

03081

6
23



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

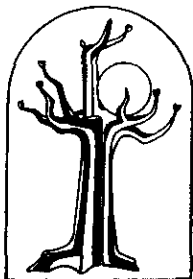
*ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA
COLÁGENA-POLIVINILPIRROLIDONA SOBRE LA EXPRESIÓN
IN VITRO DE ALGUNOS MEDIADORES SOLUBLES QUE
PARTICIPAN EN EL METABOLISMO DE LA COLÁGENA*

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

P R E S E N T A

FERNANDO EDGAR KRÖTZSCH GÓMEZ



BIOMEDICAS

México D.F., 1999

**TESIS CON
FALLA DE ORDEN**

27 4781



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.

PASINACION

DISCONTINUA.

JURADO ASIGNADO

Presidente:	<i>Dr. Jorge Alcoce Varela</i>
Secretario	<i>Dr. Rafael Saavedra Durán</i>
Vocal:	<i>Dr. Lino Díaz de León Hernández</i>
Vocal:	<i>Dr. Rolando Hernández Muñoz</i>
Vocal:	<i>Dr. Guillermo Alfaro Martínez</i>
Suplente:	<i>Dr. Alejandro García Carrancá</i>
Suplente:	<i>Dra. Irmgard Montfort Happel</i>

La razón es la existencia misma

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Tejido Conjuntivo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la dirección del Dr. Lino Díaz de León Hernández y con el apoyo de Áspid S.A. de C.V. y PADEP.

Los ensayos de cuantificación de TIMP-1 y síntesis de GAGs fueron realizados por la M. en IBB. Janette Furuzawa Carballeda y el Biólogo Saúl Cano Colín, respectivamente.

CONTENIDO

I. Resumen	4
II. Abstract	5
III. Introducción	6
La colágena	11
La fibronectina	14
La tenascina	15
Los glicosaminoglicanos y los proteoglicanos	17
Las metaloproteasas y sus inhibidores	22
IV. Antecedentes	27
V. Hipótesis	28
VI. Objetivo	28
VII. Material y Métodos	29
VIII. Resultados	33
Proliferación celular	33
Síntesis de colágena	34
Actividad colagenolítica	35
Inhibidor tisular de las metaloproteasas 1	36
Glicosaminoglicanos	37
Citocinas fibrogénicas	38
IX. Discusión	41
X. Conclusión	45
XI. Lista de abreviaturas	46
XII. Referencias	47
XIII. Anexo	

I. RESUMEN

La colágena-polivinilpirrolidona (colágena-pvp) es un biofármaco que ha mostrado efectividad en el tratamiento de fibrosis dérmicas, tales como la cicatrización hipertrófica (CtzH) y la escleroderma, ya que su administración local disminuye algunas citocinas proinflamatorias y fibrogénicas, como IL-1 β , TNF- α , PDGF; así como algunas moléculas de adhesión celular, como VCAM-1 y ELAM-1. Por ello, decidimos explorar *in vitro*, el efecto de colágena-pvp sobre el metabolismo de colágena de fibroblastos. Se aislaron fibroblastos de piel humana normal, CtzH y CtzH previamente tratada *in vivo* con colágena-pvp y resuelta bajo criterios clínicos. En estos cultivos se evaluó en presencia de colágena tipo I o colágena-pvp la proliferación, actividad colagenolítica, síntesis de colágena y glicosaminoglicanos (GAGs), inhibidor tisular de las metaloproteasas (TIMP-1), IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1 y PDGF. Los resultados mostraron que no hubo cambios estadísticamente significativos en cuanto a la síntesis de colágena y actividad colagenolítica entre las diferentes líneas de fibroblastos. Mientras que en la proliferación, síntesis de GAGs y expresión de TIMP-1, TGF- β 1 y PDGF sí existieron diferencias entre los fibroblastos de CtzH y los normales o de CtzH tratada. Por otro lado, se observaron algunas diferencias cuando se llevó a cabo el tratamiento *in vitro* con colágena o colágena-pvp en las diferentes líneas celulares, donde en todos los cultivos tratados con colágena-pvp disminuyó la síntesis de colágena y la actividad colagenolítica; en cambio, se incrementó su síntesis de GAGs. De manera interesante, la expresión del TIMP-1 y PDGF disminuyó solamente en los fibroblastos derivados de CtzH. Sin embargo, los fibroblastos de CtzH tratada presentaron un aumento en la proliferación y los niveles de TIMP-1 fueron similares a los observados en los cultivos de piel normal.

