, $p < 0.05$).

Síntesis de colágena:

Se determinó el porcentaje relativo de producción de colágena mediante la incorporación de [¹⁴C]-prolina, en los diez cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP, en los siete cultivos primarios de fibroblastos controles y en 6 clonas de cada línea que se clonó, de acuerdo a la proliferación celular (dos de alta proliferación, dos de intermedia y dos de baja proliferación, $n = 24$).

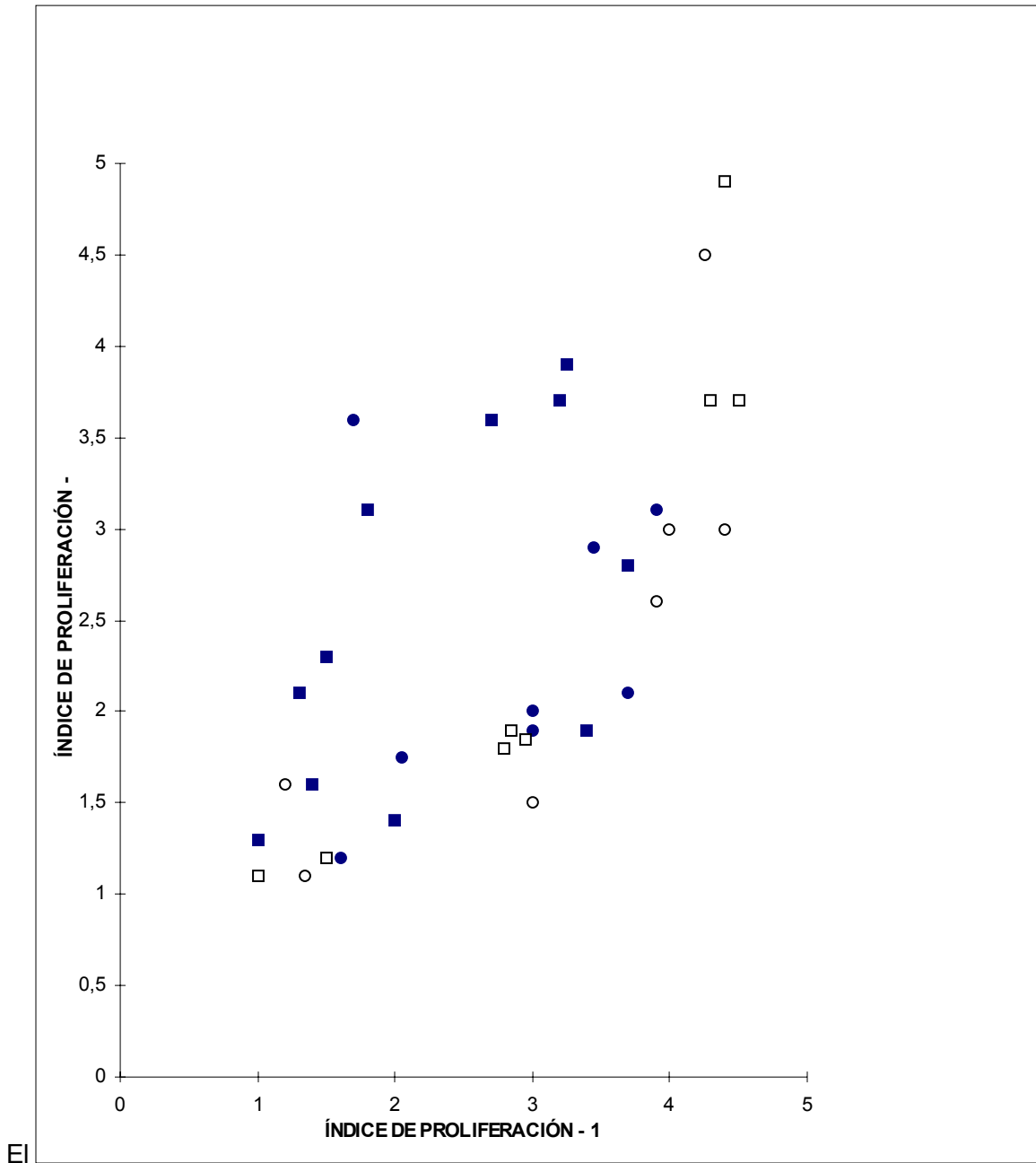


Figura 9. Estudio de Reproducibilidad. El eje de la "x" representa el índice de proliferación de 34 clones cuando se examinaron inicialmente. El eje de la "y" representa los resultados obtenidos de las mismas 34 clones luego de experimentos repetidos. Los cuadrados y los círculos abiertos representan a las clones de pacientes con EGP. Los cuadrados y los círculos cerrados representan a las clones controles.

El promedio del porcentaje relativo de producción de colágena en los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes fue de 9.33 ± 2.68 (5.4 a 13.6); mientras que los cultivos primarios de controles fue de 5.4 ± 1.1 (4.3 a 7.4, $p=0.002$, Figura 10).

Los siete cultivos primarios de fibroblastos de pacientes tuvieron un aumento de producción de la colágena comparados a los controles (Figura 10). Los pacientes con EGP (n=6) de corta evolución (>2.5 años de evolución de la enfermedad) tuvieron un mayor porcentaje relativo de producción de colágena (10.34 ± 2.36) al compararlos con los pacientes con EGP (n=4) de corta evolución (7.81 ± 2.67). Aunque esta diferencia no tuvo significancia estadística ($p=0.086$).

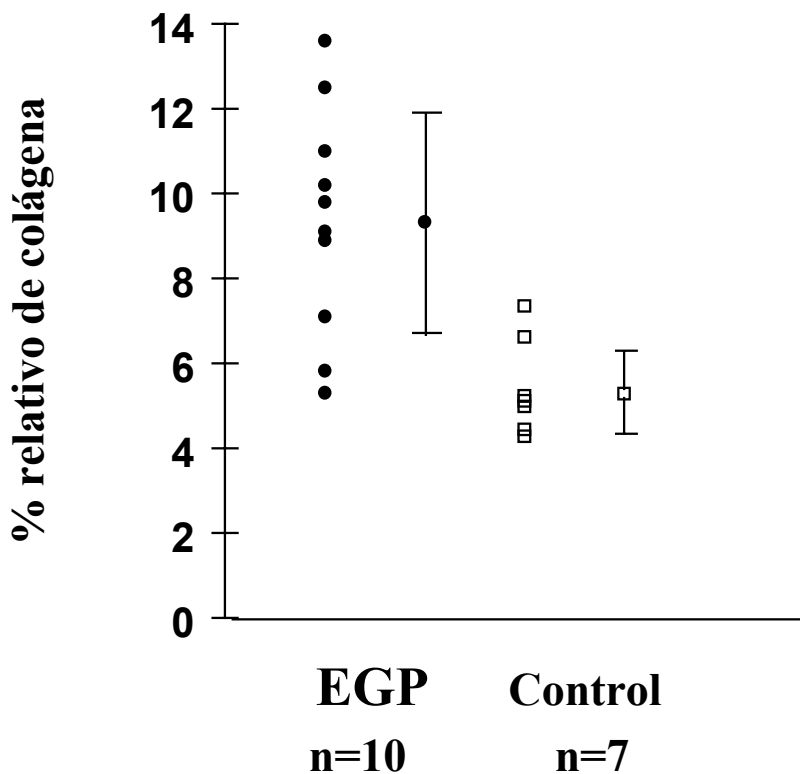


Figura 10. Síntesis de colágena en los cultivos primarios de fibroblastos de EGP y de controles. Los cultivos primarios de fibroblastos de EGP (círculos cerrados) producen significativamente más colágena que los cultivos primarios controles (cuadrados abiertos). $p=0.002$.

Los pacientes con EGP de corta evolución tuvieron mayor porcentaje de producción de colágena al comparar con el grupo control ($p=0.026$). Alteraciones en la síntesis de colágena en relación a la duración de la enfermedad se muestran en la figura 11 en comparación con los controles.

El promedio del porcentaje relativo de producción de colágena de las doce clonas de fibroblastos derivadas de los dos cultivos primarios de pacientes con EGP fue de 9.93 ± 3.94 ,

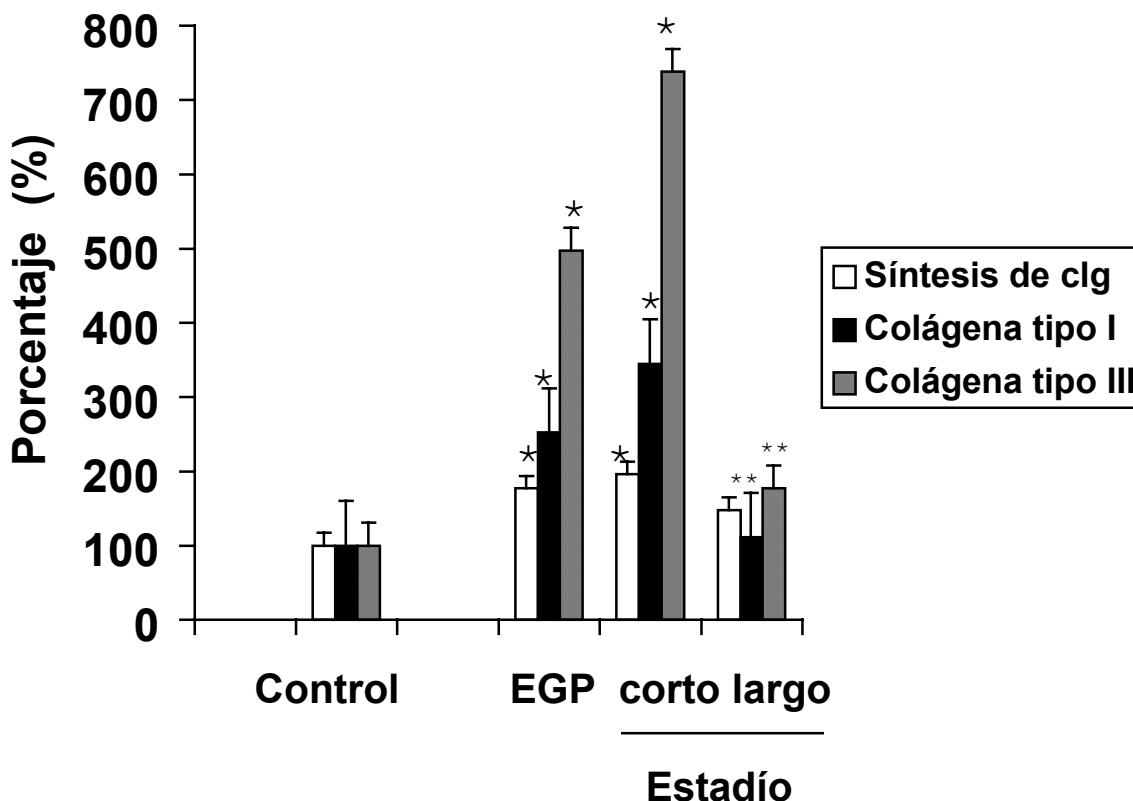


Figura 11. Alteración de la síntesis de colágena, expresión de colágena tipo I y tipo III en fibroblastos de EGP en relación a la evolución de la enfermedad: corta (menos de 2.5 años) y larga (7 a 13 años). La síntesis y la expresión fueron cuantificadas como se describe en materiales y métodos. Los valores se expresan en porcentaje ($X \pm EE$) de los datos de cada muestra, en relación al grupo control (100%). * $p < 0.05$ contra el grupo control (Prueba U de Mann-Whitney). ** $p < 0.05$ corto estadio vs. largo estadio (Prueba U de Man-Whitney). Clg=colágena.

mientras que en las 12 clonas de fibroblastos derivados de las dos cultivos primarios de controles fue de 4.94 ± 2.02 (Figura 12, $p < 0.05$). Junto a esta diferencia estadística entre las clonas de pacientes y los controles, también se observó heterogeneidad en la síntesis de colágena, tanto

en clonas de pacientes como de controles (Figura 12). Esta varió de 3.09 a 16.44 en las clonas de pacientes, mientras que en las clonas de controles varió de 2.1 a 9.6.

