

03062



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

8

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO

rey

EFFECTO DEL FibroquelTM SOBRE EL METABOLISMO
DE LA COLAGENA EN CULTIVOS CELULARES DE
FIBROBLASTOS Y MACROFAGOS DE RATA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO
DE MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMÉDICA
BÁSICA

P R E S E N T A

FERNANDO EDGAR KRÖTZSCH GÓMEZ



BIOMÉDICAS

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

JURADO ASIGNADO:

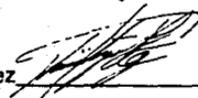
**PRESIDENTE.
SECRETARIO.
VOCAL.
SUPLENTE.
SUPLENTE.**

**Dr. Horacio Merchant Larios.
Dr. Rafael Saavedra Durán.
Dr. Lino Díaz de León Hernández.
Dr. Jesús Manuel León Cázares.
Dr. Alejandro Zentella Dehesa.**

ASESOR DEL TEMA: Dr. Lino Díaz de León Hernández



SUSTENTANTE: Fernando Edgar Krötzsch Gómez



Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la U.N.A.M., con apoyo de ASPID S.A. de C.V.

**Conseguirás la grandeza
cuando prescindas de la dignidad
de los que están por encima de ti
y hagas que los que están por debajo
prescindan de tu propia dignidad.
Cuando no seas arrogante con el humilde
ni humilde con el arrogante.**

Anthony de Mello, en "La Oración de la Rana 2".

CONTENIDO

I. Resumen	2
II. Antecedentes	3
III. Introducción	17
IV. Hipótesis	21
V. Material y Métodos	22
VI. Resultados	29
1. Figuras de incorporación de timidina	30
2. Figuras de síntesis de colágena	33
3. Figuras de actividad colagenolítica de fibroblastos	36
4. Figuras de actividad colagenolítica de macrófagos	39
VII. Discusión	41
VIII. Conclusión	46
IX. Lista de abreviaturas	47
X. Referencias	48

I. RESUMEN

El balance en la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz extracelular se altera temporalmente durante el proceso normal de reparación y es modulado por una gran variedad de mecanismos, algunos biológicos, como las interacciones de las células con la matriz que las rodea, estímulos celulares autócrinos y parácrinos, y otros a través de medicamentos. En este estudio, evaluamos la actividad de un fármaco con acción hemostática, cicatrizante y fibrolítica, Fibroquel^{MR}, sobre el metabolismo de la colágena en cultivos celulares de fibroblastos y macrófagos murinos. Los resultados indican que la actividad del medicamento es diferente de la expresada por sus componentes por separado, colágena tipo I y polivinilpirrolidona. Así, el efecto del medicamento sobre la síntesis de la colágena en cultivos de fibroblastos, mostró un incremento hasta del 150 % con respecto al control, mientras que la actividad colagenolítica en este mismo tipo celular disminuyó hasta el 30%. En cuanto a la actividad degradativa medida en los macrófagos se incrementó hasta el 100%, prácticamente en todas las concentraciones probadas. Además, se observaron efectos cooperativos inducidos por el medicamento, tanto en la síntesis como en la degradación de la colágena en ambas estirpes celulares, al cultivar a los fibroblastos en presencia de los medios condicionados de los macrófagos, previamente expuestos al medicamento y *vice versa*. Cabe señalar que los efectos que se presentaron tanto en los macrófagos como en los fibroblastos, son un reflejo de la actividad que tiene el medicamento sobre las células, ya que en los ensayos para la incorporación de timidina, no hubo diferencias significativas en la proliferación celular con respecto al control. Estos resultados sugieren la participación del Fibroquel^{MR} en el incremento del recambio de la colágena, lo cual favorece la reestructuración del tejido dañado.

II. ANTECEDENTES

Los procesos de reparación tisular dependen de una gran variedad de mecanismos interrelacionados que generan cascadas de fenómenos tales como la liberación de factores solubles que median la quimiotaxis, la activación de algunas estirpes celulares, la proliferación, la síntesis y degradación de los componentes de la matriz extracelular (MEC) y la apoptosis (Desmoulière A., et al., 1995, Schmitt-Gräff A., et al., 1994), todos ellos cruciales para la reparación adecuada del tejido dañado. La asociación de la matriz con las células que la producen y algunas otras estirpes de transición, como los macrófagos y los linfocitos, forman los constituyentes del tejido conjuntivo, el cual a su vez es el marco arquitectónico y de interacción del cuerpo de los vertebrados, en donde, las cantidades de sus componentes varían entre los diferentes órganos. En la mayoría de los tejidos conjuntivos, las macromoléculas de la matriz son secretadas de manera abundante por células derivadas del mesénquima como son los fibroblastos; mientras que en los tejidos conjuntivos especializados como el cartílago o el hueso, éstos son secretados por otra variedad de células también derivadas del mesénquima, tales como los condrocitos en el cartílago y los osteocitos en el hueso.

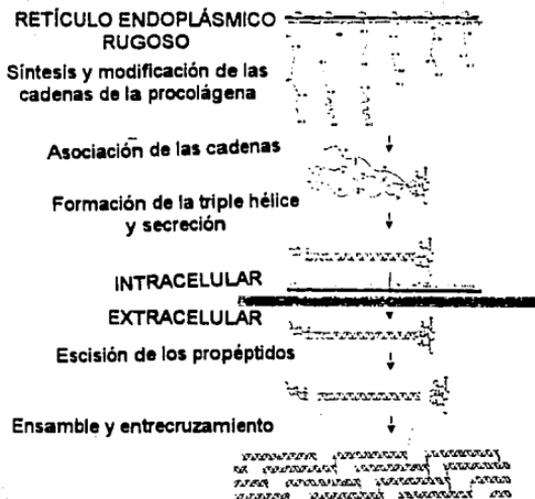
Cada uno de los componentes de la MEC se clasifican de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas y fisiológicas; así existen las proteínas fibrosas de dos tipos funcionales: las estructurales, principalmente como la colágena y la elastina, y las básicamente adhesivas como la fibronectina y la laminina, 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 por ejemplo, existe una gran variedad de moléculas de la matriz dérmica, las cuales son parte sustancial del espacio intercelular que se forma por medio de una red intrincada de macromoléculas, que incluyen varios

tipos de colágena. Las variaciones en la composición, los niveles de estas macromoléculas y la manera en como están organizadas, dan lugar a una diversidad de formas, cada una adaptada a los requerimientos particulares de cada tejido. Así tenemos a la colágena fibrilar intersticial, que se compone por los tipos I y III, los cuales se asocian en forma de fibrillas junto con la colágena tipo V, la cual regula el diámetro de las fibras. Basado en las cantidades de los diferentes tipos de colágena extraídos de la dermis, las proporciones relativas de ellas en la piel adulta son del 80 al 90% de colágena tipo I, del 8 al 12% de la tipo III y menos del 5% de la tipo V. La alta concentración de la colágena tipo I contribuye a la gran fuerza de tensión de la dermis y a su resistencia a la deformación. La colágena tipo VI, también es relativamente abundante en la dermis, donde esta organizada como filamentos finos que se intercalan con las fibrillas de colágena, y la distribución tan variada en que se presenta, sugiere que tenga un papel en la organización de otros de los componentes de la matriz (Holbrook K.A. y Smith L.T., 1993) junto con la influencia del citoesqueleto de las células que la producen.

Las proteínas adhesivas participan en la interacción de las células con la MEC y con otras células, la fibronectina por ejemplo, promueve la interacción de los fibroblastos y otros tipos de células con la matriz del tejido conjuntivo, mientras que la laminina promueve la unión de las células epiteliales a la lámina basal. Las moléculas de los glucosaminoglicanos (GAG) y proteoglicanos en el tejido conjuntivo, forman una sustancia fundamental hidratada, tipo gel, en la cual se encuentran embebidas las proteínas fibrosas, de tal manera que este gel resiste las fuerzas compresivas en la matriz y las fibras de colágena principalmente proveen la fuerza tensil. La fase acuosa del gel de polisacáridos permite la difusión rápida de los nutrientes, metabolitos, hormonas y otros factores solubles entre la sangre y las células de los tejidos.

Si bien las proteínas de la MEC son una parte estructural del tejido conjuntivo, como se mencionó, también tienen un papel informacional para las células adyacentes (Hay E.D., 1991), ya que se ha demostrado que los substratos de colágena, *in vitro*, tienen influencia en la morfología, la diferenciación de varios tipos celulares y la síntesis de macromoléculas características del fenotipo diferenciado, que incluyen a los mioblastos, condrocitos, células del parénquima hepático, células epiteliales mamarias y de la córnea, células de Schwann y células epidérmicas de cobayos. Por su parte, los fibroblastos humanos cultivados en geles tridimensionales de colágena presentan un periodo de reposo mayor antes de comenzar el crecimiento, mientras que las células que proliferan sobre los geles o el plástico crecen en una superficie bidimensional con los cambios resultantes que esto puede inducir (Schor S.J., 1980). Este papel mecánico de los fibroblastos en la formación de las matrices de colágena se ha comprobado por medio de diversos estudios en cultivos en donde no solamente se observa su participación en la contracción de los geles de colágena sino también en la modificación de su forma (Tomasek J.J., et al., 1982) y en el metabolismo influenciado por ella; *in vivo*, las células están embebidas en la MEC y reconocen sus macromoléculas constitutivas a través de componentes de membrana específicos tales como las integrinas, anclinas, proteoglicanos, etc. Muchos tipos celulares presentan *in vitro* propiedades contráctiles que resultan en la retracción de los geles de colágena polimerizada, por temperatura y pH neutro. En tales condiciones, los fibroblastos detienen su crecimiento y se reprime su actividad biosintética, al menos parcialmente, por medio de mecanismos pretraduccionales. Cuando los fibroblastos de la piel ejercen fuerzas de retracción en un soporte de colágena inmovilizada en sus extremos, éstos mantienen la tensión por la fuerza mecánica generada (Lambert C.A., et al., 1992).

El cultivo de fibroblastos en un medio tridimensional reconstituido principalmente por fibrillas de colágena tipo I, se introdujo hace aproximadamente una década y ha probado ser una herramienta valiosa en el estudio de la morfología celular, así como de la síntesis y degradación de los componentes del tejido conjuntivo. También puede ser útil para el estudio de los factores de crecimiento y del efecto de fármacos sobre el metabolismo de los fibroblastos, en condiciones que semejen más estrechamente la situación *in vivo* que los cultivos en monocapa. El sistema ha sido caracterizado por dos efectos determinantes, una inducción importante en la actividad colagenolítica, y la disminución concomitante en la síntesis de la colágena; esta última, tiene características particulares con respecto a otras proteínas, ya que durante su biosíntesis, se presentan modificaciones postraduccionales, como la glucosilación e hidroxilación, a nivel intracelular y la escisión de los péptidos terminales en el medio extracelular de la molécula precursora, la procolágena, (Ehrlich H.P. y Bornstein P., 1972, Paglia L.M. et al., 1981, Olsen B. et al., 1977), como se muestra en el esquema.