En conclusión, el tratamiento *in vitro* con colágena-pvp puede modificar el metabolismo de los fibroblastos de forma diferente a la colágena y esas diferencias metabólicas pueden estar relacionadas con distintos receptores de membrana; por ejemplo, las integrinas.

II. ABSTRACT

Collagen-polyvinylpyrrolidone (collagen-pvp) is a biodrug that has shown effectiveness in the treatment of dermal fibrosis, such as hypertrophic scar (CtzH) and scleroderma, since its local administration diminished IL-1 β , TNF- α , PDGF; as well as adhesion molecules, VCAM-1 and ELAM-1. For this reason we were encouraged to explore collagen metabolism in fibroblasts treated *in vitro* with collagen-pvp. We isolated fibroblasts from human skin, CtzH and CtzH previously treated *in vivo* with collagen-pvp and clinically resolved. From the different cultures we evaluated, in the presence of type I collagen or collagen-pvp: proliferation, collagen and glycosaminoglycan (GAGs) synthesis, collagenolytic activity, TIMP-1, TGF- β 1 and PDGF. Data showed that there were not significant changes in relation to collagen synthesis and collagenolytic activity among the fibroblasts lines assessed. Meanwhile, differences in proliferation, GAGs synthesis and TIMP-1, TGF- β 1 and PDGF expression were observed among fibroblasts from CtzH and normal or treated CtzH. On the other hand, *in vitro* treatment with collagen or collagen-pvp to the different cellular lines, induced metabolic differences, where all the cultures treated with collagen-pvp diminished their collagen synthesis and collagenolytic activity, but increased GAGs production. Interestingly TIMP-1 and PDGF decreased only in CtzH fibroblasts. However, fibroblasts from treated CtzH showed augmented proliferation and TIMP-1 levels similar to those observed in normal ones. In conclusion, *in vitro* treatment with collagen-pvp can modify fibroblasts metabolism, in a different fashion to collagen, where these metabolic differences may be related to distinct membrane receptors (i.e. integrins).

III. INTRODUCCIÓN

La cicatrización en los mamíferos es un proceso en cascada que implica una serie de fases, simultáneas en su mayoría, pero con predominio cronológico de algunos de sus componentes, lo que lleva con una eficiencia extrema a la regeneración del sitio de la lesión en los fetos (Adzick y Lorenz, 1994), con eficiencia moderada a la reparación en *neonatos* y adultos, y finalmente con muchas deficiencias y secuelas en individuos seniles (Ashcroft, 1995). Desde siempre y quizá con mayor importancia en la actualidad, se ha considerado a las heridas como un problema de salud pública que requiere atención, pues si un daño en los tejidos es tratado desde el inicio, la calidad de la reparación generalmente es mejor que si se atiende posteriormente. Esto se debe a la actividad de las células que infiltran el área, así como al recambio de los componentes de la matriz extracelular (MEC), es decir, su síntesis y degradación; sin olvidar que la regulación metabólica se lleva a cabo por una variedad de moléculas solubles tales como las hormonas (Schiele et al., 1997), péptidos derivados de la misma MEC en el sitio del daño y citocinas (Postlethwaite et al., 1988, Gailit y Clark, 1994), quienes dirigen por medio de mecanismos muy finos, la migración, la división y la diferenciación celular, además del recambio de la MEC.

El proceso de cicatrización en los mamíferos se puede dividir en tres fases como se esquematiza en la Figura 1.

En la *fase temprana* ocurre la mayor variedad de fenómenos, ya que en el momento del daño, y si éste implica la ruptura de vasos sanguíneos, concomitantemente se deriva la extravasación de los componentes de la sangre, que al entrar en contacto con la pared arterial o venosa disparan el proceso de coagulación. Este proceso resulta de la activación del factor de Hageman superficial, el factor procoagulante tisular liberado por las células dañadas y los factores de coagulación de las superficies membranales, así como de los fosfolípidos producidos por las células endoteliales y las plaquetas. Donde el paso crítico en todos los casos es la disponibilidad de una superficie que favorezca la adsorción y permita la activación de proenzimas específicas de la coagulación, ya que éstas se encuentran inmersas en el plasma, cuya composición incluye una gran variedad de inhibidores enzimáticos, de tal forma que cuando las proenzimas quedan adsorbidas en el espacio extravascular, prácticamente quedan libres de los inhibidores lo que permite su activación, que en cuestión de minutos se amplifica como una respuesta hemostática.