La mayoría de las clonas de pacientes eran altos productores de colágena, aunque dos clonas producían cantidades bajas.

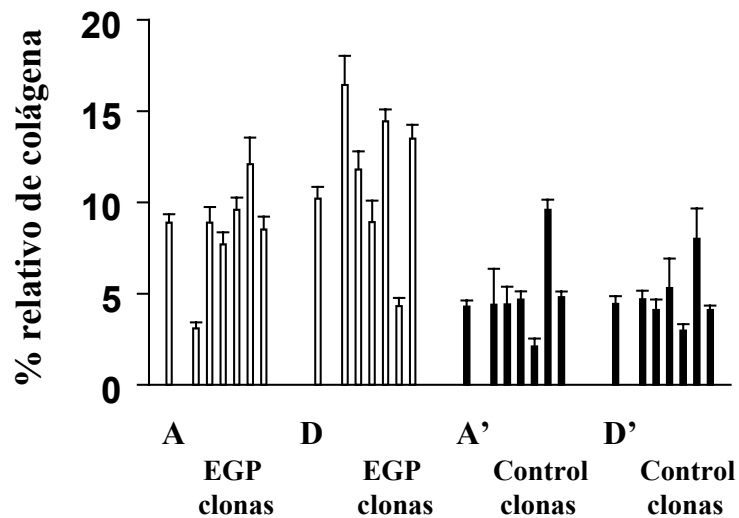


Figura 12. Síntesis de colágena de las clonas de fibroblastos de pacientes con EGP (n= 12) y de controles (n= 12). A y D son los cultivos primarios primarias de pacientes con EGP. A' y D' son los cultivos primarios primarias de controles. Las clonas de fibroblastos de pacientes con EGP producen significativamente más que las clonas controles (p<0.05).

Por lo general, las clonas normales producían cantidades inferiores o similares en relación a sus cultivos primarios, aunque dos clonas fueron altas productoras de colágena. Estos datos se observan en la Figura 12. No encontramos relación entre la proliferación celular y la producción de colágena.

Identificación de colágena tipo I y colágena tipo III en los cultivos primarios de fibroblastos:

Los fibroblastos normales producen principalmente colágena tipos I y III y también otros tipos de colágena. Para determinar los tipos de colágenas que sintetizan en los cultivos primarios de fibroblastos, los homogenados obtenidos de los cultivos se analizaron mediante reducción retardada por la adición de beta-mercapto etanol a SDS-PAGE y autorradiografiados. La semicuantificación de la producción de colágena tipo I en los cultivos de fibroblastos de pacientes con EGP fue de $87,524 \pm 78,493$ DU, mientras que en los controles fue de $34,783 \pm 55,532$ DU ($p=0.02$). Los fibroblastos de pacientes con EGP de corta evolución producen más colágena tipo I que los de larga evolución y los del grupo control ($120,154 \pm 86,617$ DU, $38,570 \pm 1560$ DU, $34,783 \pm 55,532$ DU; $p=0,033$, $p=0,026$; respectivamente). No se encontró diferencia significativa entre la producción de colágena tipo I entre los pacientes de larga evolución y el grupo control ($38,570 \pm 25,609$ DU vs $34,783 \pm 55,532$ DU; $p=0,055$). La semicuantificación de la producción de colágena tipo III en los cultivos de fibroblastos de pacientes con EGP fue de $16,571 \pm 13,729$ DU, mientras que en los controles fue de $3,331 \pm 2,311$ DU ($p=0.024$). Los fibroblastos de pacientes de corta evolución producen más colágena tipo III que en los de larga evolución ($24,581 \pm 12,693$ DU vs $5,891 \pm 4,941$ DU, $p=0,057$) y del grupo control ($24,581 \pm 12,693$ DU vs $3,331 \pm 2,311$ DU, $p=0,008$). No se observó diferencia en los fibroblastos de pacientes de larga evolución y el grupo control ($5,891 \pm 4,941$ DU vs $3,331 \pm 2,311$ DU, $p=0.286$).

La expresión de colágena tipo I y tipo III en relación al estadio de la enfermedad se muestra en la figura 11. La relación colágena tipo I/colágena tipo III en los fibroblastos de pacientes con EGP fue de 10.2 ± 7.7 , mientras que en el grupo control fue de 11.1 ± 6.8 ($p=0.438$). No se observó diferencias significativas entre los pacientes de corta evolución con respecto a los de larga evolución.

Actividad de las metaloproteasas:

La actividad de las metaloproteasas se realizó en los diez cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP, en los siete cultivos primarios de fibroblastos controles y en 21 clonas derivadas de los cuatro cultivos primarios que fueron clonadas, de acuerdo a la proliferación celular. Inicialmente, el análisis de la actividad de las gelatinasas se determinó mediante zimogramas. Tanto los cultivos primarios como las clonas de fibroblastos de pacientes y de controles presentan 5 bandas de actividad gelatinolítica en el zimograma. Una banda sobre los 97 kDa, la cual corresponde a los productos diméricos y/o multímeros de las MMPs; otras de aproximadamente 92 kDa, 72 kDa, una banda amplia de aproximadamente 60 kDa y otra de 45 kDa. Para determinar si estas enzimas gelatinolíticas eran metaloproteasas, las muestras de fibroblastos (tanto los cultivos primarios como las clonas) fueron incubadas en presencia de un amortiguador (10 mM de EDTA/ 50 mM de Tris HCl/ 5 mM de CaCl_2). Una completa inhibición de la actividad enzimática se observó con este inhibidor de las metaloproteasas, sugiriendo que la proteólisis es mediada por la acción de las metaloproteasas. La inmunotransferencia se realizó para determinar la presencia de las MMPs. No se observó la presencia de MMP-2, MMP-3 en las muestras estudiadas. La presencia de la MMP-1 se detectó en los cultivos primarios como en las clonas de pacientes con EGP y en controles mediante la inmunotransferencia.

La actividad relativa de cada banda se determinó mediante densitometría. Con respecto a la gelatinasa de 92 kDa, no se encontró diferencia significativa entre los fibroblastos de pacientes con los sujetos controles ($p > 0.05$). Pero se observó un aumento en la expresión de esta gelatinasa en los controles con respecto a los pacientes ($3,594 \pm 1,820$ vs $3,092 \pm 1,554$ DU, respectivamente). Tampoco se encontró diferencias significativas entre los pacientes de corta evolución con los de larga evolución y con los controles. En relación a la gelatinasa de 72 kDa, no se observó diferencias significativas entre los fibroblastos de pacientes con los controles ($1,680 \pm 697$ vs $1,817 \pm 747$ DU, $p > 0.05$). Aunque se observó un ligero aumento en la expresión de la gelatinasa de 72 kDa en pacientes con larga evolución con respecto a los de corta

evolución ($1,790 \pm 766$ vs $1,611 \pm 712$ DU, $p>0.05$). La alteración en la expresión de las gelatinasas (92 y 72 kDa) en relación al estadio de la enfermedad se muestra en la figura 13.

Debido a que la gelatinasa de 72 kDa es un producto constitutivo de los fibroblastos y en estos experimentos se observó poca expresión. Existe la posibilidad de que la banda de aproximadamente 60 kDa contenga otros componentes [i.e. 57 kDa (MMP-1), 60,57 kDa (MMP-3)] o que exista otras bandas con actividad gelatinolítica. Al realizar los zimogramas, bajo las mismas condiciones antes mencionadas, y diluir la muestra (1:3), se observó dos bandas con actividad gelatinolítica de aproximadamente de 62 kDa y 50 kDa.

En relación a los cultivos primarios de fibroblastos se observó: con respecto a la banda amplia de aproximadamente 60 kDa, no hubo diferencia significativa en los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes y controles ($p>0.05$). Las muestras se corrieron con o sin APMA, un activador de las MMPs. La actividad relativa de las muestras inactivadas de los cultivos primarios de pacientes con EGP fue de $130,646 \pm 31,980$ DU, mientras que en los cultivos primarios de los controles fue de $135,592 \pm 31,471$ DU ($p>0.05$). El APMA no incrementó significativamente la actividad de la banda de aproximadamente 60 kDa en los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes como de controles (136,368 y 152,888 DU, respectivamente, $p>0.05$). No hubo diferencia significativa entre la actividad de ≈ 60 kDa en los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP de corta evolución y en los de larga evolución ($p=0.129$). Tampoco se encontró diferencia entre los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes de corta evolución con los cultivos primarios controles ($p=0.214$). Tampoco entre los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes de larga evolución con los controles ($p=0.548$). En general, el valor de la actividad de la ≈ 60 kDa en los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes disminuyó en el 10.8 % en relación al grupo control (136,368 DU vs 152,888 DU).

En relación a las clonas de fibroblastos: la actividad relativa de las muestras inactivadas de las clonas de fibroblastos ($n=10$) obtenidas de los pacientes con EGP fue de $107,429 \pm 54,542$ DU, mientras que las clonas del grupo control ($n=11$) fue de $136,369 \pm 50,752$ DU,

p>0.05). El APMA no incrementó significativamente la actividad de ≈ 60 kDa en las clonas de pacientes con EGP o en los controles (119,920 y 147,603 DU, respectivamente, p>0.05). Hubo heterogeneidad en la actividad relativa de la ≈ 60 kDa en los clones que fueron activados con APMA (76,681 a 227,497 DU en los clones controles y 53,319 a 211,431 DU en los clones de pacientes con EGP, Figura 14). También existió heterogeneidad en la actividad relativa de la banda de 60 kDa en las clonas estudiadas sin APMA (50,952 a 204,390 DU en las clonas controles y 37,668 a 205,134 DU en las clonas de pacientes con EGP, Figura 14). No se observó relación entre la proliferación celular y la actividad relativa de la ≈ 60 kDa.