Tanto la actividad colagenolítica como la biosíntesis de la colágena, son procesos controlados a un nivel pretraduccional, sin embargo, los mecanismos participantes en los cultivos en geles de colágena o sobre matrices de la misma, aún no han sido esclarecidos en detalle (Eckes B., et al., 1993). Empero, no solamente se ha observado una disminución de la proliferación celular y de la síntesis de la colágena, sino también la reducción en el ARNm que codifica para la colágena tipo I, así como un aumento en los niveles basales del transcrito para la colagenasa, paralelos al incremento en la actividad colagenolítica en geles de colágena libres; es decir que no estén adheridos al plástico por los bordes, comparado con los cultivos en monocapa. De tal forma que la reducción de los niveles basales del ARNm se atribuye a un control postranscripcional. Esta reducción se puede explicar en parte por la disminución en la transcripción del gen, ya que el análisis de los elementos reguladores positivos en el promotor del gen, para la cadena pro $\alpha 1(I)$ de la colágena no indica la participación en la regulación negativa de la transcripción para esta molécula. Sin embargo, el ARNm para la cadena $\alpha 1$ de la colágena tipo I, en los cultivos de fibroblastos crecidos sobre un sustrato de colágena, es estable solamente la mitad del tiempo cuando se compara con los cultivos en monocapa. Así, en este sistema, una cantidad menor del ARNm es transcrito inicialmente y además esas moléculas son menos estables. De esta manera, el nivel basal se reduce y corresponde a una disminución similar de los niveles de la proteína. Otros grupos también han estudiado la estabilidad del ARNm para la cadena pro $\alpha 1$ de la colágena tipo I en cultivos en monocapa de fibroblastos humanos y murinos que presentan vidas medias mayores. Esas diferencias pueden deberse a las condiciones de cultivo utilizadas, ya que está establecido que la disminución en el tiempo de adherencia correlaciona con el acortamiento de la vida media del ARNm para la colágena (Eckes B., et al., 1993). Además de los efectos ya mencionados sobre la

colágena tipo I, se presenta una disminución de los transcritos para los tipos de colágena III y VI, elastina y fibronectina, lo cual sugiere que las modificaciones se deben al contacto de las células con la colágena. Sin embargo, esos cambios se revierten parcialmente cuando los geles se mantienen bajo tensión. Esto sugiere que la regulación que ocurre en los geles tridimensionales de colágena, está relacionada con la información que ella provee a las células, más que a la naturaleza química de las moléculas constituyentes; esta hipótesis se apoya con base en la observación de resultados similares en la disminución de la síntesis de la colágena por fibroblastos en geles retráctiles de fibrina. Aunque la modulación por tensión opera a nivel pretraduccional, los niveles basales del ARNm específico para los diferentes tipos de macromoléculas estructurales no se presentan en la misma proporción en todos ellos. Así, el incremento máximo se tiene para los polipéptidos de la colágena tipo I ya que como se mencionó este tipo de colágena participa en el desarrollo de la resistencia mecánica del tejido conjuntivo. Por su parte, el incremento en la síntesis de la elastina es el menor, en cuanto a la fibronectina y las cadenas de colágena $\alpha 1$ (III) y las $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (VI) son modificadas de manera similar, mientras que la cadena $\alpha 3$ (VI) se incrementa más en geles bajo tensión. La modulación diferencial de este tipo de colágena sugiere que pueda tener una función reguladora en el ensamble de la molécula tipo VI. De tal forma que su participación en la interacción colágena-célula sugeriría entonces una función mecánica del tejido conjuntivo.

Un componente importante que es necesario considerar durante la actividad degradativa producida por los fibroblastos y otros tipos celulares, es la presencia de los inhibidores de proteasas de la matriz. Las enzimas son secretadas como zimógenos o proformas inactivas y son bloqueadas por inhibidores específicos del tejido, conocidos como inhibidores de las colagenasas o metaloproteasas (TIMP, por sus siglas en inglés). La

familia de las metaloproteasas contiene al menos nueve miembros genéticamente diferentes: dos colagenasas intersticiales, las cuales degradan a las colágenas tipo I, II y III, tres estromelisininas con actividad sobre colágenas con triple hélice interrumpida y otras proteínas no colagénicas, y finalmente se encuentran las colagenasas tipo IV o gelatinasas, que degradan específicamente colágena tipo IV o colágena desnaturalizada (gelatina) (Reponen P., et al., 1994, Quantin B., et al., 1989), todas ellas susceptibles de ser bloqueadas por los TIMP que funcionan en proporción estequiométrica; es decir, cuando una colagenasa se manifiesta en forma activa es porque su secreción es mayor que la de los TIMP o por haber sido activada a través de otros mecanismos que estimulen su sobreproducción, tal es el caso de cuando existe la activación específica de la células por citocinas. Sin embargo, existen reportes en donde se muestra que la activación de algunas colagenasas producidas por cultivos de fibroblastos en geles de colágena, se manifiesta aún en presencia de los niveles normales de los TIMP lo cual indica que la proporción de las proteasas es mayor que la de los inhibidores y que la activación de éstas se debe a la interacción de las células con la colágena del medio, posiblemente por medio de las integrinas (Seltzer J.L., et al., 1994), ya que participan como receptores para la colágena y otros componentes de la MEC y se encuentran en mayor proporción en los cultivos de fibroblastos crecidos en geles de colágena, donde la contracción del gel se lleva a cabo por interacción con las integrinas (Klein C.E., et al., 1991) de las que se sabe, juegan un papel importante en la transducción de la señal (Roedel D. y Krieg T., 1994) por medio de la elevación del pH intracelular y los niveles del calcio, por la activación de proteínas cinasas y/o cambios en el metabolismo de fosfolípidos que conllevan a la modificación de la expresión génica (Richardson A. y Parsons T., 1995).

La adhesión celular específica y la migración son mecanismos esenciales a los procesos de organogénesis durante el desarrollo embrionario, metástasis de tumores, la reparación tisular posterior a la inflamación y la cicatrización. La MEC tiene una participación fundamental en todos los aspectos de la remodelación tisular y en la mayoría de las alteraciones del proceso de cicatrización, es decir en la fibrosis del tejido. Actualmente se ha eliminado la noción histórica de que la MEC no es más que un biosoporte alrededor de las células. Los datos que se han generado en los últimos años muestran que la MEC, lejos de ser un soporte inactivo, dirige activamente los pasos claves del programa de cicatrización y regeneración, durante el proceso postinflamatorio de la cicatrización y la remodelación del tejido, por su capacidad de generar arreglos de las estructuras a través de interacciones dinámicas entre sus múltiples componentes, proteicos y no proteicos. Esa diversidad de la MEC la hace capaz de modular el comportamiento celular y el fenotipo, de unir específicamente a factores solubles como las citocinas y los factores de crecimiento, de tal manera que captura reguladores de la respuesta en el microambiente del tejido cicatrizal; finalmente por su organización geométrica facilita la migración celular y modula las interacciones célula-célula. Por su parte, la dinámica de las interacciones célula-matriz son modificadas continuamente por citocinas locales y están sujetas a la regulación por mecanismos transcripcionales, postranscripcionales, traduccionales y postraduccionales, durante la reparación al daño. De tal forma que la relación entre los componentes de la MEC y las citocinas se debe a las interacciones sinérgicas o antagónicas entre algunas citocinas y ciertas regiones de los componentes de la matriz, como la similitud que existe entre las regiones de algunas proteínas y las del EGF (Raghow R., 1994).

Así, las hipótesis de trabajo para investigar los mecanismos de regulación disparados por fuerzas mecánicas, toman en consideración la expresión inversamente coordinada

de los genes que codifican para las colágenas y sus enzimas de degradación. Esto es comparable, por observaciones similares con los efectos de los factores de crecimiento, tales como la interleucina 1 (IL-1) (Newman K.M., et al., 1994), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el interferón gamma (IFN- γ) y los ésteres de forbol promotores de tumores, en la expresión de esos genes. Sin embargo, sigue siendo desconocido si los mismos factores pueden dirigir la regulación positiva de la expresión de la colagenasa y la regulación negativa de la colágena, y viceversa. También se ha sugerido que la regulación negativa por el TNF- α en la expresión génica de la cadena $\alpha 2(I)$ de la colágena tipo I es mediada por el complejo AP-1, conocido como un activador de la expresión de la colagenasa. Aunque no hay evidencia de que la unión de AP-1 en el gen de la cadena $\alpha 2$ de la colágena tipo I pudiera incluir la activación de un factor inhibidor (Lambert C.A., et al., 1992). Por su parte los efectos de las citocinas sobre la producción de los inhibidores de metaloproteasas difiere de un tipo a otro de citocina y el efecto de la misma citocina sobre la síntesis del inhibidor también es distinto de célula a célula. Tal es el caso de la IL-1 β , la cual inhibe la producción de TIMP en las células endoteliales, pero la incrementa en los sinoviocitos y los condrocitos. Por su parte, el TNF- α bloquea la producción de los inhibidores en las células endoteliales, los sinoviocitos y los condrocitos (Shingu M., et al., 1993).

Aunque se han descrito cerca de cien actividades biológicas reguladoras distintas, es claro que no todas esas actividades resultan de citocinas diferentes, sino que provienen de un número menor de ellas que posee actividades biológicas compartidas. Así, mientras la mayoría de esos péptidos fueron caracterizados originalmente por sus actividades moduladoras del crecimiento en las células blanco, muchas otras citocinas también influyen la estructura del citoesqueleto, la quimiotaxis y la inducción en la

expresión de una gran variedad de genes. Por su parte, los fagocitos mononucleares han mostrado tener un papel central en la respuesta tisular al daño. Las interacciones entre las células inmunes y las mesenquimáticas son mediadas por citocinas; esto se demostró *in vitro* utilizando sobrenadantes de macrófagos que estimulaban la proliferación de fibroblastos de heridas. Los fagocitos mononucleares son células claves en la respuesta inmune tisular, reguladora y efectora, que secretan más de cien moléculas biológicamente activas, la mayoría de la producción de ellas, *in vitro* e *in vivo*, se afecta por las citocinas, de las cuales los macrófagos secretan casi dos docenas que a su vez regulan otras citocinas (Nathan C.F., 1990). Entre las citocinas que producen los monocitos, algunas de las mejor descritas son la IL-1, el TNF- α , la IL-6, el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Mientras se sugiere que la mayoría de los mediadores extracelulares pueden alterar el crecimiento y el metabolismo de los fibroblastos, una serie más limitada de ellos participa en la producción del tejido cicatrizal. Dos de esas citocinas, TGF- β y PDGF, han demostrado ser fibrogénicos a un nivel importante, que es capaz de disparar directamente la proliferación y/o estimular la síntesis de la colágena. Estos mediadores no son liberados espontáneamente por cultivos de monocitos o macrófagos, sino que pueden ser secretados *in vitro* por la adición de lectinas, mitógenos y linfocinas como el IFN- γ . Además, al evaluar la producción de tejido conjuntivo *in vitro* se observó que los macrófagos tienen efectos cualitativos y/o cuantitativos sobre la síntesis de la colágena por los fibroblastos. Lo último incluye un incremento en los niveles de colágena tipo III con respecto a los producidos por la colágena tipo I (Kovaks E.J., 1991). La síntesis de la colágena se regula tanto *in vivo* como *in vitro* por una variedad de factores tan diferentes como las condiciones de cultivo, productos del procesamiento de la

procolágena, ácido ascórbico (Kao J., et al., 1990), factores de crecimiento, etc. De la misma manera, la degradación también se regula por la interacción con los componentes de la matriz o por agentes como los ésteres de forbol, la citocalicina B, los factores de crecimiento, etc. Por ejemplo, el EGF incrementa los niveles del ARNm para la procolagenasa tisular, la proestromelina y los TIMP, mientras que disminuyen para la procolágena $\alpha 1(I)$ (Colige C., et al., 1992). Por su parte, la estimulación de la síntesis de la colágena es otra forma en la cual las citocinas fibrogénicas pueden actuar para inducir el depósito de tejido conjuntivo. Si bien existen más de veinte tipos de colágena diferentes, el análisis de los efectos fibrogénicos de las citocinas se ha enfocado en los tipos de colágena I y III, dado que son los elementos predominantes en el tejido conjuntivo alterado en los procesos de reparación y remodelación. Así, se sabe que los factores derivados de los macrófagos y de los linfocitos, incluyen a los factores activadores de los fibroblastos, cuya función es estimular la síntesis y secreción de la colágena. Lo anterior se apoya con los reportes que documentan la inducción en la expresión del ARNm para la procolágena tipo I y III, en cultivos de fibroblastos tratados con IL-1 α e IL-1 β , que también puede inhibir el efecto estimulador del TGF- β en la expresión génica de la colágena en fibroblastos humanos de piel. Además de lo mencionado, la IL-1 puede influenciar la acumulación de algunos de los componentes de la MEC, al estimular o inhibir la actividad de las colagenasas. En cuanto al papel del TNF- α en la regulación de la producción de la colágena no es muy claro, pues algunos reportes indican que estimula la síntesis mientras que la mayoría apuntan a que la disminuye. En contraste al efecto estimulador de la producción de la colágena de la mayoría de las citocinas, los interferones (IFN) abaten su expresión génica; el IFN- γ por ejemplo, suprime la producción de la colágena en los fibroblastos, al actuar a nivel transcripcional al apagar al gen que codifica para la colágena pero no el que codifica

para la fibronectina (Kovacs E. y DiPietro L.A., 1994). Los estudios con IL-1 han sugerido que esta citocina puede tener un papel básico en la modulación de las actividades biológicas de una variedad de células blanco. Otras de las actividades biológicas de las células derivadas del mesénquima que participan en la síntesis y mantenimiento de la MEC son afectadas por la IL-1, ya que como se mencionó promueve el crecimiento de los fibroblastos y también el de los osteoblastos e incrementa, en éstos, la producción de la fosfatasa alcalina, que es un marcador de la mineralización del tejido. Los fibroblastos dérmicos, las células sinoviales adherentes y los condrocitos producen cantidades incrementadas de colagenasa cuando son tratadas con IL-1, así como de hialuronato y TIMP en fibroblastos, pero no incrementan más de un 20% la síntesis de proteínas no colagénicas; en cuanto a los niveles basales del ARNm para la fibronectina y la β -actina no varían en presencia de la citocina. Así, la degradación intracelular de la colágena recién sintetizada tampoco se ve alterada por el tratamiento de los fibroblastos con IL-1. Aunque la similitud en la secuencia de aminoácidos entre las isoformas de la IL-1 α y la IL-1 β es solamente del 27%, existe la posibilidad de que ambas contengan un dominio funcional común en porciones similares de las dos isoformas, además de tener funciones biológicas semejantes. Por su parte, los fibroblastos en cultivo han mostrado tener niveles altos de receptores para IL-1 β los cuales parecen unir ambas isoformas con la misma afinidad (Postlethwaite A.E., et al., 1988). Entre otras citocinas se encuentra la IL-10 la cual también participa en la regulación de la síntesis y la degradación de la colágena. La influencia de la IL-10 sobre la expresión génica puede deberse a los efectos directos en los elementos de respuesta AP-2, NF-1 y NF- κ B o puede estar mediada por los efectos de esta citocina sobre otras (Reitamo S., et al. 1994). La actividad reguladora de los fibroblastos cultivados en geles tridimensionales de colágena, incluye una mayor expresión de la IL-6, comparada con

los cultivos en monocapa; que posiblemente se debe a las interacciones célula-matriz mediante receptores de colágena asociados a la membrana celular, que transmiten la señal a través de la red del citoesqueleto hasta el núcleo, lo cual resulta en una alteración de la expresión génica para esta citocina cuya participación es fundamental en la regulación de otros factores relacionados con el metabolismo de los componentes de la matriz (Eckes B., et al., 1992).

El PDGF y el TGF- β son dos factores fibrogénicos y pueden participar directamente sobre la proliferación de los fibroblastos a la par con el TNF- α . Aunque está claro que el PDGF es inductor de la proliferación de los fibroblastos, el TNF- α y el TGF- β han sido identificados como inductores e inhibidores del crecimiento de los fibroblastos. A bajas concentraciones, el TNF- α estimula la proliferación de algunas líneas celulares de fibroblastos y a dosis mayores la bloquea. En cuanto a los efectos proliferativos del TNF- α y el TGF- β , se sabe que se deben en parte a la inducción en la producción de la cadena A del PDGF por las células blanco (Gallit J. y Clark R.A.F., 1994).

En contraste al efecto directo de las citocinas mencionadas, otros mediadores como la IL-1 α y la IL-1 β no inducen el crecimiento de los fibroblastos en forma directa, sino que posiblemente disparan la producción de moléculas secundarias, otras citocinas o algunos metabolitos del ácido araquidónico. De esta manera, se ha demostrado que la IL-1 también puede estimular la proliferación de los fibroblastos a los que induce a secretar la cadena A del PDGF, la cual activa a la célula para entrar a la fase de síntesis del ADN del ciclo celular. Además, existe la posibilidad de que el proceso se amplifique como resultado de la regulación positiva de los receptores de los fibroblastos para IL-1, en respuesta al tratamiento con PDGF, ver tabla.

TABLA

CITOCINA	PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASTOS	PRODUCCIÓN DE TEJIDO CONJUNTIVO
IL-1	↑ ↓	↑ ↓
TNF- α	↑ ↓	↑ ↓
TGF- β	↑ ↓	↑ ↓
PDGF	↑ ↓	↑ ↓
FGF	↑ ↓	No detectado
IFN- γ	↑ ↓	↓

III. INTRODUCCIÓN

Con base en lo anterior, se ha establecido que los fibroblastos dérmicos humanos sintetizan y responden a una variedad de citocinas polipeptídicas y a otros mediadores que actúan por mecanismos autócrinos y parácrinos que coordinan el crecimiento y la función de los fibroblastos con otras células, lo cual contribuye en el mantenimiento de la integridad de la piel (Barr R.M., et al., 1992). Las respuestas *in vivo* de las células blanco a las citocinas, finalmente se determinan por la asociación de diversas señales sinérgicas y antagonicas. Solamente algunas de esas señales vienen de la variedad de factores que llegan a las células. Otras pueden provenir del contacto célula-célula y célula-matriz. Así, los fibroblastos cultivados en una matriz de colágena son refractarios a los efectos del TGF- β para la síntesis de colágena y también los cultivos de fibroblastos en geles de colágena contraídos, que son semejantes a la dermis, responden menos al PDGF que los cultivados en geles de colágena sin tensión, similares al tejido de granulación. Por otro lado, se sabe que el contacto con colágena mediado a través de las integrinas puede estimular la expresión de metaloproteasas también en los macrófagos y los queratinocitos (Gallit J. y Clark R.A.F., 1994).

Sin embargo; el balance en la síntesis y la degradación de los componentes de la MEC se altera temporalmente durante el proceso normal de reparación, como ocurre en la cicatrización; de tal forma que las anomalías en el metabolismo de los componentes de la matriz pueden ser las responsables del exceso de fibrosis que ocurre en la escleroderma, morfea, cicatrices hipertróficas y queloides. Estas patologías han sido objeto del desarrollo de diversas terapias, por lo que se han probado varias citocinas y fármacos en cultivos de fibroblastos dérmicos por su capacidad de inhibir la síntesis de algunos de los componentes de la MEC y/o estimular su degradación. Un compuesto, la

pentoxifilina, que es un análogo de la metilxantina teobromina, demostró tener efectos antifibróticos y se ha reportado que la administración de pentoxifilina a cultivos de fibroblastos dérmicos normales, resulta en una inhibición de su proliferación y en la producción de colágena, GAG y fibronectina, asociadas con un incremento en la actividad colagenolítica. Además, la exposición a la pentoxifilina, de fibroblastos derivados de las cicatrices queloides y de la piel de pacientes con escleroderma y morfea, causa una inhibición en la síntesis de la colágena, GAG y fibronectina dependiente de la dosis; sin embargo, estos resultados no mostraron ningún efecto sobre la actividad de colagenasa (Berman B. y Duncan M.R., 1990).

Por otro lado el tranilast, un agente antialérgico, inhibe la acumulación de colágena y no afecta la producción de proteínas no colagénicas en modelos experimentales de inducción del tejido de granulación. Subsecuentemente, se demostró que el tranilast inhibe la liberación del TGF- β , IL-1 β , prostaglandina E₂ e IL-2 por monocitos y macrófagos humanos. Además, en un estudio clínico se demostró que su administración oral fue efectiva para el tratamiento de las cicatrices hipertróficas y queloides (Isaji M. et al, 1994). Otras terapias son la aplicación de glucocorticoides, análogos de prolina (azetidina, deshidroprolina), inhibidores de la glucosilación (tunicamicina), osteolatirógenos (BAPN, D-penicilamina), compuestos con propiedades antimicrotubulares (colchicina, mebendazol), etc. (Darzi M.A. y Chowdri N.A., 1992, Lawrence W.T. 1991, Soderberg T., et al., 1982). Sin embargo; con todas estas terapias y muchas otras de tipo físico y químico no se ha logrado tener el efecto deseado sobre el metabolismo de la colágena, sin alterar otros procesos fisiológicos normales, así que estas alternativas quedan como temporales, paliativas o definitivamente sin éxito e incluso tóxicas.