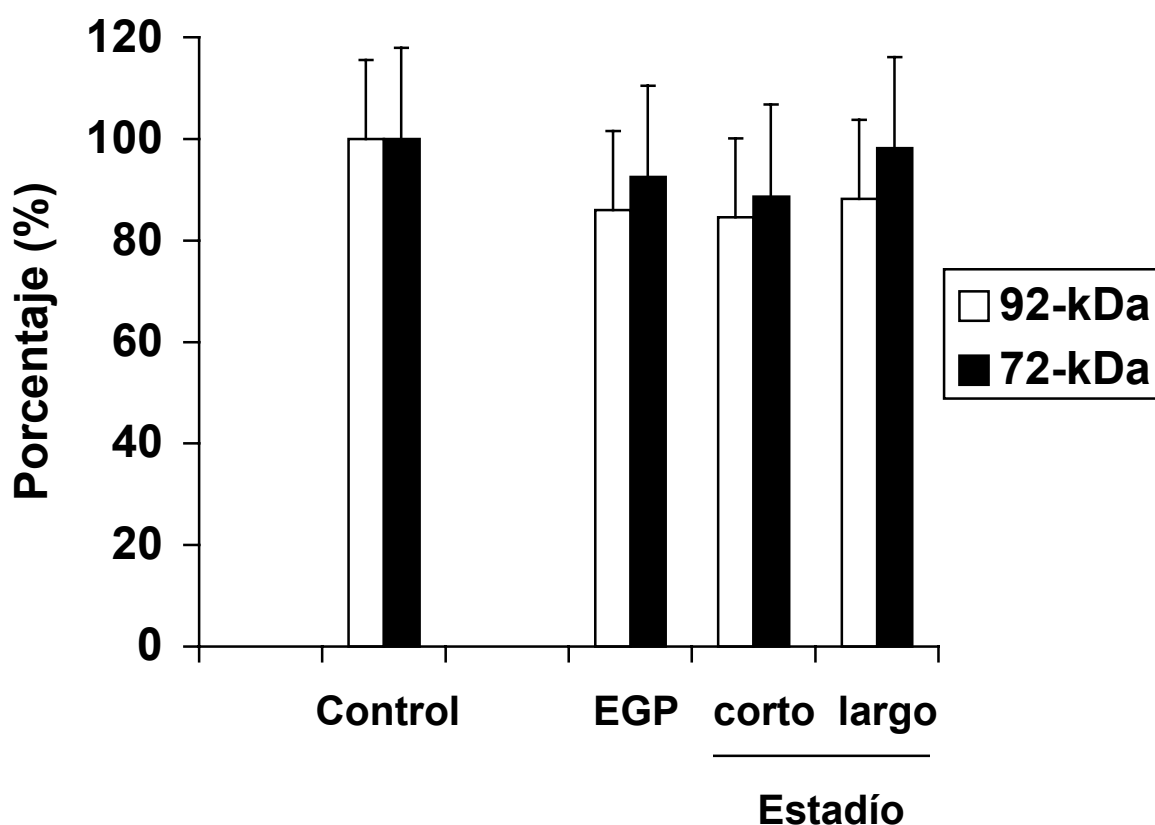


Figura 13. Alteración en la expresión de la gelatinasa de 92 kDa y de la gelatinasa de 72 kDa en fibroblastos de pacientes en relación a la evolución de la enfermedad comparados con el grupo control. Los valores se expresan en porcentaje de los valores de cada muestra ($X \pm EE$).

Cuantificación del TIMP-1 y del TIMP-2:

Se realizó la cuantificación de TIMP-1 en los sobrenadantes de cultivos de fibroblastos de los cultivos primarios de siete controles, de diez cultivos primarios de pacientes con EGP y en 20 clonas derivadas de las cuatro que fueron clonadas. La concentración de TIMP-1 en los sobrenadantes de cultivos de los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes fue de 163 ± 85.8 ng/ 10^5 células (59.75 a 332.75 ng/ 10^5 células); mientras que en los cultivos primarios controles fue de 95.5 ± 35.3 ng/ 10^5 células (50 a 132 ng/ 10^5 células, $p < 0.05$, Figura 16). El promedio de la concentración de TIMP-1 en los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP fue 1.7 veces más que en los controles. Diferencias importantes se observaron entre la concentración de TIMP-1 entre los pacientes con EGP de corta evolución al compararlos con los pacientes de larga evolución, aunque no llegó a ser significativo (196.4 vs 112.75, $p = 0.086$). Además, se encontró que pacientes con corta evolución tienen niveles elevados de TIMP-1 al compararlos con los controles (196.4 vs. 95.5, $p = 0.02$). Mientras que el nivel de TIMP-1 de pacientes de larga evolución es similar al grupo control (112.75 vs 95.5, $p = 0.0324$). Alteración en la expresión de TIMP-1 en relación al estadio de la enfermedad se muestra en la Figura 17.

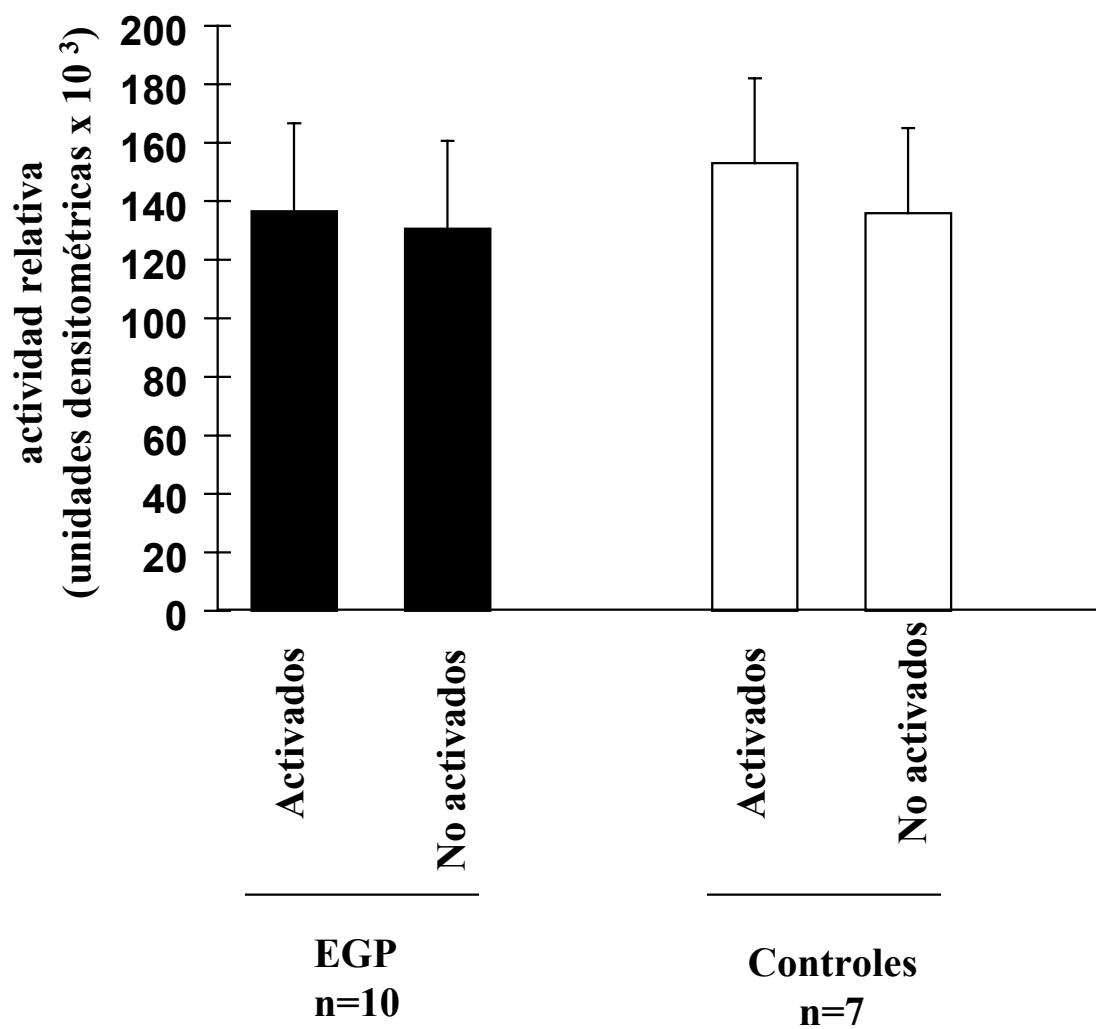


Figura 14. Actividad relativa de la gelatinasa de 60 kDa en los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP y de controles. Se determinó mediante densitometría en el zimograma.

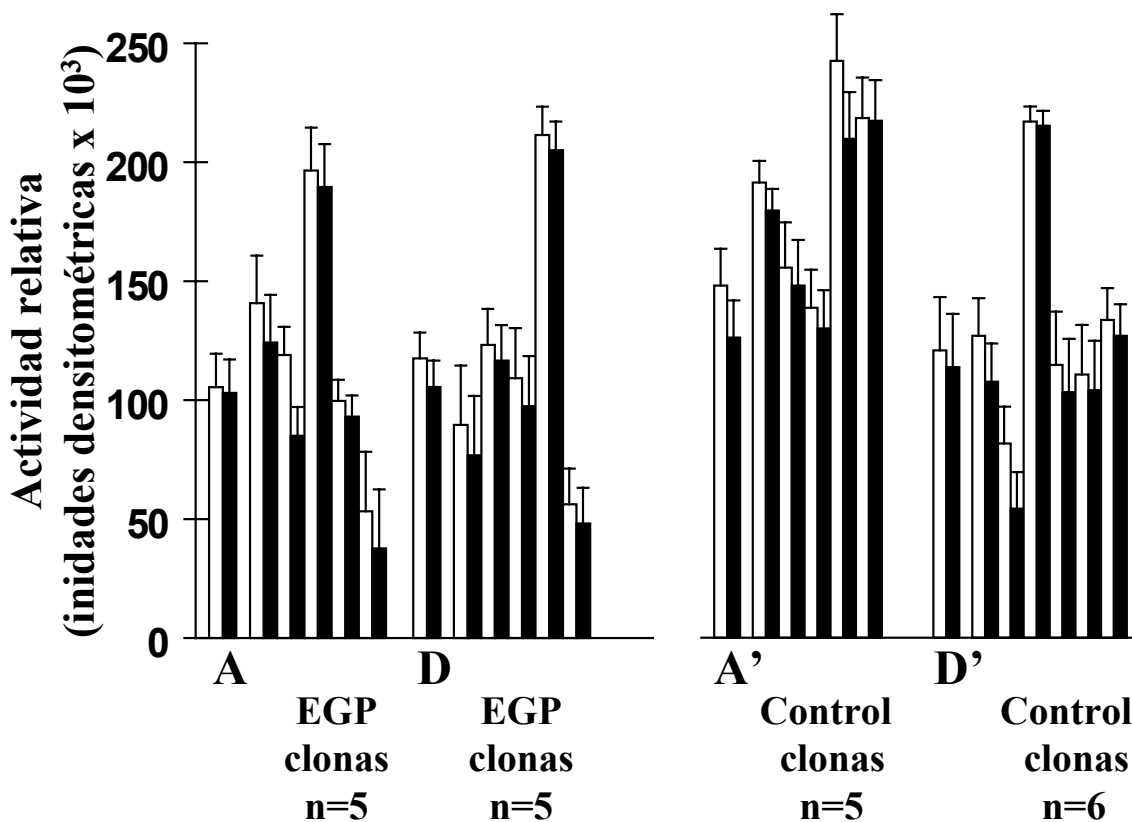


Figura 15. Actividad relativa de la MPP de ≈ 60 kDa en las clonas de fibroblastos de pacientes con EGP y de controles. Se determinó mediante densitometría de la banda de ≈ 60 kDa en el zimograma. A y D son los cultivos primarios primarias de fibroblastos obtenidos de dos pacientes con EGP. A' y D' son los cultivos primarios primarias controles. Las barras abiertas indican la activación con APMA, las barras cerradas indican sin activación con APMA.

En relación, a la concentración de TIMP-1 de las clonas de fibroblastos obtenidas de los cuatro cultivos primarios se observó que la concentración de TIMP-1 de las 9 clonas obtenidas de los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP fue de 183.9 ± 70.5 ng/ 10^5 células, mientras que las clonas (n=11) normales fue de 101.1 ± 27.5 ng/ 10^5 células ($p=0.002$, Figura 18). Junto con esta diferencia estadística entre las clonas de pacientes y las clonas normales; también, existe una marcada heterogeneidad especialmente en las clonas de pacientes (87 a 342 ng/ 10^5 células, Figura 18).

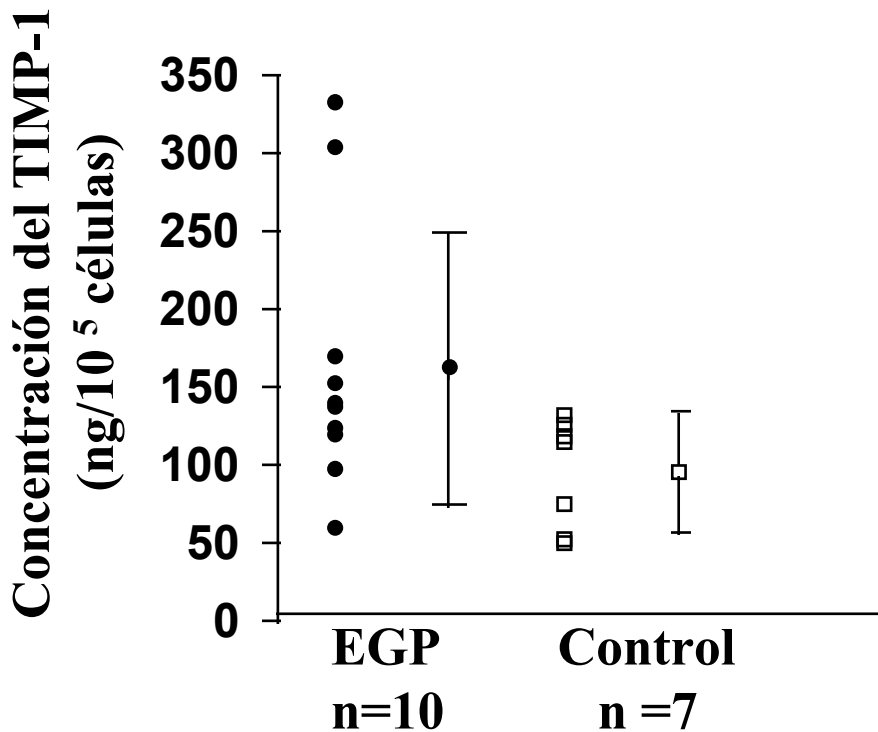


Figura 16. Concentración del TIMP-1 en los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP (círculos negros) y de controles (cuadrados abiertos). La concentración de TIMP-1 (nanogramos por 10⁵ células) se midió mediante ELISA. La concentración del TIMP-1 en los fibroblastos de pacientes con EGP fue significativamente mayor que en los controles ($p < 0.05$).

La mayoría de las clonas de pacientes con EGP sintetizan más TIMP-1 que sus dos cultivos primarios (120 ± 4.9 y 140 ± 4.9 ng/10⁵ células, respectivamente), aunque una clona sintetizó niveles bajos. La heterogeneidad fue menor en las clonas de fibroblastos controles (52 a 135 ng/10⁵ células, Figura 14). La mayoría de las clonas derivadas de fibroblastos controles expresaron niveles inferiores o similares que sus cultivos primarios, excepto una clona que sintetizó niveles altos.

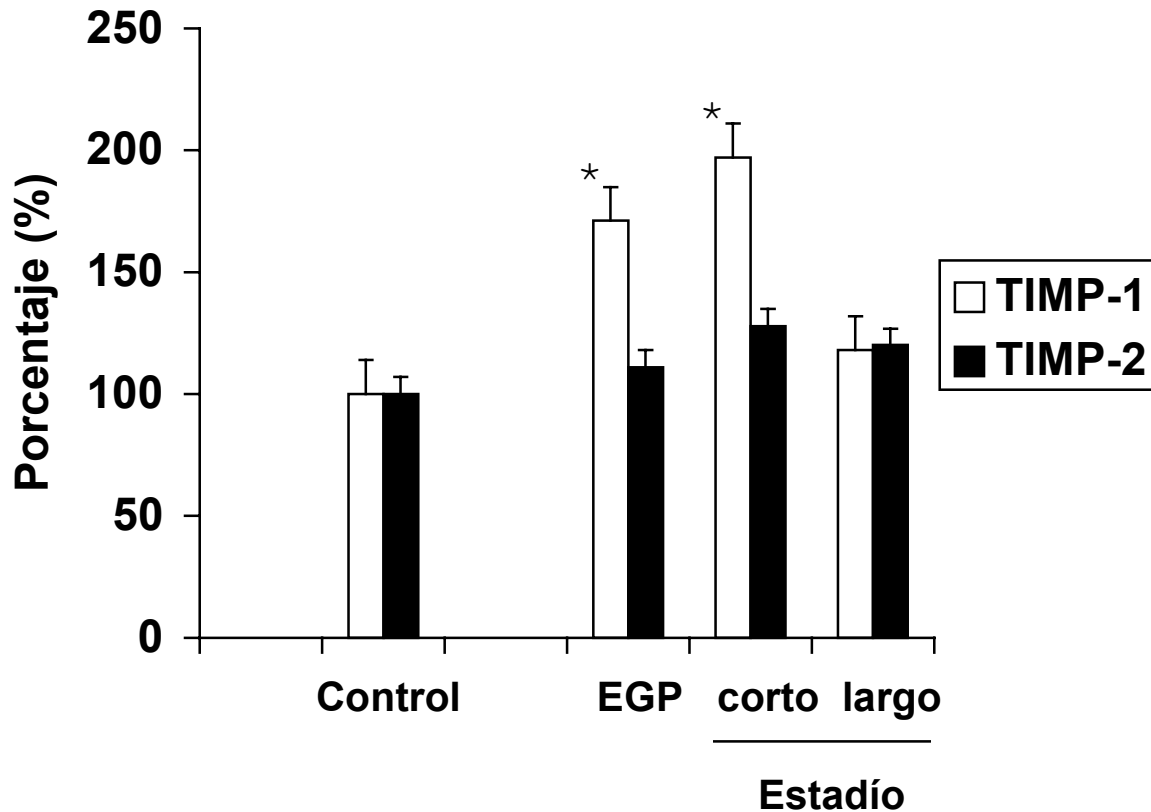


Figura 17. Alteración de la expresión de TIMP-1 y TIMP-2 en fibroblastos de pacientes con EGP en relación con la evolución de la enfermedad, comparados con el grupo control. La expresión se determinó como se indica en materiales y métodos. Los valores se expresan en porcentaje ($X \pm EE$) de los datos de cada muestra.

* $p < 0.05$ versus grupo control (Prueba U de Mann-Whitney).

Finalmente, no se observó relación entre la proliferación celular y la expresión del TIMP-1. La concentración de TIMP-2 se determinó en los sobrenadantes de los cultivos primarios de los siete controles y en los diez pacientes con EGP. La concentración de TIMP-2 no mostró diferencia entre los pacientes y los controles; así, para los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes fue de $9.6 \pm 2.13 \text{ ng}/10^5$ células (8.6 a 5.3), mientras que los controles fue de $8.66 \pm 1.51 \text{ ng}/10^5$ células (6.65 a 11, datos no mostrados). No se observaron diferencias significativas

entre los niveles de TIMP-2 en pacientes de corta evolución con los de larga evolución (Figura 17).

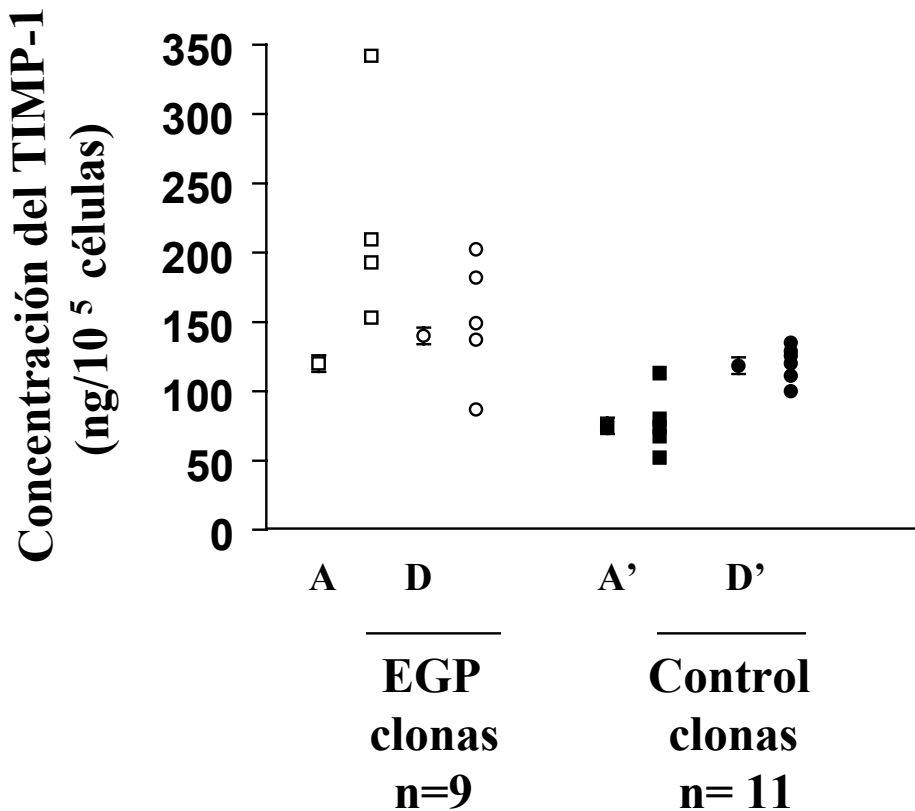


Figura 18. Concentración del TIMP-1 en las clonas de fibroblastos de pacientes con EGP (cuadros y rombos vacíos) y de controles (cuadros y rombos negros). La síntesis de TIMP-1 (nanogramos por 10⁵ células) se cuantificó mediante ELISA. La concentración del TIMP-1 en los fibroblastos de pacientes con EGP fue significativamente mayor que en los controles (p<0.05).