Como ya se mencionó, algunos de los componentes de la MEC tienen la capacidad de modular el metabolismo de otros. De tal forma que la colágena se ha utilizado como material de bioimplante dado que sus características entre las diferentes especies son muy similares y permiten realizar injertos con un margen de seguridad amplio. Tal es el caso de los trabajos donde se menciona el uso de la colágena heteróloga (de cerdo y ovino) en la regeneración ósea (Ford C.N., 1992, Joos U. y Voguel D., 1980, Joos U., et al., 1980, Shimizu Y., et al., 1978), los cuales han dado el apoyo para utilizarse en humanos con un riesgo mínimo. También se conoce acerca de los implantes dérmicos de colágena (Karam P. y Kiby A.G., 1992) y aquellos enfocados a heridas en donde es difícil que el organismo se repare por sí solo en un periodo breve, dada la disposición y la extensión de la lesión (Koehelein H.E., 1972). Por otro lado, se sabe que un polímero inerte como la polivinilpirrolidona (PVP), al cual no se le han comprobado efectos tóxicos, teratogénicos y carcinogénicos, ha mostrado tener participación en la inducción de la cicatrización, tal es el caso de su uso en el implante de las lentes intraoculares con función de humectante, donde además disminuye la cicatriz alrededor del implante y la cámara del endotelio arterial (Charles G.G., 1987). Este polímero ha sido utilizado desde los años treinta, principalmente como un expansor del plasma sanguíneo y actualmente se emplea como vehículo de productos farmacéuticos, como clarificante en la industria de los alimentos, etc. (Robinson B.V., et al., 1990). Así, la mezcla de varios polímeros inertes con la colágena se ha utilizado para mantener al polímero adherido al tejido, donde forma interacciones entre la colágena implantada y la presente en la matriz del mismo. Cabe señalar que los resultados han sido mejores cuando esta mezcla, polímero-colágena, se irradia entre 1 y 3 Mrad, donde se favorecen los entrecruzamientos en la colágena y se crea una unión aparente entre el polímero y la proteína (Shimizu Y., et al., 1978). Con base en las características mencionadas, la

mezcla irradiada de colágena y PVP (Fibroquel^{MR}), también ha mostrado tener participación directa en los procesos reparativos de la piel y de otros tejidos. Lo anterior se justifica con el tratamiento de heridas quirúrgicas en ratas donde el Fibroquel^{MR} induce una remodelación mayor en el sitio de la lesión y conlleva a una mejor disposición de las fibras de la colágena y a una remodelación muy similar a la arquitectura de la piel normal (Kröttsch-Gómez F.E., et al., 1993). Además, el fármaco participa en la remodelación de la fibrosis, como es el caso de la contractura de tendón en niños con parálisis cerebral y en cicatrices hipertróficas y queloides (Díaz de León L. et al., 1994 y datos no publicados de nuestro grupo).

Con base en lo anterior se diseñó este proyecto para demostrar el efecto del Fibroquel^{MR} y sus componentes por separado (colágena y PVP) sobre el metabolismo de la colágena en cultivos celulares de fibroblastos y macrófagos, ya que estos dos tipos celulares son los más abundantes en los procesos de reparación y fibrosantes.

IV. HIPÓTESIS

El Fibroquel^{MR} participará en la modulación del metabolismo de la colágena en cultivos celulares de fibroblastos y macrófagos. Esta regulación se verá dirigida hacia incrementar el recambio de la proteína, es decir, se incrementará la actividad colagenolítica y disminuirá la síntesis de la colágena en las estirpes tratadas con el fármaco y los efectos observados serán el resultado de su componente colagénico.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos celulares. Las condiciones de incubación de los cultivos celulares de macrófagos y fibroblastos se mantuvieron con medio de Dulbecco-Eagle Modificado (D-MEM con glutamina y alta glucosa) en presencia del 10% de suero de bovino fetal inactivado a 56 °C por 30 minutos (SBF), en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37 °C.

Cultivos de macrófagos. Los cultivos de macrófagos se generaron a partir de una línea transformada de ratón, la P-388, los cuales tienen características particulares identificadas en la American Type Culture Collection (ATCC). Esta línea se hizo proliferar en D-MEM 10% de SBF. La confluencia de los cultivos se identificó visualmente y el subcultivo se realizó levantando las células con un gendarme de plástico y transfiriéndolas de una a dos botellas.

Cultivos de fibroblastos. Los cultivos de fibroblastos se generaron a partir de biopsias de piel dorsal de rata recién nacida (1 a 3 días) tomada en condiciones asépticas. La técnica de derivación fue por cultivo celular como se indica a continuación. El fragmento de piel se lavó tres veces en D-MEM con antibióticos (100 U/ml de penicilina y 5 µg/ml de estreptomycin) y se transfirió a una solución de colagenasa bacteriana tipo II (SIGMA) al 0.25% en solución de Hanks, se cortó con tijeras quirúrgicas en trozos de aproximadamente 2 mm² y se incubó en un tubo de 50 ml con 15 a 30 ml de la solución de colagenasa a 35 °C en baño de María por 2 a 3 horas con agitación ocasional. El homogenado se centrifugó a 200 x g por 5 minutos y se eliminó la colagenasa; el botón se resuspendió en D-MEM al 20% con SBF con antibióticos y se

sembraron 1.5 ml por botella de cultivo de 25 cm², el cultivo se incubó en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37 °C. A las 24 horas se eliminó el medio de cultivo y los fragmentos de tejido, posteriormente se adicionaron 1.5 ml de D-MEM 20% SBF con antibióticos y se mantuvo así de 3 a 5 días, después de los cuales se eliminó el medio y se alimentó con D-MEM al 10% con SBF (sin antibióticos). Una vez que el cultivo llegó a confluencia se eliminó el medio y se adicionó verseno, se incubó de 2 a 5 minutos a temperatura ambiente (TA) y se eliminó el verseno, inmediatamente se agregó tripsina 0.25% en verseno y se incubó de 2 a 5 minutos a 35 °C. Una vez que las células se observaron con morfología redonda se golpeó la botella por los lados para favorecer que éstas se desprendieran y se agregó D-MEM 10% SBF; la suspensión celular se repartió de una a dos botellas, este fue el primer pase y se trató de la misma manera en los subsiguientes hasta llegar al cuarto, donde fueron utilizadas para los experimentos de metabolismo.

Condiciones experimentales en los cultivos. Las líneas de fibroblastos y macrófagos fueron sembradas a subconfluencia en placas de 24 pozos (2 cm² c/u) con 5 x 10⁴ y 1 x 10⁵ células/cm², respectivamente, con 1 ml de D-MEM 10% SBF para los fibroblastos y 1.5 ml para los macrófagos; los cultivos se incubaron por 48 horas en las condiciones mencionadas. Después del periodo de incubación se eliminó el medio a todos los pozos, se agregaron 500 µl de D-MEM por pozo y se incubaron de 3 a 5 horas. Posteriormente se eliminó otra vez el medio y se agregaron las condiciones de prueba las cuales fueron: 500 µl de D-MEM, 500 µl de D-MEM 10% SBF, 500 µl de colágena tipo I (Pentapharm) previamente dializada contra ácido acético 5 mM, en concentraciones de 2, 4, 8 y 10% en D-MEM, con respecto a su contenido en Fibroquel^{MR}, 500 µl de polivinilpirrolidona (PVP, GAF Corp) en concentraciones de 2, 4,

8 y 10% en D-MEM, con respecto a su contenido en Fibroquel^{MR} y 500 μ l de Fibroquel^{MR} en concentraciones de 2, 4, 8 y 10% en D-MEM y se incubaron por 18, después de las cuales se realizaron las evaluaciones.

Medios condicionados. En otro experimento se trató a los fibroblastos con el medio condicionado de los macrófagos; para ello se sembraron fibroblastos, como se menciona arriba, y se les adicionaron 300 μ l del sobrenadante de los cultivos de los macrófagos previamente expuestos a cada una de las condiciones de prueba (D-MEM, D-MEM 10% SBF, colágena, PVP y Fibroquel^{MR}) y 200 μ l de D-MEM fresco, la incubación fue por 18 horas en las mismas condiciones que los anteriores. Por otro lado, se realizó el mismo experimento exponiendo a los macrófagos a los medios condicionados de los fibroblastos (Nóel A., et al., 1992).

Conteo celular. Para determinar la cantidad de células vivas en los pozos después del período de incubación (18 horas) se eliminó el medio y se levantó la monocapa con verseno/tripsina 0.25% y de esta suspensión se tomó una alícuota de 15 μ l y se mezcló con 15 μ l de azul tripano y se realizó el conteo celular en un hemocitómetro.

Incorporación de timidina [³H]. La cuantificación de la timidina incorporada se llevó a cabo con la técnica de Miki Y., et al., 1987. Para las muestras de incorporación de timidina [³H] se adicionó 1 μ Ci de metil, [1',2'-³H] timidina (1mCi/ml, Amersham) por pozo junto con las condiciones de prueba y se incubaron por 18 horas. Después de este período se eliminó el medio y los pozos fueron lavados tres veces con amortiguador salino de fosfatos (PBS) y después se fijaron con 300 μ l de metanol absoluto (MeOH)

por 30 minutos a 4 °C . Posteriormente se eliminó el MeOH y las placas se dejaron secar. El residuo se resuspendió en 400 µl de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M y se agitaron vigorosamente hasta obtener la disolución total; de esta solución se tomaron alícuotas de 50 µl para conteo de radiactividad. La incorporación de timidina [³H] se normalizó con un número celular determinado.

Incorporación de prolina [¹⁴C]. La cuantificación de la incorporación de la prolina se llevó a cabo con una modificación a la técnica de Dieggelmann R.F., et al. (1990), (Chojkier M., et al., 1980, Peterkofsky B. y Dieggelmann R., 1971). Para las muestras de incorporación de prolina [L-U-¹⁴C] (250 µCi/5 ml, Amersham) se agregaron 50 µg/ml de ácido ascórbico y 1 µCi de prolina [¹⁴C] por pozo junto con las condiciones de prueba y se incubaron por 18 horas. Después de este periodo se adicionaron 500 µl de agua destilada a cada pozo y éstos fueron sonicados por 20 segundos al 40 % de la potencia de un sonicador, "Sonic dismembrator" modelo 50 (Fischer Scientific). Los homogenados de monocapa (MC) y sobrenadante (SN) se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 ml y se precipitaron por la adición de ácido tricloroacético (TCA) y L-Pro a una concentración final de 10% y 1 mM, respectivamente. La suspensión fue centrifugada a 13,600 x g por 10 minutos y el botón se lavó tres veces con TCA al 5%, L-Pro 1 mM. Después del último lavado el botón se lavó en 500 µl de etanol-éter etílico (EtOH-EtOEt) 1:1 y se centrifugó a 5,000 x g por 10 minutos, el SN se eliminó y el botón se dejó secar a 4 °C. El residuo seco se resuspendió en un amortiguador de HEPES 0.2 M, CaCl₂ 0.5 mM, N-etilmaleimida (NEM) 2.5 mM, pH = 7.2 y se incubó por 90 minutos a TA. Después del tiempo de incubación la solución se precipitó a una concentración final de TCA al 10% y L-Pro 1 mM y se centrifugó a 13,600 x g por 10 minutos. El SN fue eliminado y el botón se lavó con EtOH-EtOEt 1:1 y se centrifugó a 13,600 x g por 10

minutos, el SN se eliminó y el botón se dejó secar como se describió anteriormente. El residuo seco se resuspendió en 490 μ l de un amortiguador HEPES 0.2 M, CaCl_2 0.5 mM, NEM 2.5 mM, pH 7.2 y se adicionaron 10 μ l (5 μ g) de colagenasa tipo VII de *Clostridium histolyticum* (SIGMA) y la solución se incubó 90 minutos a 35 °C. Después de la incubación la solución se precipitó a una concentración final de TCA al 10% y L-Pro 1 mM y se centrifugó a 13,600 x g por 10 minutos, del SN se tomaron los primeros 50 μ l y se depositaron en un vial para conteo de radiactividad, el resto del SN se eliminó y el botón se resuspendió en 500 μ l de TCA 5% y L-Pro 1 mM y se centrifugó nuevamente como antes. De este SN se tomaron los segundos 50 μ l y se mezclaron con los anteriores. Al vial que contenía la muestra se le adicionaron 2.5 ml de líquido de Bray para conteo de radiactividad de las proteínas degradadas por colagenasa (PDC), en un contador de centelleo modelo LS 1801 (Beckman) y el demás SN se eliminó. El botón se resuspendió en 500 μ l de un amortiguador Tris 0.1 M, dodecil sulfato de sodio 0.5%, ditiotreitol 5 mM, pH 7.4; de esta solución se tomaron 100 μ l y se mezclaron con líquido de Bray para conteo de radiactividad de las proteínas no degradadas por colagenasa (PNDC). Las cuentas por minuto (cpm) para PDC y PNDC fueron corregidas a los volúmenes totales y se calcularon por medio de la ecuación de Dieggelmann R.F. y Peterkofsky B. (1972) para conocer la cantidad relativa de colágena y ésta se normalizó con el número celular.

Cuantificación de la actividad colagenolítica. Para cuantificar la actividad colagenolítica se siguió la técnica de Murawaki Y., et al. (1990) con algunas modificaciones. A los pozos con MC y SN se les adicionaron 500 μ l de agua destilada y se sonicaron por 20 segundos al 40 % de la potencia del aparato. Se determinó el volumen total por pozo y después se transfirieron de cada pozo a dos tubos eppendorf

de 1.5 ml 400 μ l del homogenado de MC y SN, uno para la cuantificación de la actividad colagenolítica y otro para el blanco. A cada uno de los tubos para muestra se le adicionaron 100 μ l del amortiguador de Tris 0.25 M, ácido acetilfenilmercúrico (APMA, SIGMA) 5 mM, CaCl_2 25 mM, pH 7.4 y 10 μ l de colágena [^3H] con una actividad específica de 4,000 cpm (donada por M en C Hortensia Soto Trejo). A los tubos para blanco se les adicionó lo mismo excepto por el amortiguador, donde se sustituyó el CaCl_2 por ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 50 mM. Las muestras se agitaron y se incubaron 20 horas a 35 °C. Después del periodo de incubación se agregaron 50 μ l de o-fenantrolina 80 mM en dioxano:agua 1:1 y se incubó 30 minutos a TA. Las muestras y los blancos fueron precipitados por la adición de 500 μ l de dioxano y se centrifugaron a 9,000 x g, 15 minutos a 4 °C. Del SN se tomaron alícuotas de 500 μ l y se mezclaron con líquido de Bray y se contaron para radiactividad. La corrección por volumen se llevó a cabo al considerar las cpm con el número celular.

Procesamiento estadístico de los datos. Las asociaciones entre los grupos de variables cuantificables se determinaron por la prueba *t de student*.

Para llegar al comportamiento obtenido en los cultivos se tuvieron que realizar algunas pruebas con el número de células que se emplearían; por ejemplo, se realizó una curva de crecimiento de donde fueron seleccionadas las concentraciones de 5×10^4 células por cm^2 para los fibroblastos y de 1×10^5 células por cm^2 para los macrófagos, las cuales 48 horas después de haber sido sembradas alcanzaron la confluencia, el efecto que se pretendía, era tener a las células en un estado relajado en cuanto a la proliferación y más activo para la síntesis de proteínas. Otro parámetro de consideración fue el hecho de que tanto la colágena como el Fibroquel^{MR} estaban disueltos en una

solución amortiguadora de citratos con un pH de 3.5 lo cual acidificaba al medio de cultivo y las células no se observaban en buen estado. Para resolver este problema y dado que lo esperado era el efecto de la mezcla polímero-colágena, el fármaco se dializó contra ácido acético 5mM por 24 horas a 4°C, lo que llevó a aumentar sus volúmenes y fue necesario hacer una corrección de la concentración volviendo a cuantificar el contenido de hidroxiprolina tanto en Fibroquel^{MR} como en la colágena, esto con el objeto de determinar sus concentraciones. El polímero no presentó ningún problema ya que es fácilmente soluble en soluciones acuosas y la variación que pudiera haber presentado se amortiguó con el medio de cultivo.

En cuanto al hecho de emplear en los experimentos, tanto para la colágena como para la polivinilpirrolidona, su concentración relativa en Fibroquel^{MR}, se debió a que se deseaba saber si era el fármaco el que tenía el efecto o si éste se debía a alguno de sus componentes, lo cual podría llevar a variaciones en los resultados si se utilizaba la concentración neta de la proteína o del polímero. Uno de los primeros indicios que hizo pensar en que el Fibroquel^{MR} tendría un comportamiento un tanto diferente de sus componentes o de la simple mezcla de ellos sin irradiar, fue que algunas de sus propiedades fisicoquímicas eran diferentes de las mostradas por la colágena, como su fracción principal, aproximadamente del 80%, ya que si bien el Fibroquel^{MR} también puede precipitarse del vehículo por la adición de sales, no forma un gel cuando se diluye en el medio de cultivo a pH neutro a 37°C como sucede con la colágena. Otro efecto interesante es el hecho de que los cultivos tenían una mejor morfología en el medio que contenía al fármaco y en los que contenían al polímero, comparados con el medio sin suero; la morfología de las células en los cultivos tratados con la colágena era diferente y correspondió a lo reportado en la literatura (Lambert C.A., et al., 1992; Tomasek J.J., et al., 1982).

VI. RESULTADOS

Incorporación de timidina [^3H] en cultivos de fibroblastos y macrófagos. Para conocer la cantidad de timidina incorporada por los cultivos de fibroblastos, éstos se incubaron por 18 horas en presencia del nucleósido. La cuantificación de la radiactividad incorporada no presentó diferencias significativas para la incorporación de timidina [^3H], excepto por un aumento aproximado del 30% en los cultivos tratados con PVP al 2%, mientras que al 10% el polímero mostró una ligera disminución en la incorporación de la timidina. Por otro lado, los demás compuestos probados se mantuvieron prácticamente igual que el control (cultivos de fibroblastos con D-MEM) (figura 1).

La incorporación de timidina en los cultivos de macrófagos fue diferente a la de los fibroblastos, ya que mientras el polímero no modificó la incorporación del nucleósido, la colágena al 2% tuvo una tendencia variable, pues presentó un incremento del 50% (semejante al de D-MEM con suero), sin embargo, para las demás concentraciones de la misma colágena, la incorporación disminuyó hasta en un 30%. Por su parte, ni el Fibroquel^{MR} ni el polímero mostraron cambios significativos en relación con el control sin suero, excepto por un ligero incremento para las concentraciones altas del tratamiento con el fármaco (Figura 2).

Incorporación de Prolina [^{14}C] en cultivos de fibroblastos y de fibroblastos tratados con medios condicionados de macrófagos. Para determinar la cantidad de colágena sintetizada por los fibroblastos, los cultivos se incubaron en presencia de prolina radiactiva durante 18 horas después de las cuales se homogenaron el sobrenadante y la monocapa de cada cultivo. De éstos se valoró la incorporación de

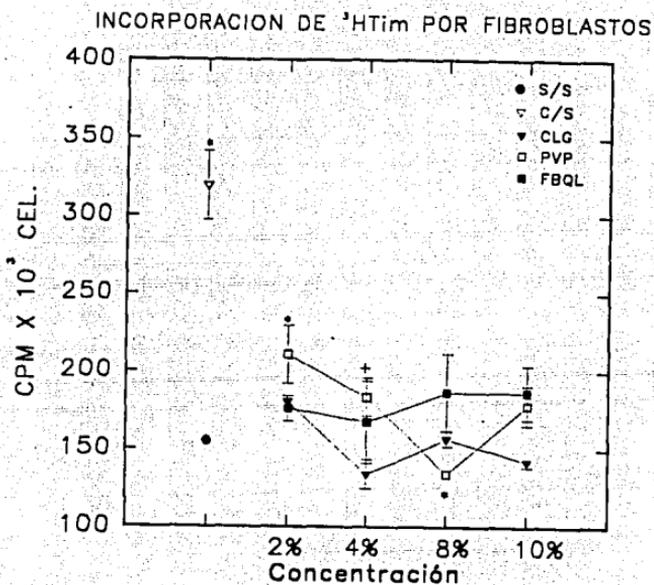


Figura 1. Incorporación de timidina [^3H] por fibroblastos tratados con D-MEM (S/S), D-MEM 10% SBF (C/S), Fibroquel^{MR} (Fbql), colágena (Clg) o polivinilpirrolidona (PVP). Los datos representan los promedios de los triplicados \pm el error estándar, con significancia estadística en $P < 0.05$ (*) y $P < 0.1$ (+) con respecto al control sin suero (D-MEM).

INCORPORACION DE ^3H Tim POR MACROFAGOS

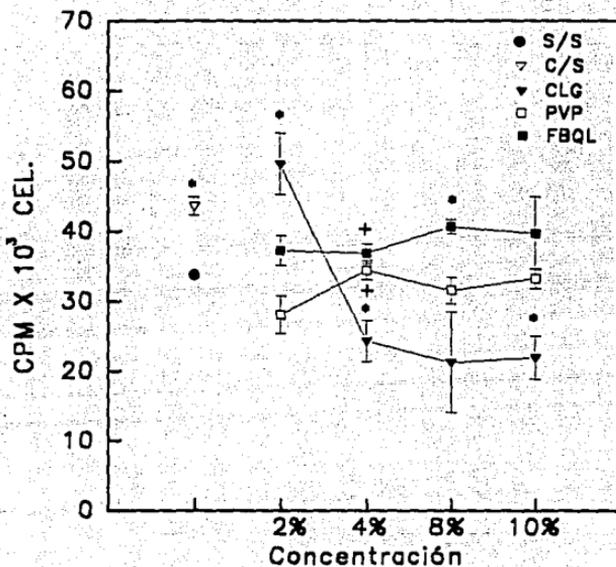


Figura 2. Incorporación de timidina [^3H] por macrófagos tratados con D-MEM (S/S), D-MEM 10% SBF (C/S), Fibroquel^{MR} (Fbql), colágena (Clg) o polivinilpirrolidona (PVP). Los datos representan los promedios de los triplicados \pm el error estándar, con significancia estadística en $P < 0.05$ (*) y $P < 0.1$ (+) con respecto al control sin suero (D-MEM).

Prolina [^{14}C] en la fracción colagénica, proteínas degradadas por colagenasa, y en la fracción no colagénica, proteínas no degradadas por colagenasa. Dado que el contenido de prolina e hidroxiprolina en las proteínas colagénicas es aproximadamente del 22%, y en las no colagénicas es del 4 % solamente, esto puede correlacionarse mediante la fórmula de Dieggelmann y Peterkofsky para calcular el porcentaje relativo de la colágena sintetizada por los fibroblastos (Dieggelmann R.F. y Peterkofsky B., 1972). Con base en estos cálculos, se graficaron los contenidos relativos de la colágena en los cultivos de los fibroblastos tratados con los compuestos de prueba y los resultados mostraron un incremento en la síntesis de la proteína hasta del 150% a bajas concentraciones de Fibroquel^{MR} (2%), mientras que a 8 y 10% los niveles fueron prácticamente iguales al control sin suero. El polímero por su parte, mostró también un incremento en la estimulación de la síntesis de la colágena pero éste fue aproximadamente del 80% a baja concentración, para alcanzar el mismo nivel que el control sin suero en las concentraciones más altas. Finalmente, la colágena adicionada a los cultivos, presentó una disminución mínima en las concentraciones más bajas, 25% para el valor estadísticamente significativo, (figura 3) que corresponde con los datos reportados previamente en la literatura para fibroblastos humanos (Lambert C.A., et al., 1992, Eckes B., et al., 1993).