VIII. DISCUSION

El presente estudio muestra que la síntesis de colágena, la expresión de colágena tipo I y tipo III y los niveles de TIMP-1 en fibroblastos de pacientes con EGP están alterados en relación a la evolución de la enfermedad. La síntesis de colágena y la expresión de colágenas $\alpha_1(I)$ y $\alpha_2(I)$ y $\alpha_1(III)$ y los niveles de TIMP-1 están aumentados en los fibroblastos de pacientes de evolución corta, mientras que no hubo diferencias significativas entre los fibroblastos de pacientes de evolución larga y los del grupo control. La expresión de las MMP también está ligeramente alterada en relación a la evolución de la enfermedad. Además se observó que la gelatinasa de 72 kDa, posiblemente sufre un auto-procesamiento generando dos especies o productos de 62 y 59 kDa. Por otro lado, este estudio también muestra que existe heterogeneidad en la proliferación, síntesis de colágena y expresión de TIMP-1 en las clonas de fibroblastos de pacientes con EGP.

Los eventos que inducen a la fibrosis de la piel y de los órganos internos en pacientes con EGP son desconocidos. Sin embargo, la regulación alterada entre el balance de la síntesis de los principales componentes estructurales tales como colágena, proteoglicanos y fibronectina y la degradación de estos componentes por enzimas tales como MMPs, pueden contribuir en parte a la acumulación excesiva de las proteínas de la MEC. La actividad de estas MMPs depende de varios procesos para su óptimo funcionamiento, incluyendo el estado de la enzima y de sus inhibidores específicos (120).

El incremento en la síntesis de colágena del cultivo de fibroblastos se ha mostrado en varios estudios. Sin embargo, LeRoy (57) informó de un incremento en la síntesis de colágena en 9 de las doce cultivos primarios de fibroblastos; Uitto y colaboradores (121) en 5 de las 8 líneas de fibroblastos con esclerodermia; Krieg y colaboradores (122) en 5 de las 10 líneas de fibroblastos y recientemente Takeda y colaboradores (123) mostraron un incremento en la síntesis de colágena en 2 de las 8 líneas de fibroblastos. Por último, Perlish y colaboradores (124) no mostraron un incremento en la producción de colágena en las nueve líneas de fibroblastos de pacientes con esclerodermia. En el presente estudio se encontró un incremento

en la síntesis de colágena en 7 de los 10 cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con esclerodermia. Los cultivos primarios de fibroblastos que mostraron una síntesis similar a los controles correspondieron a dos pacientes de larga evolución (7 y 9 años respectivamente). Sin embargo, dos pacientes de larga evolución (8 y 13 años) tuvieron una síntesis aumentada de colágena, al igual que los cultivos primarios de pacientes de corta evolución de la enfermedad (menos de 2.5 años). Una sola línea obtenida de un paciente de corta evolución tuvo una síntesis de colágena similar a su control. Se ha observado que algunas líneas de fibroblastos producen cantidades similares o inferiores de colágena comparadas con los controles sanos. Esto, posiblemente, se deba al tiempo de evolución, estadio clínico, actividad de la enfermedad y activación de clonas, entre otros aspectos (9, 15, 123). Los datos de este estudio, en relación a la colágena, concuerdan con informes previos (57, 121, 122).

Los resultados de este estudio indican que la síntesis de la colágena tipo I y de la colágena tipo III es más alta que las colágenas derivadas de fibroblastos controles. Sin embargo, la relación de la colágena tipo I/colágena tipo III es similar entre los fibroblastos de pacientes y de controles. Este estudio también muestra que la producción alterada de la colágena tipos I y III producidas por los fibroblastos de pacientes con EGP está relacionada con la evolución o estadio de la enfermedad. Los niveles de colágena α_1 (I) y α_2 (III) se encuentran elevados en pacientes con corta evolución de la enfermedad (<2.5 años). Más aún, los niveles de producción de ambos tipos de colágenas no presentaron diferencias significativas entre los fibroblastos obtenidos de pacientes de larga evolución y los sujetos controles. Sin embargo, la síntesis total de colágena en ambos grupos de pacientes (evolución corta y larga) estuvo aumentada con respecto a los controles.

Por otro lado, la actividad de las diferentes metaloproteasas que tienen la capacidad de degradar las diferentes proteínas de la MEC podría explicar la acumulación de componentes de la matriz en pacientes con EGP. La actividad relativa de las MMPs (gelatinasa de 92 kDa y la gelatinasa de 72 kDa y la MMP-1) en pacientes con EGP estuvo ligeramente disminuida al

compararlos con el grupo control. Interesantemente, nuestros datos muestran que la actividad relativa de la banda de aproximadamente 60 kDa en pacientes con EGP es menor (10.8%) que en los sujetos controles. Se observó una ligera disminución en la expresión de las gelatinasas de 92 y de 72 kDa, así como de la MMP-1 en pacientes con corta evolución de la enfermedad, mientras que los pacientes de larga evolución tenían cantidades similares a los sujetos controles. Este estudio muestra *in vitro*, que en los fibroblastos de pacientes con EGP hay un aumento en la síntesis de colágena, pero sin la degradación suficiente para eliminar o degradar al exceso de colágena; lo que resulta en un recambio alterado. En un estudio previo, la actividad de colagenasa en cultivo de fibroblastos con EGP se encontró ligeramente reducida, mientras que la producción de colagenasa estuvo incrementada en el 27% (123).

En relación a la utilización del APMA (un activador de las MMPs), se observó que los efectos en las muestras preincubadas con APMA indican que el total de la enzima se encuentra activada, dado que no hay diferencias significativas entre las muestras con y sin activador, posiblemente debido a las condiciones del cultivo. Además dependerá de la fuente de obtención de la muestra, ya que en el tejido total de la piel quemada, el APMA incrementa significativamente la actividad (125), así como en el folículo de la cabra (126).

Interesantemente, se encontró que los fibroblastos de pacientes con larga evolución producen menor cantidad de colágena que los de corta evolución, mientras que lo opuesto se observó en relación a la actividad relativa de las MMPs (gelatinasa de 72 kDa, MMP-1). Estas observaciones sugieren un posible efecto causal entre la síntesis de colágena y la producción del TIMP-1, a través de las MMPs.

La gelatinasa de 72 kDa es el principal producto constitutivo de los fibroblastos, pero se encontró que su expresión estaba disminuida, tanto en fibroblastos de pacientes como de controles. Se ha mostrado que la gelatinasa de 72 kDa puede ser activada *in vitro* por el tratamiento de mercuriales (i.e. APMA), las cuales inducen proteólisis en el dominio amino-terminal (de 80 aminoácidos), generando un producto de 62 kDa (127). Además, Brown y

colaboradores informaron que la gelatinasa de 72 kDa puede ser partida en dos productos de 62 kDa y 59 kDa en varios cultivos primarios celulares (128). Debido a lo anterior, sugerimos que la gelatinasa de 72 kDa se convierte o se auto-procesa casi en su totalidad en dos productos de 62 kDa y 59 kDa. Posiblemente, la gelatinasa de 72 kDa se auto-procesa debido a varios productos presentes en el fibroblasto como un mecanismo de regulación. Keski-Oja y colaboradores, utilizando zimogramas, demostraron que el producto de 62 kDa derivado de la gelatinasa de 72 kDa es por acción del activador de urocinasa de plasminógeno (uPA) (129). Recientemente, se ha informado que existe un incremento en la expresión del mRNA del uPA en fibroblastos de pacientes con EGP (130). Además, citocinas, como el TGF- β también inducen un producto de 62 kDa, derivado de la gelatinasa de 72 kDa (128).

Dado que la actividad de las MMPs está regulada por varios mecanismos (especialmente por sus inhibidores naturales, los TIMPs) (87,131,132), el balance entre la actividad de las MMPs y de los TIMPs puede jugar un papel importante en algunas condiciones patológicas donde se observan un incremento del depósito de los componentes de la matriz (*i.e.* cirrosis hepática, esclerodermia, entre otras). Se investigó la expresión de TIMP-1 y TIMP-2 en los sobrenadantes de cultivo de fibroblastos, tanto de pacientes como de controles. Se encontró que el TIMP-1 se encuentra aumentado en los sobrenadantes de los cultivos de fibroblastos de pacientes con EGP al compararlos con los controles. Aún más, la expresión del TIMP-1 por los fibroblastos de pacientes de larga evolución fue menor al comparar con los de corta evolución. Estos datos nos indican que posiblemente la disminución en la síntesis de colágena en pacientes de larga evolución dependería de la expresión disminuida del TIMP-1.

Inicialmente, se encontró que la actividad de la colagenasa en los fibroblastos de pacientes con EGP era normal (121). Sin embargo, Takeda y colaboradores informaron que los fibroblastos de pacientes con EGP mostraban una disminución marcada de la actividad de colagenasa (123). Por otro lado, los niveles de TIMP-1 en suero de pacientes con EGP se encontraron significativamente elevados (104). Este estudio confirma el estudio inicial (121).

Mattila y colaboradores (108) mostraron un incremento en la expresión del mRNA de TIMP-3 en fibroblastos de pacientes con EGP.

Además, la expresión normal de TIMP-2 en los fibroblastos derivados de pacientes con EGP sin la detección concomitante de la MMP-2, sugiere que ambas proteínas no juegan un papel principal en la regulación del recambio de los componentes de la MEC observada en esta enfermedad.

La atención sobre la heterogeneidad de los fibroblastos se ha incrementado en años recientes debido a su posible papel en el desarrollo en la respuesta fibrótica (65). La identificación de sub-poblaciones de fibroblastos, que sintetizan niveles elevados de colágena, ha sugerido que verdaderamente estén presentes en el tejido fibrótico. En este sentido, Botstein y colaboradores (58) mostraron que cuando los clones de fibroblastos derivados de piel de prepucio de sujetos normales, se expusieron al suero de pacientes con EGP, se observó un crecimiento selectivo de clonas de fibroblastos-altos productores de colágena. Needleman y colaboradores (85) identificaron mediante citometría de flujo (FACS), una población de fibroblastos (del 15 al 25% de la masa total) que se caracterizaba por su granularidad y por una síntesis incrementada de colágena (2 a 3 veces mayor que los demás fibroblastos).