En cuanto a la síntesis de la colágena en cultivos de fibroblastos tratados con medios condicionados de macrófagos, si bien ésta se presentó en menor proporción que los cultivos tratados directamente con las sustancias de prueba, las tendencias se mantuvieron; aunque los valores para los medios condicionados de macrófagos tratados con colágena y PVP no fueron estadísticamente significativos, mientras que el Fibroquel^{MR} registró la mayor síntesis comparado con el control sin suero, e incluso con los otros compuestos de prueba (figura 4).

SINTESIS DE COLAGENA POR FIBROBLASTOS

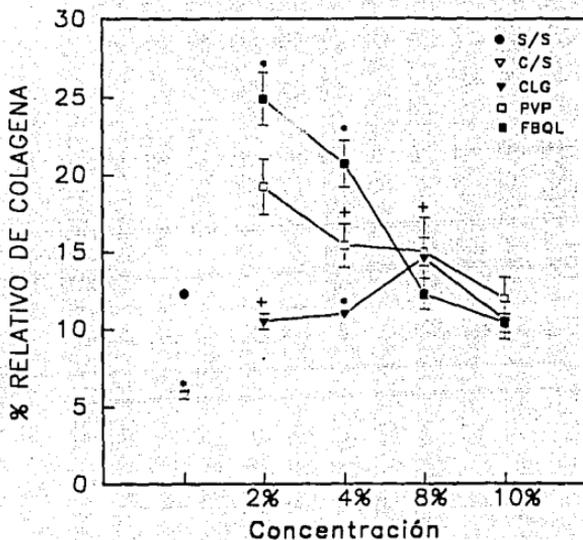


Figura 3. Contenido relativo de colágena (%) en homogenados de monocapa (MC) y sobrenadante (SN) de cultivos de fibroblastos tratados con D-MEM (S/S), D-MEM 10% SBF (C/S), Fibroquel^{MR} (Fbq), colágena (Clg) o polivinilpirrolidona (PVP). Los datos representan los promedios de los triplicados \pm el error estándar, con significancia estadística en $P < 0.05$ (*) y $P < 0.1$ (+) con respecto al control sin suero (D-MEM).

SINTESIS DE COLAGENA POR FIBROBLASTOS
TRATADOS CON MEDIOS CONDICIONADOS DE M ϕ

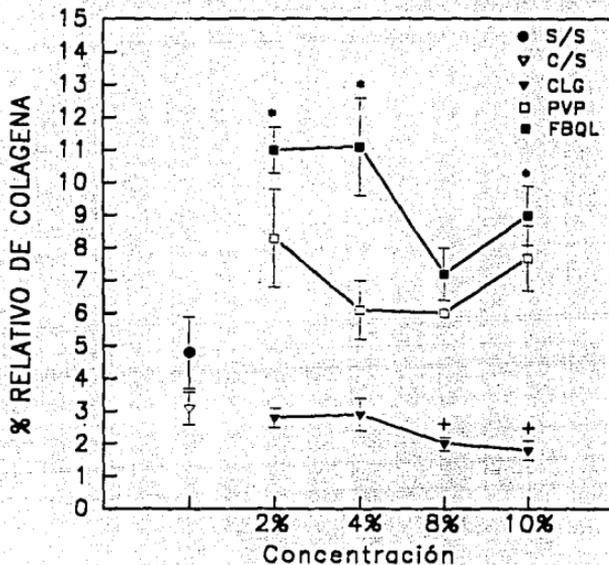


Figura 4. Contenido relativo de colágena (%) en homogenados de MC y SN de cultivos de fibroblastos tratados con los medios condicionados de macrófagos (M ϕ) previamente expuestos a D-MEM (S/S), D-MEM 10% SBF (C/S), Fibroquel^{MR} (Fbql), colágena (Clg) o polivinilpirrolidona (PVP). Los datos representan los promedios de los triplicados \pm el error estándar, con significancia estadística en $P < 0.05$ (*) y $P < 0.1$ (+) con respecto al control sin suero (D-MEM).

Actividad colagenolítica de fibroblastos. La actividad de colagenasa se evaluó con la degradación del sustrato radiactivo por una mezcla del homogenado de monocapa y sobrenadante de los cultivos en presencia de colágena, PVP y Fibroquel^{MR}, donde los cultivos de fibroblastos tratados con colágena, en todas las concentraciones probadas manifestaron una actividad colagenolítica mayor, este incremento fue de hasta el 125% con respecto al control sin suero. Por otro lado, el polímero no tuvo un efecto significativo excepto en las concentraciones del 8 y 10% donde la actividad disminuyó aproximadamente en un 50%, mientras que la del Fibroquel^{MR} fue aún menor, aproximadamente del 30%, a las mismas concentraciones (figura 5).

Con respecto a la actividad de colagenasa de los fibroblastos tratados con los medios condicionados de los macrófagos, previamente expuestos a los componentes de prueba, se encontró que a las concentraciones más altas tanto de la colágena como del Fibroquel^{MR}, la respuesta degradativa disminuyó con respecto al control (D-MEM), 60 y 80% respectivamente. En cuanto al polímero, no hubo cambios significativos. Cabe señalar que la proporción de la actividad colagenolítica en general fue mayor en los medios condicionados que con el tratamiento directo, excepto para D-MEM con suero y colágena (figura 6).

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA DE FIBROBLASTOS

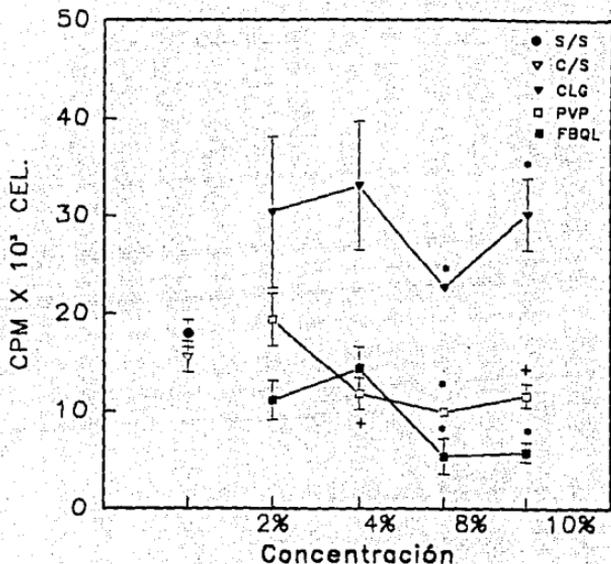


Figura 5. Actividad colagenolítica en homogenados de MC y SN de fibroblastos tratados con D-MEM (S/S), D-MEM 10% SBF (C/S), Fibroquel^{MR} (Fbql), colágena (Clg) o polivinilpirrolidona (PVP). Los datos representan los promedios de los triplicados \pm el error estándar, con significancia estadística en $P < 0.05$ (*) y $P < 0.1$ (+) con respecto al control sin suero (D-MEM).

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA DE FIBROBLASTOS
TRATADOS CON MEDIOS CONDICIONADOS DE M ϕ

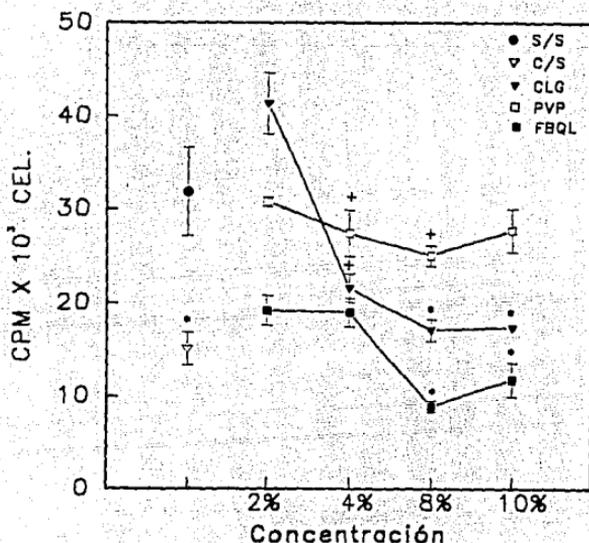


Figura 6. Actividad colagenolítica en homogenados de MC y SN de fibroblastos tratados con los medios condicionados de macrófagos (M ϕ) previamente expuestos a D-MEM (S/S), D-MEM 10% SBF (C/S), Fibroquel^{MR} (Fbql), colágena (Cig) o polivinilpirrolidona (PVP). Los datos representan los promedios de los triplicados \pm el error estándar, con significancia estadística en $P < 0.05$ (*) y $P < 0.1$ (+) con respecto al control sin suero (D-MEM).

Actividad colagenolítica de macrófagos. La degradación del sustrato radiactivo, por los homogenados de monocapa y sobrenadante de los cultivos de los macrófagos, fue menor en proporción a lo detectado en los fibroblastos; sin embargo, en este caso la mayor degradación se presentó en los cultivos tratados con Fibroquel^{MR} y solamente se incrementó en la máxima concentración probada de colágena, estos incrementos alcanzaron un máximo del 100% con respecto al control sin suero. Es notable que el menor aumento detectado, estadísticamente significativo, para el fármaco fue del 50% mientras que la colágena a concentraciones bajas, y el polímero en todas las concentraciones probadas, no tuvieron cambios evidentes (figura 7).

Para los cultivos de macrófagos tratados con los medios condicionados de los fibroblastos previamente expuestos a las sustancias de prueba, la actividad de colagenasa fue mayor en proporción al tratamiento directo. Sin embargo; en este caso la colágena no mostró diferencias significativas con respecto al control sin suero, pero tanto el Fibroquel^{MR} como la PVP presentaron una disminución de hasta el 65%, con actividad menor al control en todos los casos (figura 8).

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA DE M ϕ

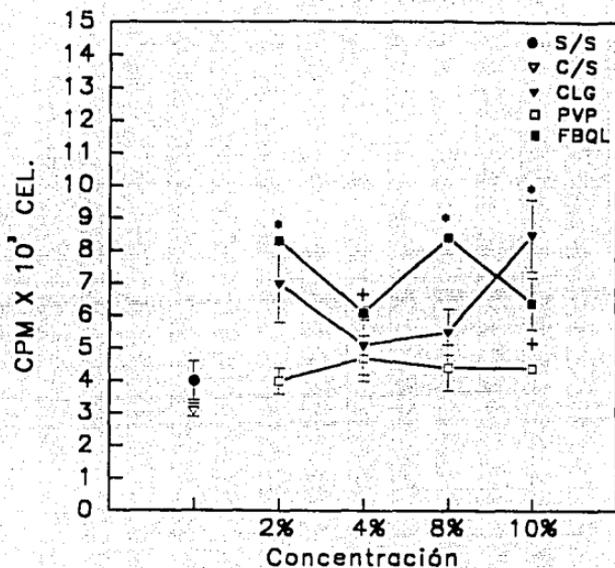


Figura 7. Actividad colagenolítica en homogenados de MC y SN de macrófagos (M ϕ) tratados con D-MEM (S/S), D-MEM 10% SBF (C/S), Fibroquel^{MR} (Fbql), colágena (Clg) o polivinilpirrolidona (PVP). Los datos representan los promedios de los triplicados \pm el error estándar, con significancia estadística en $P < 0.05$ (*) y $P < 0.1$ (+) con respecto al control sin suero (D-MEM).

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA DE M ϕ TRATADOS
CON MEDIOS CONDICIONADOS DE FIBROBLASTOS

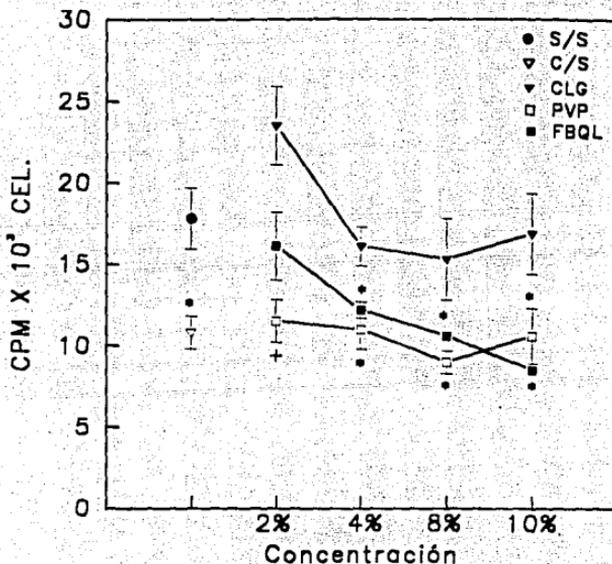


Figura 8. Actividad colagenolítica en homogenados de MC y SN de macrófagos tratados con los medios condicionados de fibroblastos previamente expuestos a D-MEM (S/S), D-MEM 10% SBF (C/S), Fibroquel^{MR} (Fbql), colágena (Cig) o polivinilpirrolidona (PVP). Los datos representan los promedios de los triplicados \pm el error estándar, con significancia estadística en $P < 0.05$ (*) y $P < 0.1$ (+) con respecto al control sin suero (D-MEM).

VII. DISCUSIÓN

Los efectos de todos los compuestos probados en la incorporación de timidina [^3H] en los cultivos de fibroblastos de piel de rata, tuvieron prácticamente el mismo comportamiento que el control sin suero, D-MEM y también estuvieron muy por debajo del control con suero, D-MEM 10% SBF; sin embargo, para los cultivos de macrófagos solamente la colágena mostró algunas diferencias con efectos diversos conforme se incrementaba su concentración y en este caso el comportamiento de los cultivos tratados con D-MEM 10% SBF, no distó mucho de las condiciones de prueba (figura 1). Es importante señalar que la actividad de incorporación en los cultivos de los macrófagos fue casi diez veces menor que la de los fibroblastos (figura 2). Esta prueba nos dio un indicio de que la proliferación de las células tratadas con los compuestos, son muy similares a la del control sin suero, por lo tanto, se puede decir que la polivinilpirrolidona, la colágena y el Fibroquel^{MR} tienen al menos la actividad basal correspondiente al control sin suero y que los efectos biosintéticos observados, se deben exclusivamente a la influencia de las sustancias sobre las células y no al efecto generado por un incremento o disminución en el número celular.

Para evaluar la síntesis de la colágena en los cultivos de fibroblastos, éstos se incubaron en presencia de prolina [^{14}C] en las condiciones de prueba y es importante señalar que, contrario a lo esperado, se observó un incremento de la síntesis de la colágena en los cultivos tratados con Fibroquel^{MR}, la cual disminuyó hasta niveles basales conforme se incrementaba la concentración de éste. En cuanto a los tratados con el polímero no mostraron efectos significativos con respecto al control sin suero. Por su parte, la colágena adicionada a los cultivos presentó una disminución en la síntesis de la misma aunque la proporción fue bastante baja (figura 3). El efecto de disminución

en la síntesis de colágena en cultivos de fibroblastos crecidos en geles o matrices de colágena, se encuentra reportado en la literatura (Lambert C.A., et al., 1992, Eckes B., et al., 1993) y la proporción es mucho mayor de lo encontrado por nosotros, sin embargo el hecho de sembrar a las células sobre una matriz de colágena o tenerlas embebidas en geles de colágena, les permite dirigir de inmediato sus receptores hacia la proteína (Klein C.E., et al., 1991) de una forma diferente al sistema que nosotros empleamos, es decir, una vez que la células habían alcanzado la confluencia ya habían producido su propia matriz y sus receptores debían estar prácticamente en la totalidad orientados a esa región, sin embargo al agregar la colágena de prueba y una vez que se formó el gel, algunos de esos receptores podrían haberse orientado hacia la parte superior de la monocapa o también podrían haberse dirigido hacia esa región los de síntesis nueva. Lo anterior puede considerarse dado que una vez que se formaba el gel de colágena sobre la monocapa de los fibroblastos, y después del periodo de incubación en presencia de ésta, era posible retirar el gel sin levantar a las células; por ello, sugerimos que la cantidad de receptores presentes en la región superior del cultivo debió ser "baja", lo cual se manifestó con un abatimiento moderado en la síntesis de la proteína. Es notable el hecho de que los cultivos tratados con D-MEM 10% SBF presentaron una síntesis menor al 50% de la que se observó para el control mínimo, D-MEM.

Por otro lado, la síntesis de la colágena de fibroblastos tratados con los medios condicionados de macrófagos previamente expuestos a colágena, polivinilpirrolidona o Fibroquel^{MR}, presentaron una tendencia similar a los fibroblastos tratados directamente con los compuestos de prueba, sin embargo, la actividad fue menor en todos los casos. Una vez más el polímero se comportó inerte y la colágena tuvo una actividad muy similar a la del control, mientras que el Fibroquel^{MR} volvió a tener la mayor síntesis

(figura 4). Aún cuando la actividad de síntesis fue menor en todos los casos, se pensó que el incremento para el fármaco, en relación con el control sin suero, podía deberse a la presencia de algún o algunos factores liberados por los macrófagos (Noel A., et al., 1992), posiblemente TGF- β , IL-1, PDGF, etc (Kovaks E.J., 1991).

Al evaluar la actividad colagenolítica producida por los fibroblastos (figura 5) y por los fibroblastos tratados con los medios condicionados de los macrófagos (figura 6), el Fibroquel^{MR} presentó una disminución significativa con respecto al control en ambos tratamientos, mientras que con el polímero fue moderada. En el caso del tratamiento con la colágena el efecto fue contrario, pues, en el directo, mostró un incremento importante en la actividad colagenolítica lo cual corresponde con lo reportado (Lambert C.A., et al., 1992; Seltzer J.L., et al., 1994) y en el de los medios condicionados disminuyó aunque en menor proporción que el Fibroquel^{MR}.

Finalmente, los efectos en la actividad colagenolítica producida por los macrófagos fueron diferentes de lo descrito anteriormente (figura 7), excepto para el polímero, ya que una vez más no participó en la modificación de esta actividad. Por otro lado la colágena sólo mostró efecto a la concentración más alta probada, el 10%, mientras que el Fibroquel^{MR} presentó un efecto máximo prácticamente en todas las concentraciones, este incremento fue aproximadamente del doble del obtenido para el control sin suero. En cuanto a la actividad degradativa de los macrófagos, tratados con los medios condicionados de los fibroblastos, la adición de colágena no presentó ninguna diferencia con respecto al control sin suero, mientras que el Fibroquel^{MR} y la polivinilpirrolidona disminuyeron la actividad colagenolítica hasta la mitad (figura 8), si bien la disminución en el fármaco fue paulatina, el polímero la mantuvo abajo en todas las concentraciones; este caso es el único donde se podría atribuir la actividad a uno de los componentes del Fibroquel^{MR}.

Los resultados presentados pueden ayudar a explicar lo que sucede en el proceso de reparación normal de heridas quirúrgicas en ratas tratadas con el Fibroquel^{MR}, ya que las observaciones realizadas a con respecto al tiempo de evolución de las lesiones, muestran que, durante los primeros cinco días el tejido de granulación se incrementa en comparación con las heridas sin tratamiento y que en el periodo siguiente (7 a 14 días) la zona de la lesión presenta, con la tinción tricrómica de Massón, fibras de colágena color azul más tenue; esta disminución del colorante es específica de la zona, ya que en los alrededores el tono es más intenso; lo cual posiblemente se deba a la presencia de colágena recién sintetizada, dado que la cantidad de entrecruzamientos es menor y posiblemente también a una presencia mayor de la colágena tipo III, la cual es un componente importante de los tejidos en reparación y cuyo diámetro de fibra es menor que el de la tipo I, lo que llevaría a captar una menor cantidad del colorante. Posteriormente, a los 21 días la arquitectura de la dermis en la zona de la lesión es mucho más parecida a la piel normal ya que el orden reticular de las fibras de colágena es más claro que para las heridas sin tratamiento en donde las fibras de la proteína se observan paralelas a la epidermis. Cabe señalar que en las heridas tratadas con el Fibroquel^{MR} se presentan más anexos cutáneos que en las controles (Krötzsch-Gómez F.E., et al, 1993). Con base en los anterior y al considerar los resultados obtenidos, sugerimos que los macrófagos pueden ser estimulados por el Fibroquel^{MR} para producir más enzimas colagenolíticas de lo habitual, y dado que los macrófagos son uno de los tipos celulares más abundantes del tejido de granulación, llevaría a una degradación mayor del tejido local; simultáneamente los fibroblastos participarían con una producción mayor de colágena por el estímulo con el fármaco, como se vio *in vitro*, lo que conlleva a una remodelación más intensa de la zona dañada, que tendría en principio una matriz menos densa a través de la cual la migración de células inflamatorias, de reparación e

indiferenciadas se facilitaría, lo cual organizaría a la dermis de una manera similar a lo normal y justifica la presencia de los anexos cutáneos, incluso en el sitio de la lesión como ya se mencionó.

VIII. CONCLUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos sugerimos que la actividad del Fibroquel^{MR} sobre la incorporación de timidina y el metabolismo de la colágena, síntesis y degradación, es diferente a la presentada por sus componentes por separado, colágena tipo I y polivinilpirrolidona, en cultivos de fibroblastos y macrófagos de rata. Lo que deja de manifiesto que el Fibroquel^{MR} se comporta como una entidad diferente a nivel fisicoquímico y bioquímico. Así mismo, sugerimos que el fármaco pueda modificar la expresión de citocinas que participen en el metabolismo de la colágena.

En cuanto a la actividad fibrolítica reportada (Díaz de León H. L., et al., 1994 y datos no publicados de nuestro grupo) no es del todo justificable por los resultados obtenidos en el modelo murino, lo cual hace necesario continuar con la búsqueda del mecanismo de acción del Fibroquel^{MR} en un modelo humano en donde la frecuencia de fibrosis dérmicas es relativamente alta.