Recientemente, Jelaska y colaboradores (86) mostraron mediante hibridación *in situ*, que una subpoblación de fibroblastos producía niveles elevados de colágena tipo I. En contraste a estos informes, el presente estudio investigó las características proliferativas, la expresión de otros reguladores de los componentes del tejido conjuntivo que se encuentran involucrados en la patogénesis de la esclerodermia, como son las enzimas que digieren a las proteínas de la MEC y sus inhibidores. Este estudio muestra heterogeneidad en la proliferación, en la síntesis de colágena, en la expresión del MMP-1 y en la expresión del TIMP-1 por parte de las clonas derivadas de los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP de corta evolución. También se observó heterogeneidad, aunque menor, en los clones derivados de sujetos normales. Estas conclusiones se basan sobre los experimentos *in vitro* con 12 clonas de

fibroblastos de las 43 clonas obtenidas de pacientes con EGP. Las condiciones de cultivo, la expansión y el mantenimiento de las clonas son difíciles y rigurosas y es imposible realizar ensayos a todas ellas. Además, alguna clonas denominadas de crecimiento lento (*i.e.* índice de proliferación < 1.4) no se pudo mantener en cultivo por largos períodos. Sin embargo, la heterogeneidad encontrada en estas clonas nos indicaría que probablemente exista un fenotipo alterado en relación a la proliferación, síntesis de colágena y su degradación. Este estudio añade dos características nuevas en relación a la heterogeneidad existente en los fibroblastos de pacientes con esclerodermia: la colagenasa intersticial y la expresión de TIMP-1.

La eficacia de la clonación fue baja. La comparable eficacia de la clonación en los cultivos de pacientes con EGP y de los sujetos controles nos indica que ambos fueron capaces de clonar mediante este sistema de dilución limitante. La eficacia de la clonación fue comparable con el descrito para los fibroblastos de piel de prepucio de sujetos normales (68) y con el informado por Brincherhoff y Nagel (133) para fibroblastos sinoviales de conejo y también con el descrito por Whiteside y colaboradores (84) para la piel de pacientes con esclerodermia.

Aunque, el zimograma identifica principalmente a la gelatinasa A (MMP-2, 72 kDa) y a la gelatinasa B (MMP-9, 92 kDa) (125,134-136), otras metaloproteasa pueden ser identificadas (debido a su actividad de gelatinasas, *i.e.* colagenasa intersticial y estromelinas) (97). Es posible identificar a las enzimas por esta técnica y confirmar mediante otras técnicas. La principal banda observada en el zimograma (aproximadamente de 60 kDa) no corresponde al peso molecular de las gelatinasas, aunque otras bandas observadas en el zimograma corresponden a las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9, de 72 y 92 kDa respectivamente). No se identificó la MMP-2 ni la MMP-3 mediante la inmunotransferencia (western-blot). Esto se debió a que las muestras tuvieron que ser concentradas para su identificación. La MMP-1 degrada específicamente a la colágena tipos I, II, III, VII, VIII y X, con una relación similar a las gelatinasas (137). Debido a la gran cantidad de proteína detectada en el zimograma en la banda de ≈ 60 kDa y menor la reactividad para la MMP-1 en la inmunotransferencia, la posibilidad de que otra MMP

este sintetizando no debe ser excluida, tal es el caso de la MMP-10 (53 kDa como zimógeno) y esta posibilidad debe ser investigada. Otra posibilidad es que la gelatinasa de 72 kDa se auto-corte. Cualquiera que sea el caso, este estudio muestra heterogeneidad en la expresión de la MMP-1, tanto en las clonas de fibroblastos de pacientes con EGP como de controles. Interesantemente, se encontró que su expresión es más baja en los pacientes con EGP.

TIMP-1 es el principal inhibidor natural de la MMP-1. En este estudio se observó que las clonas de fibroblastos de pacientes con EGP producen más cantidad de TIMP-1 que su cultivo cantidad. Es posible que el TIMP-1 estimule el crecimiento de los fibroblastos in vivo en una manera autócrina (107) o paracrina, y así contribuya a la expansión de las subpoblaciones de fibroblastos durante el desarrollo de la fibrosis. También, las clonas productoras altas de TIMP-1 pueden ser responsables de la acumulación de colágena, debido a su habilidad de inhibir a las enzimas que degradan a las proteínas de la MEC.

Los resultados sugieren que los pacientes con EGP tienen un depósito excesivo de colágena, sin un incremento esperado de las MMPs para su degradación; con un aumento de la expresión del TIMP-1, esta molécula puede desempeñar una función importante como inhibidor de la actividad de las MMPs. En conclusión, un balance alterado entre las expresiones de TIMP-1 y de las MMPs en la piel puede ser responsable de la acumulación de colágena y de otras proteínas de la MEC. Más aún, la producción de colágena, MMPs y TIMP-2 están dinámicamente modulados durante la fibrinogénesis en el curso de la enfermedad. Todas estas alteraciones posiblemente actúan en el desarrollo de la fibrosis, por la presencia de una subpoblación de fibroblastos que permita la sobreexpresión del fenotipo fibrótico observado en esta enfermedad.

IX. CONCLUSIONES.

1. Los fibroblastos derivados de pacientes con esclerosis generalizada progresiva tienen mayor capacidad de proliferación en comparación con los fibroblastos derivados de controles ($p < 0.05$).

2. No existe diferencia en la proliferación de fibroblastos de pacientes con EGP de corta evolución (<2.5 años) y los de larga evolución (7 a 13 años) ($p > 0.05$).
3. Los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes de corta evolución de la enfermedad (menos de 2.5 años) producen mayor cantidad de colágenas tipo I y III comparados con los de larga evolución y con el grupo control ($p < 0.05$).
4. No se encontró diferencia en la relación colágena tipo I/ colágena tipo III entre los fibroblastos de pacientes con EGP y el grupo control.
5. Los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes de corta evolución de la enfermedad (menos de 2.5 años) producen mayor cantidad de TIMP-1 comparados con los de larga evolución (7 a 13 años) y con los controles.
5. En los fibroblastos de pacientes con EGP, la expresión de la colagenasa intersticial es menor que en los fibroblastos del grupo control.
6. En los cultivos primarios de fibroblastos, no se encontró diferencia en la expresión de la gelatinasa de 92 kDa tanto en pacientes con EGP como en controles.
7. En los cultivos primarios de fibroblastos, la expresión de la gelatinasa de 72 kDa es menor en pacientes con EGP que en los controles.
8. En los cultivos primarios de fibroblastos, la expresión de la gelatinasa de 72 kDa en pacientes con larga evolución es similar al grupo control.
9. La gelatinasa de 72 kDa se auto-corta en dos productos de 62 kDa y 59 kDa.
10. En los cultivos primarios de fibroblastos, las MMPs se encuentran activadas tanto en pacientes como en controles.
11. En los cultivos primarios de fibroblastos, la síntesis del inhibidor tisular de las metaloproteasas-1 es significativamente mayor en pacientes con EGP ($p < 0.05$).
12. No se observó correlación entre la morfología de los fibroblastos y las características proliferativas, ni de síntesis de colágena, ni en las otras moléculas investigadas.

13. Los datos presentados sugieren que la acumulación de colágena en la piel de pacientes con EGP, depende del balance entre la síntesis y su degradación y están en relación a la evolución de la enfermedad.

14. Los niveles de colágena, colágena tipo I y tipo III, así como la expresión de MMP-1 y TIMP-1 están dinámicamente modulados durante el recambio de la colágena (en las diferentes fases de la enfermedad).

15. En relación a las clonas de fibroblastos, se observó que la clonogenicidad de estos en los pacientes no fue diferente a la de los controles. La frecuencia de clonación fue baja en ambos grupos. La clonación de los cultivos primarios de los fibroblastos obtenidos de pacientes con EGP y de controles fue similar.

16. En los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con EGP, existen heterogeneidad entre las clonas de fibroblastos en relación a la proliferación, síntesis de colágena, expresión de la actividad de la banda de 60 kDa y concentración de TIMP-1. Esto sugiere, que la heterogeneidad de las respuestas observadas, es debido a que los fibroblastos están compuestos de diferentes poblaciones.

17. Los datos sugieren que la piel de pacientes con EGP esta compuesta de subpoblaciones de fibroblastos activos que estarían regulando la síntesis y la degradación de los componentes del tejido conjuntivo, permitiendo así, la sobre expresión de fenotipo fibrótico.

18. Además, los datos sugieren que la piel de pacientes con EGP está compuesta por clonas de fibroblastos que no son capaces de regular la síntesis y la degradación de los componentes del tejido conjuntivo y este desequilibrio en el recambio pueden ser importante en la patogenia de esta enfermedad.

X. BIBLIOGRAFIA.

1. LeRoy EC. A brief overview of the pathogenesis of scleroderma (systemic sclerosis). *Ann Rheum Dis* 51:286-288, 1992.
2. Perez M, Kohn S. Systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 28:525-547, 1993.
3. Sollberg S, Krieg T. New aspects in scleroderma research. *Int Arch Allergy Immunol* 111:330-336, 1996.
4. Kemperer S. Escleroderma. In: *Dermal Immune System*. Edited by Nickoloff B. CRC Press. 1993. Boca Raton, USA. pp. 163-184.
5. Mayes MD. Scleroderma epidemiology. *Rheumatic Dis Clin of NA* 22:751-764, 1996.
6. Medsger TA, Masi AT. Epidemiology of systemic sclerosis (scleroderma). *Ann Intern Med* 74:714-719, 1971.
7. Mayes, Steen VD, Mesger TA. Epidemilogy and natural history of systemic sclerosis. *Rheumatic Dis Clin NA* 16:1-10, 1990.
8. Altman RD, Medsger TA, Bloch DA, Michel BA. Predictors of survival in systemic sclerosis (Scleroderma). *Arthritis Rheum* 34:403-413, 1991.
9. Jimenez SA, Hitraya E, Varga J. Pathogenesis of scleroderma. *Collagen. Rheumatic Dis Clin NA* 22:647-674, 1996.
10. de Crombrughe B, Vuorio T, Karsenty G. Control of Type I collagen genes in scleroderma and normal fibroblasts. *Rheumatic Dis Clin NA* 16:109-123, 1990.
11. LeRoy EC. Systemic Sclerosis (Scleroderma). *Semin Clin Immunol* 2:5-9, 1991.
12. Black C. The aetiopathogenesis of systemic sclerosis. *J Int Med* 234:3-8, 1993.
13. Cambell P, LeRoy EC. Pathogenesis of systemic sclerosis: a vascular hypothesis. *Semin Arthritis Rheum* 4:351-368, 1975.
14. Zurita-Salinas CS, Alcocer-Varela J. Autoanticuerpos en Esclerosis Generalizada Progresiva. *Inmunología* 18:15-41, 1999.
15. Korn J, Black C. The second International Workshop on scleroderma research. *Matrix* 13:427-429, 1993.