IX. LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
APMA	Ácido fenil, metil-mercúrico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
[¹⁴ C]	Carbono 14.
°C	Grados centígrados.
Clg	Colágena tipo I.
Cpm	Cuentas por minuto.
C/S	D-MEM 10% de suero bovino fetal.
D-MEM	Medio de Dulbecco-Eagle Modificado.
CaCl ₂	Cloruro de calcio.
CO ₂	Dióxido de carbono.
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
EtOH	Alcohol etílico.
ÉterOEt	Éter etílico.
Fbql	Fibroquel
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico.
x g	tantas veces la gravedad.
GAG	Glucosaminoglicanos.
[³ H]	Tritio.
IL-1	Interleucina 1.
IL-6	Interleucina 6.
IL-10	Interleucina 10.
IFN	Interferón.
MC	Monocapa.
Mφ	Macrófagos.
MEC	Matriz extracelular.
MeOH	Alcohol metílico.
μCi	Microcuries.
μl	Microlitros.
NEM	N-etilmaleimida.
PBS	Solución salina de fosfatos.
PDC	Proteínas degradadas por colagenasa.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
PNDC	Proteínas no degradadas por colagenasa.
PVP	Polvivinilpirrolidona.
SBF	Suero de bovino fetal.
SN	Sobrenadantes.
S/S	D-MEM sin suero.
TA	Temperatura ambiente.
TCA	Ácido tricloroacético.
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β.

X. REFERENCIAS

- Barr R.M., Symonds P.H., Akpan A.S., y Greaves M. W. Culture of human dermal fibroblasts in collagen gels: modulation of interleukin 1-induced prostaglandin E_2 synthesis by an extracellular matrix. *Experimental Cell Research*, 198: 321-327, 1992.
- Berman B. y Duncan M.R. Pentoxifiline inhibits the proliferation of human fibroblasts derived from keloid, scleroderma morphoea skin and their production of collagen, glycosaminoglycans and fibronectin. *British Journal of Dermatology*, 123: 339-346, 1990.
- Charles G.G. *Advances in biomedical polymers*. Plenum Press: 21-29, U.S.A., 1987.
- Chojkier M., Peterkofsky B., y Bateman J. A new method for determining the extent of proline hydroxylation by measuring changes in the ratio of $4\text{-}^3\text{H}:^{14}\text{C}$ Proline in collagenase digests. *Analytical Biochemistry*, 108: 385-393, 1980.
- Colige A.C., Lambert C.A., Nusgens B.V. y Lapière C.M. Effect of cell-cell and cell-matrix interactions on the response of fibroblasts to epidermal growth factor *in vitro*. *Biochemical Journal*, 285: 215-221, 1992.
- Darzi M.A. y Chowdri N.A. Evaluation of various methods of treating keloids and hypertrophic scars, a 10 year follow up study. *British Journal of Plastic Surgery*, 45, No. 5: 374-379, 1992.
- Desmoulière A., Redard M., Darby I y Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *American Journal of Pathology* 146, No. 1: 56-66, 1995.
- Díaz de León H.L., Kröttsch-Gómez F.E., Guerrero-Padilla E., Cervantes-Viramontes R. y Reyes-Marquez R. A novel approach for the treatment of tissular fibrosis. *Matrix Biology*, 14, No. 5: 401 (abstr.), 1994.

- Dieggelmann R.F. y Peterkofsky B. Inhibition of collagen secretion from bone and cultured fibroblasts by microtubular disruptive drugs. *Proceedings of Natural Acadademy of Sciences, USA*, 69, No. 4: 892-896, 1972.
- Dieggelmann R.F., Graham M.F. y Bryson G.R. An *in vitro* microassay to quantitate collagen synthesis y its utility for analyzing the effects of defined inflammatory mediators. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 580: 514-517, 1990.
- Eckes B., Hunzelmann N., Ziegler-Heitbrock L. H.-W., Urbanski A., Luger T., Krieg T. y Mauch C. Interleukin-6 expression by fibroblasts grown in three-dimensional gel cultures. *Federation of European Biochemical Societies*, 298, No. 2,3: 229-232, 1992.
- Eckes B., Mauch C., Hüppe G. y Krieg T. Downregulation of collagen synthesis in fibroblasts within three-dimensional collagen lattices involves trascriptional and posttranscriptional mechanisms. *Federation of European Biochemical Societies*, 318, No. 2, 129-133, 1993.
- Ehrlich H.P. y Bornstein P. Microtubules in transcellular movement of procollagen. *Nature New Biology*, 238: 257-260, 1972.
- Ford C.N. Role of injectable collagen in the treatment of glotic insufficiency: a study of 119 patients. *Annals of Otorrinolaringology*, 101, No. 3: 237-247, 1992.
- Gailit J. y Clark R.A.F. Wound repair in the context of extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology*, 6: 717-725, 1994.
- Hay E.D. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Plenum Press, U.S.A., 1991.
- Holbrook K.A. y Smith L.T. Morphology of connective tissue: Structure of the skin and tendon, en, *Connective Tissue and its Heritable Disorders*. Editado por Peter M. Royce y Beat Steinmann, Editorial Wiley-Liss, Inc. : 59, U.S.A, 1993.

- Isaji M., Aruga N., Naito J. y Miyata H. Inhibition by tranilast of collagen accumulation in hypersensitive granulomatous inflammation *in vivo* and of morphological changes and functions of fibroblasts *in vitro*. *Life Sciences, Sección Pharmacology letters*, 55, No. 15: 287-292, 1994.
- Joos U. y Voguel D. Mechanical properties of biomaterials. Collagen fleece as a biomaterial for mandibular defects: 515-518. John Wiley & S., Ltd., U.S.A., 1980.
- Joos U., Ochs G. y Ries P.E. Influence of collagenfleece on bone regeneration. *Biomaterials*, 1: 23-25, 1980.
- Kao J., Huey G., Kao R., y Stern R. Ascorbic acid stimulates production of glycosaminoglycans in cultured fibroblasts. *Experimental and Molecular Pathology*, 53: 1-10, 1990.
- Karam P. y Kiby A.G. Collagen injections. *International Journal of Dermatology*, 31, No. 7: 467-470, 1992.
- Klein C.E., Dressel D., Steinmayer T., Mauch C., Eckes B., Krieg T., Bankert R., y Weber L. Integrin $\alpha_2\beta_1$ is upregulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen I fibrils. *The Journal of Cell Biology*, 115, No. 5: 1427-1436, 1991.
- Koehnlein H.E. Effects of various hemostypic drugs in rats. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 50, No. 5, 1972.
- Kovacs E.J. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunology Today*, 12, No. 1: 17-23, 1991.
- Kovacs E. y DiPietro L.A. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB Journal*, 8: 854-861, 1994.

- Krötzsch-Gómez F.E., Guerrero-Padilla E. y Díaz de León H.L. Morphological studies on the effects of Fibroquel during wound of surgical wounds in rats. *The Journal of Cellular Biochemistry*, supplement 17E: 137, R 506. (abstr.) 1993.
- Lambert C.A., Soudant E.P., Nurgens B.V., y Lapière C.M. Pretranslational regulation of extracellular matrix macromolecules and collagenase expression in fibroblasts by mechanical forces. *Laboratory Investigation*, 66, No. 4: 444-451, 1992.
- Lawrence W.T. In search of the optimal treatment of keloids: report of a series a review of the literature. *Annals of Plastic Surgery*, 27, No. 2: 164-178, 1991.
- Miki Y., Narayanan A.S. y Page R.C. Mitogenic activity of cementum components to gingival fibroblasts. *Journal of Dental Research*, 66: 1399-1403, 1987.
- Murawaki Y., Yamada S., Koda M., y Hirayama C. Collagenase and collagenolytic cathepsin in normal and fibrotic rat liver. *Journal of Biochemistry*, 108: 241-244, 1990.
- Nathan C.F. Coordinate actions of growth factors in monocytes/macrophages* en *Peptide Growth Factors and Their Receptors II. Handbook of Experimental Pharmacology*, Volumen 95/II, Editores M.B. Sporn y A.B. Roberts, Springer-Verlag, Germany, 1990.
- Newman K.M., Malon A.M., Shin R.D., Scholes J.V., Ramey W.G., y Tilson M.D. Matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysm: characterization, purification, and their possible sources. *Connective Tissue Research*, 30: 265-276, 1994.
- Noel A., Munaut C., Nurgens B., Foidart J.M. y Lapière C.M. The stimulation of fibroblasts collagen synthesis by neoplastic cells is modulated by the extracellular matrix. *Matrix*, 12: 213-220, 1992.

- Olsen B., Guzmán I.A., Engel J., Condit C. y Aase S. Purification and characterization of a peptide from the carboxy terminal region of chick tendon procollagen type I. *Biochemistry*, 16 (13): 3030-3036, 1977.
- Paglia L., Wiestner M., Duchene M., Ouellette L., Hörlein D., Martin G. y Müller P. Effects of procollagen peptides on the translation of type II collagen messenger ribonucleic acid on collagen biosynthesis in chondrocytes. *Biochemistry*, 20: 3523-3527, 1981.
- Peterkofsky B. y Dieggelmann R. Use of a mixture of proteinase-free collagenase for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry*, 10, No. 6: 988-993, 1971.
- Postlethwaite A.E., Raghow R., Stricklin G.P., Poppleton H., Seyer J.M., y Kang A.H. Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 α and β . *The Journal of Cell Biology*, 106: 311-318, 1988.
- Quantin B., Murphy G. y Breathnach R. Pump-1 cDNA codes for a protein with characteristics similar to those of classical collagenase family members. *Biochemistry*, 28: 5327-5334, 1989.
- Raghow R., The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *The FASEB Journal*, 8: 823-831, 1994.
- Reitamo S., Remitz A., Tamai K. y Ulto J. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts. *Journal of Clinical Investigation*, 94: 2489-2492, 1994.

- Reponen P., Sahlberg C., Munaut C., Thesleff Y. y Tryggvason K. High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *The Journal of Cell Biology*. 124, No. 6:1091-1102, 1994.
- Richardson A. y Parsons J.T. Signal transduction through integrins: a central role for focal adhesion kinaes?. *BioEssays*. 17 (3): 229-236, 1995.
- Robinson B.V., Sullivan F.M., Borzeleca J.F. y Schwartz S.L. A critical review of the kinetics and toxicology of polyvinylpyrrolidone. Lewis Publishers, U.S.A., 1990.
- Roedel D. y Krieg T. Three-dimensional contact with type I collagen mediates tyrosine phosphorylation in primary human fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 211: 42-48, 1994.
- Schmitt-Gräff A., Desmoulière A. y Gabbiani G. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Archives*, 425: 3-24, 1994.
- Schor S.J., Cell proliferation and migration on collagen substrata *in vitro*. *Journal of Cell Science* 41: 159-175, 1980.
- Seltzer J.L., Lee A., Akers K.T., Sudbeck, Southon E.A., Wayner E.A., y Eisen A.Z. Activation of 72-kDa type IV collagenase/gelatinase by normal fibroblasts in collagen lattices is mediated by integrin receptors but is not related to lattice contraction. *Exeperimental Cell Research*, 213: 365-374, 1994.
- Shingu M., Nagai Y., Isayama T., Nobunaga M. y Nagai Y. The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. *Clinical of Experimental Immunology*, 94: 145-149, 1993.
- Shimizu Y., Miyamoto Y. y Teramatsu T. Studies on composites of collagen and a synthetic polymer. *Biomaterials and Medical Devices Art Organization*. 6 No. 4, 1978.

- Soderberg T., Hallimans G. y Bartholdson L. Treatment of keloids and hypertrophic scars with adhesive zinc tape. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, 16: 261, 1982.
- Tomasek J.J., Hay E.D., y Fujiwara K. Collagen: modulates cell shape and cytoskeleton of embryonic corneal and fibroma fibroblasts: distribution of actin, α -actinin, and myosin. *Developmental Biology*, 92: 107-122, 1982.