16. Needleman BW. Immunologic aspects of scleroderma. *Current Opin Rheum* 6:612-615, 1994.
17. Postlewaite A. Connective tissue metabolism including cytokines in scleroderma. *Current Opin Immunol* 6:616-620, 1994.
18. Ferrarini M, Steen V, Medsger TA, Whiteside TL. Functional and phenotypic analysis of T lymphocytes cloned from the skin of patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 79:346-352, 1990.
19. Claman H. Mast cells and fibrosis. The relevance to scleroderma. *Rheum Dis Clin NA* 16:141-151, 1990.
20. Claman H. On scleroderma: mast cells, endothelial cells, and fibroblasts. *JAMA* 262:1206-1209, 1989.
21. Much C, Eckes B, Hubzelmann N, Oono T, Kozłowska E, Krieg T. Control of fibrosis in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 100:92S-96S, 1993.
22. Jimenez SA, Hitraya E, Varga J: Pathogenesis of Scleroderma: Collagen. *Rheum Dis Clin NA* 22:647-674, 1996.
23. LeRoy EC: Systemic sclerosis: A Vascular perspective. *Rheum Dis Clin NA* 22:675-694, 1996.
24. White B: Immunopathogenesis of systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin NA* 22:695-708, 1996.
25. Furst DE, Clements PJ: Hypothesis for the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Rheumatol* 24:S53-S57, 1997.
26. Vargas-Alarcón G, Granados J, Ibañez de Kasep G, Alcocer-Varela J, Alarcón-Segovia D. Association of HLA-DR5 (DR11) with systemic sclerosis (scleroderma) in mexican patients. *Clin Exp Rheumatol* 13:11-16, 1995.

27. Satoh M, Akizuki M, Kurvana M, Mimori T, Yamagata H, Yoshida S, Homma M, Yamamoto T, Sasazuki T. Genetic and immunologic differences between Japanese patients with diffuse scleroderma and limited scleroderma. *J Rheumatol* 21:111-114, 1993.
28. Arnett FC. HLA and autoimmunity in scleroderma (systemic sclerosis). *Int Rev Immunol* 12:107-111, 1995.
29. Luderschmidt Ch, Scholz S, Mehlhaff E, Köning G, Albert E. Association of progressive systemic scleroderma to several HLA-B and HLA-DR alleles. *Arch Dermatol* 123:1188-1191, 1987.
30. McGregor AR, Watson A, Yunis E, et. al.: Familial clustering of scleroderma spectrum disease. *Am J Med* 84:1023-1027, 1988.
31. Stephens CO, Briggs DC, Whyte J, Artlett CM, Scherbakov AB, Olsen N, Gusseva N, MxHugh NJ, Maddison PJ, Welsh KI, Black CM. Familial scleroderma-evidence for environment versus genetic trigger. *Br J Rheumatol* 33:1131-1135, 1994.
32. Manolios N, Dunckley H, Chivers T, Brooks P. Immunogenetic analysis of five families with multicase occurrence of scleroderma and/or related variants. *J Rheumatol* 22:85-92, 1995.
33. Briggs D, Black C, Welsh K. Genetic factors in scleroderma. *Rheumatic Dis Clin NA* 16:31-34, 1990.
34. Jimenez S, Chistner P. Animal models of systemic sclerosis. *Clin Dermatol* 12:425-436, 1994.
35. Van de Waltert J, Jimenez SA, Gershwin ME. Animal models of scleroderma: Contrasts and comparisons. *Int Rev Immunol* 12:201-216, 1995.
36. Silman A, Hochberg MC: Occupational and environmental influences on scleroderma. *Rheum Dis Clin NA* 22:737-749, 1996.
37. Muryoi T, Kasturi K, Kafina M, Cram DS, Harrison LC, Sasaki T, Bona C. Antitopoisomerase I monoclonal autoantibodies from scleroderma patients and tight skin mouse interact with similar epitopes. *J Exp Med* 175:1103-1109, 1992.

38. Maul GG, Jimenez SA, Riggs E, Ziemnicka-Kotula D. Determination of an epitope of the diffuse systemic sclerosis marker antigen DNA topoisomerase 1: sequence similarity with retroviral p30gag protein suggests a possible cause for autoimmunity in systemic sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8492-8496, 1989.
39. Alderuccio F, Chan EK, Tan EM. Molecular characterization of an autoantigen of PM-Scl in the polyinositis/scleroderma overlap syndrome: A unique and complete human cDNA encoding an apparent 75-kD acidic protein of the nucleolar complex. *J Exp Med* 173:941-952, 1991.
40. Misaki Y, Yamamoto K, Yanagi K, Miura H, Ichijo H, Kato T, Mato T, Welly-Wister S, Nishioka K, Ito K. B-cell epitope on the U1 snRNP-C autoantigen contains a sequence similar to that of the herpes simplex virus protein. *Eur J Immunmol* 23:1064-1071, 1993
41. Kasturi KN, Hatekeyama A, Spiera H, Bona C. Antifibrillar autoantibodies present in systemic sclerosis and other connective tissue diseases interact with similar epitopes. *J Exp Med* 181:1027-1036, 1995.
42. Dang H, Dauphinee MJ, Talal N, Garry RF, Seibold JR, Medsger TA, Alexander S. Serum antibody to retroviral gag proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 34:1337-1338, 1991.
43. Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA, Rodman G. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis: Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum* 27:645-653, 1984.
44. Prescott RJ, Freemont A, Jones CPJ, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol* 166:255-263, 1992.
45. Sasaki T, Nakajima H. Serum adenosine deaminase activity in systemic sclerosis (scleroderma) and related disorders. *J Am Acad Dermatol* 37:411-414, 1992.
46. Unemori E, Amento E. Connective tissue metabolism in scleroderma, including cytokines. *Current Opin Rheum* 8:580-584, 1996.

47. Black CM, Korn JH. Proceedings of The Third International Workshop on scleroderma research. *Matrix Biol* 14:699-704, 1994.
48. Zurita-Salinas CS, Richaud-Patin Y, Krötzsch-Gómez E, Llorente L, Alcocer-Varela J, Díaz de León L, Palacios-Boix A. Spontaneous cytokine gene expression by cultured skin fibroblasts of systemic sclerosis. Correlation with collagen synthesis. *Rev Invest Clin* 50:97-104, 1998.
49. Kadono T, Kikuchi K, Ihn H, Takehara K, Tamaki K. Increased production of interleukin 6 and interleukin 8 in scleroderma fibroblasts. *J Rheumatol* 25:296,301, 1998
50. Smith EA. Connective tissue metabolism including cytokines in scleroderma. *Cur Opin Rheumatol* 4:869-877, 1992.
51. Unemori EN, Amento EP. Connective tissue metabolism including cytokines in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 3:953-959, 1991.
52. Tan, EM. Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 44:93- , 1989.
53. Kahaleh MB, Sherer GK, LeRoy EC. Endothelial injury in scleroderma. *J Exp Med* 149:1236-1335, 1979.
54. Kahaleh MB, Fan PS. Cytotoxic T cell involvement in scleroderma: detection of granzyme-a gene expression in systemic sclerosis skin. *Arthritis Rheum* 35:S38, 1992.
55. Gruschwitz M, Sepp N, Kofler H, Wick G. Expression of class II-MHC antigens in the dermis of patients with progressive systemic sclerosis. *Immunobiology* 182:234-255, 1991.
56. Buckingham RB, Prince R, Rodman GP, Taylor F. Increased collagen accumulation in dermal fibroblast cultures from patients with progressive systemic sclerosis (scleroderma). *J Lab Clin Med* 92:5-12, 1978.
57. LeRoy, EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin *in vitro*. *J Clin Invest* 54:880-888, 1974.

58. Botstein GR, Sherer G, LeRoy EC. Fibroblast selection in scleroderma. an alternative model of fibrosis. *Arthritis Rheum* 26:189-195, 1982.
59. Jimenez S, Feldmenn G, Bashey R, Bienkowski R. Co-ordinate increase in the expression of type II and type III collagen genes in progressive systemic sclerosis fibroblasts. *Biochem J* 237:837-843, 1986.
60. Postlethwaite AE. Dermal fibroblast function. In: *Dermal Immune System*. Edited by Nickoloff B. CRC Press. 1993. Boca Raton, USA. pp. 163-184.
61. Sumnerbell D, Lewis JH, Welpert Y. Positional information in chick morphogenesis. *Nature* 244:492-494, 1973.
62. Kuding TM, Bachmann MF, DiPaolo C, Simard JLL, Battegay M, Lothar H, Gessner A, Kuhlcke K, Ohashi PS, Hengartner H, Zinkernagel RM. Fibroblasts as efficient antigen-presenting cells in lymphoid organs. *Science* 268:1343-1346, 1995.
63. Castor CW, Prince RK, Dorstewitz EL. Characteristics of human "fibroblast" cultivated *in vitro* from different anatomical sites. *Lab Invest* 11:703-713, 1962.
64. Smith TJ, Bahn RS, Gorman CA. Hormonal regulation of hyaluronate synthesis in cultured human fibroblast: Evidence for differences between retro-ocular and dermal fibroblast. *J Clin Endocrinol Met* 69:1019-1023, 1989.
65. Fries KM, Blieden T et. al. *Clin Immunol Immunopathol* 72:283-292, 1994.
66. Harper RA, Grove G. Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis:differences in growth potential in vitro. *Science* 204:526-527, 1979.
67. Bordin S, Page RC, Narayanan AS. Heterogeneity of normal human diploid fibroblasts: Isolation and characterization of one phenotype. *Science* 223:171-173, 1984.
68. Korn J. Substrain heterogeneity in prostaglandin E₂ synthesis of human dermal fibroblasts. Differences in prostaglandin E₂ synthetic capacity of substrains are not stimulus-restricted. *Arthritis Rheum* 18:315-322, 1985.

69. Goldring ST, Stephenson ML, Downie E, Krane SM, Korn JH. Heterogeneity in hormone responses and patterns of collagen synthesis in cloned dermal fibroblasts. *J Clin Invest* 85;798-803, 1990
70. Korn JH, Torres S, Downie E. Clonal heterogeneity in the fibroblast response to mononuclear cell derived mediators. *Arthritis Rheum* 27:174-179, 1984.
71. Ko SD, Page RC, Narayanan AS. Fibroblast heterogeneity and prostaglandin regulation of subpopulations. *Proc Natl acad Sci USA*. 74:3429-3432, 1977.
72. Tipton DA, Stricklin GP, Dabbous MK. Fibroblast heterogeneity in collagenolytic response to cyclosporine. *J Cell Biochem* 46:152-165, 1991.
73. Hurum S, Sodek J, Aubin E. Synthesis of collagen, collagenase and collagenase inhibitors by cloned human gingival fibroblasts and the effect of concanavalin A. *Biochem Biophys Res Commun* 107;357-366, 1982.
74. Hakkinen L, Larajava H. Characterization of fibroblast subpopulations in health, inflamed and healing periodontium in vitro. *J Dental Res* 70:A689, 1991.
75. Jordana M, Schullman J, etc.
76. Mollenhauer J, Bayreuther K. Donor-age-related changes in the morphology, growth potential, and collagen synthesis in rat fibroblast subpopulations in vitro. *Differentiation* 32:165-172, 1986.
77. Derdak S, Penney DP, Keng P, Felch ME, Brown D, Phipps, P. Differential collagen and fibronectin production by Thy 1⁺ and Thy 1⁻ lung fibroblast subpopulations. *Am J Physiol* 263;L283-L290, 1992.
78. Breen E, Falco VM, Absher M, Cutroneo KR. Subpopulations of rat lung fibroblasts with different amounts type I and type III collagen mRNAs. *J Chem Biol* 265;6286-6290, 1990.
79. Phipps RP, Penney DP, Keng P, Quill H, Paxhia A, Derdak S, Felch M. Characterization of two populations of lung fibroblasts: distinguishing morphology and discordant display of Thy 1 and class II MCH. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1:655-74, 1989.

80. Phipps RP, Baecher C, Frelinger JG, Penney DP, Keng P, Brown D. Differential expression of interleukin 1 α by Thy-1⁺ and Thy-1⁻ lung fibroblast subpopulations: enhancement of interleukin 1 α production by tumor necrosis factor- α . *Eur J Immunol* 20;1723-1727, 1990.
81. Wolosewick JJ, Porter KR. Observations on the morphological heterogeneity of WI-38 cells. *Am J Anat* 149:197-225, 1976.
82. Fleischmajer R, Kreig T, Timpl R, Perlish JS. Heterogeneity of collagen and fibronectin synthesis by scleroderma fibroblasts isolated from various skin levels. *Arthritis Rheum* 23:673-674, 1980.
83. Maxwell DB, Grotendorst CA, Grotendorst GR, LeRoy EC. Fibroblast heterogeneity in scleroderma: C1q studies. *J Rheumatol* 14:756-759, 1987.
84. Whiteside TL, Ferrarini M, Hebda P, Buckingham RB. Heterogeneous synthetic phenotype of cloned scleroderma fibroblasts may be due to aberrant regulation in the synthesis of connective tissues. *Arthritis Rheum* 31;1221-1229, 1988.
85. Needleman BW, Ordonez JV, Taramelli D, Alms W, Gayer K, Choi J. In vitro identification of a subpopulation of fibroblasts that produces high levels of collagen in scleroderma patients. *Arthritis Rheum* 33:842-852, 1990.
86. Jelaska A, Arakawa M, Broketa G, Korn J. Heterogeneity of collagen in normal and systemic sclerosis skin fibroblasts. Increased proportion of high collagen-producing cells in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum* 39:1338-1346, 1996.
87. Mignatti P. Extracellular matrix by metalloproteinases and plasminogen activators. *Kidney Int.* 47 (suppl. 49):S12-S14, 1995.
88. Gay S, Trabandt A, Moreland L, Gay R. Growth factors, extracellular matrix, and oncogenes in scleroderma. *Arthritis Rheum* 35;304-310, 1992.
89. Kovacs E. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunology Today* 12;17-23, 1991.

90. Holbrook K, Smith L. Morphology of connective tissue: Structure of the skin and tendon. En: Connective Tissue and its Heritable Disorders. Editors by Royce PM, Steinmann B. Wiley-Liss, Inc. USA. 1993. pp-59.
91. Raghow R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. FASEB J 8:823-831, 1994.
92. von der Mark K, von der Mark H, Goddman S. Cellular responses to extracellular matrix. Kidney Int 41;632-640, 1992.
93. Goetzl EJ, Banda MJ, Leppert D. Matrix metalloproteinases in immunity. J Immunol 156:1-4, 1996.
94. Stettler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE, Jr. Extracellular matrix 6: Role of matrix metalloproteinase in tumor invasion and metastasis. FASEB J 7:1434-1441, 1993.
95. Davies M, Martin J, Thomas GJ, Lovett DH. Proteinases and glomerular matrix turnover. Kidney Int 41;671-678, 1992.
96. Docherty AJP, Murphy G. The tissue metalloproteinase and the inhibitor TIMP: a study using cDNAs and recombinant proteinases. Ann Rheum Dis 49:469-479, 1990.
97. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB J 5:2145-2154, 1991.
98. Werb Z, Alexander CM. Proteinases and matrix degradation. En: Textbook of Rheumatology. Editors by Kelley W, Harris E, Ruddy S, Sledge C. Fourth edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, 1993. pp.248-268.
99. Werb Z, Hembry RM, Murphy G, Aggeler J. Commitment to expression of metalloproteinases, collagenase and stromelysin: Relationship to inducing events to change in cytoskeletal architecture. J Cell Biol 102;689-702, 1986.
100. Murphy G, Willenbrock F. Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. Methods Enzymology 248:496-510, 1995.

101. Wick M, Härönen R, Mumberg D. Structure of the human TIMP-3 gene and its cell cycle-regulated promoter. *Biochem J* 311:549-554, 1995.
102. Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 271:30375-30380, 1996.
103. Overall CM. Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression. In: *Inhibition matrix metalloproteinases. Therapeutic potential*. Editors: Greenwald RA, Golub LM. 732:51-64, 1994
104. Kikuchi K, Kubo M, Sato S, Fujimoto M, Tamaki K. Serum tissue inhibitor of metalloproteinase in patients with systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 33:973-978, 1995.
105. Bou-Gharios G, Osman J, Black C, Olsen Y. Excess matrix accumulation in scleroderma is caused partly by differential regulation of stromelysin and TIMP-1 synthesis. *Clinica Chimica Acta* 231:69-78, 1994.
106. Kirk TZ, Mark ME, Chua ChC, Chua BH, Mayes MD. Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1. *J Biol Chem* 270:3423-3428, 1995.
107. Kikuchi K, Kadono T, Furue M, Tamaki. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) may be an autocrine growth factor in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol* 108:281-284, 1997.
108. Mattila L, Airola K, Ahonen M, Hietarinta M, Black C, Saarialho-Kere U, Kähäri V-M. Activation of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) mRNA expression in scleroderma skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 110:416-421, 1998.
109. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association diagnostic and therapeutic criteria committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 23:581-590, 1980.

110. LeRoy EC, Krieg T, Black C, Fleischajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger T, Rowell N, Wollheim F. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets, and pathogenesis. *J Rheumatol* 15:202-205, 1988.
111. Callaghan MM, Lovis RM, Rammohan Ch, Lu Y, Pope RM. Autocrine regulation of collagenase gene expression by TNF- α in U937 cells. *J Leukoc Biol* 59:125-132, 1996.
112. Labarca C, Paigen K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102:344-352, 1980.
113. Diegelmann R, Graham M, Bryson G. An *in vitro* microassay to quantitate collagen synthesis and its utility for analyzing the effects of defined inflammatory mediators. *Ann NY Acad Sci* 580:514-517, 1990.
114. Diegelmann R, Peterkofsky B. Inhibition of collagen secretion from bone and cultured fibroblast by microtubular disruptive drugs. *Proc Nat Acad Sci USA* 69:892-896, 1972.
115. Zurita-Salinas CS. Perfil de expresión genética de citocinas en cultivo de fibroblastos de pacientes con esclerosis generalizada progresiva y su correlación con la producción de colágena. Tesis de Maestría. UNAM, 1996.
116. Miller EJ, Rhodes RK. Preparation of the different types of collagen. *Methods in Enzymatology* 82:33-64, 1982.
117. Birkedal-Hansen H, Taylor RE. Detergent-activation of latent collagenase and resolution of its component molecules. *Biochem Biophys Res Commun* 107:1173-1178, 1982.
118. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing SDS and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 102:196-202, 1980.
119. Nagase H. Human stromelysin 1 and 2. *Methods in Enzymatol* 248:449-470, 1995.
120. Murphy G, Cockett MI, Ward RV, Docherty AJP. Matrix metalloprotease degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. *Biochem J* 277:277-279, 1991.

121. Uitto J, Bauer EA, Eisen AZ. Scleroderma. Increased biosynthesis of triple-helical type I and type III procollagens associated with unaltered expression of collagenase in skin fibroblasts in culture. *J Clin Invest* 64:921-930, 1979.
122. Krieg T, Luderschmit C, Weber L, Muller PK, Braun-Falco O. Scleroderma fibroblasts: some aspects of in vitro assessment of collagen synthesis. *Arch Dermatol Res* 270:263-272, 1981.
123. Takeda K, Hatamochi A, Ueki H, Nakata M, Oishi Y. Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol* 103:359-363, 1994.
124. Perlish JS, Bashey RI, Stephens RE, Fleischmajer R. Connective tissue synthesis by cultured scleroderma fibroblasts. I. In vitro collagen synthesis by normal and scleroderma dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum* 19:891-901, 1976.
125. Neely AN, Brown R, Clendening Ch, Orloff MM, Gardner J, Greenhalgh D. Proteolytic activity in human burn wounds. *Wound Rep Reg* 5:302-309, 1997.
126. García R, Ballesteros LM, Hernández-Pérez O, Rosales AM, Espinosa R, Soto H, Díaz de León L, Rosado A. Metalloproteinase activity during growth, maturation and atresia in the ovarian follicles of the goat. *Animal Reproduction Science* 47:211-228, 1997.
36. Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC, Wachter MP, Margulies IM, Liotta LA. The activation of human type IV collagenase proenzyme. Sequence identification of the major conversion product following organomercurial activation. *J Biol Chem* 264:1353-1356, 1989.
128. Brown PD, Levy AT, Margulies IM, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines. *Cancer Research* 50:6184-6191, 1990.
129. Keski-Oja J, Lohi J, Tuuttila A, Tryggvason K, Vartio T. Proteolytic processing of the 72,000-Da type IV collagenase by urokinase plasminogen activator. *Exp Cell Res* 202:471-476, 1992.
130. Kuroda K, Shenkai H. Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 289:567-572, 1997.

131. Kahari V-M. Activation of dermal connective tissue in scleroderma. *Ann Med* 25:511-518, 1993.
132. Kahari V-M, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 6:199-213, 1997.
133. Brincherhoff CE, Nagel JE. Collagenase production by cloned populations of rabbit synovial fibroblasts. *Coll Relat Res* 5:433-444, 1981.
134. Zeng G, Millis A. Expression of 72-kDa gelatinase and TIMP-2 in early and late passage human fibroblasts. *Exp Cell Research* 213:148-155, 1994.
135. Gruber B, Sorbi D, French D, Marchese MJ, Nuovo G, Kew R, Arbeit LA. Markedly elevated serum MMP-9 (Gelatinase B) levels in rheumatoid arthritis: a potentially useful laboratory marker. *Clin Immunol Immunopathol* 78:161-171, 1996.
136. 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* 39:1576-1587, 1996.
137. Fields GB, Netzel-Arnett SJ, Windsor LJ, Engler JA, Birkedal-Hansen H, Wart HE. Proteolytic activities of human fibroblast collagenase: hydrolysis of a broad range of substrates at a single active site. *Biochemistry* 29:6670-6677, 1990.