La coagulación finaliza cuando los estímulos activadores se disipan y se ha formado un tapón de MEC transitoria y plaquetas. Esto se debe a la presencia de la prostaciclina y antitrombina III que inhiben la agregación plaquetaria. Asimismo, se presenta la lisis del coágulo cuando se libera el activador del plasminógeno que convierte el plasminógeno en plasmina, y a su vez es ayudado por la degradación de los factores de coagulación V y VIII a través de la proteína C. Esta lisis también es controlada rigurosamente ya que las enzimas proteolíticas principales y los activadores del plasminógeno y la plasmina están unidos con el coágulo de fibrina y las superficies celulares, por lo que no pueden ser alcanzados por los inhibidores de proteasas de la fase fluida o plasma; como son el inhibidor del activador del plasminógeno y la α_2 -antiplasmina. Sin embargo, esto podría llevar a una lisis exagerada del entorno lesionado, pues

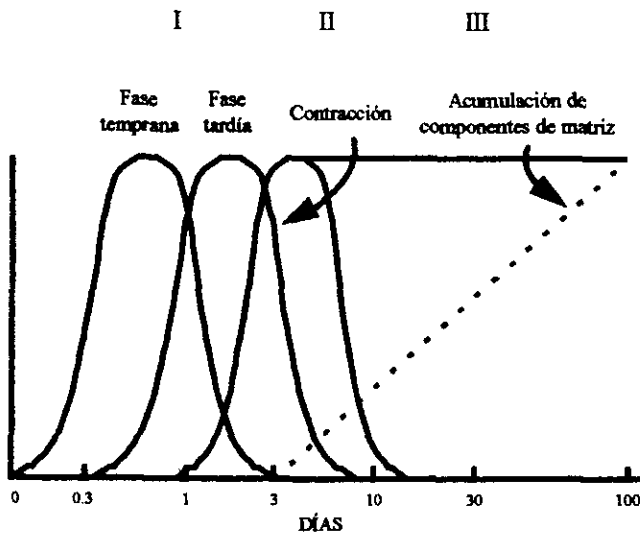


Figura 1. Fases de la cicatrización en humanos.

tanto el activador del plasminógeno como la plasmina tienen capacidad de degradar gran parte de los componentes de la MEC. Esto no ocurre gracias a la presencia fisiológica de un inhibidor específico del activador del plasminógeno el cual se encuentra unido a la MEC, lo que limita la actividad de estas enzimas (Clark, 1995).

Por otro lado, el mismo coágulo hemostático participa como una matriz provisional, la cual permite el reclutamiento de células en el sitio dañado, donde particularmente la fibrina y la fibronectina juegan un papel muy importante, ya que permiten el influjo de monocitos y fibroblastos a través de receptores específicos de membrana conocidos como integrinas (Chapman y Haskard, 1995).

La *fase tardía* también comprende, junto con la temprana, el proceso inflamatorio, pues éste lleva un determinado tiempo para proveer los componentes solubles de matriz y celulares necesarios que favorecen la reparación del daño, donde la activación de moléculas como el factor de Hageman, generan fragmentos proteicos, como la bradiquinina y agentes vasoactivos potentes; además de iniciar las cascadas clásica y alterna del complemento, generando las anafilatoxinas C3a y C5a. Estas últimas incrementan directamente la permeabilidad vascular y atraen neutrófilos y monocitos a los sitios dañados. Simultáneamente, estas sustancias estimulan la liberación de mediadores vasoactivos, como la histamina y los leucotrienos C₄ y D₄, que se encuentran en los gránulos de los mastocitos, así como la liberación de derivados oxidantes biológicamente activos de los gránulos de los neutrófilos y macrófagos (Clark, 1995). Otros componentes son las citocinas, que forman un grupo heterogéneo de moléculas de naturaleza glicoproteica, de bajo peso molecular (7 a 30 kD), que actúan en concentraciones picomolares de forma autócrina, parácrina o endócrina. Éstas son capaces de regular el crecimiento, la morfología, la migración y el metabolismo celular, por lo que desempeñan un papel esencial en los procesos de regulación de la respuesta inmune, la inflamación (Alvaro-

Gracia, 1992) y en el metabolismo de la matriz (Raghow, 1994).

La *reepitelización* de las heridas empieza una cuantas horas después de la lesión (Fase tardía de la figura 1), donde las células de las estructuras epiteliales residuales se mueven rápidamente a través del sitio dañado. En la piel, los queratinocitos epidérmicos estratificados o los del folículo piloso, se “desplazan uno sobre el otro” (Clark, 1995), es decir, forman grupos de células que a su vez se dividen, primero horizontalmente con respecto al plano de la piel, y luego se estratifican perpendicularmente. Este proceso requiere de la disolución de desmosomas, que son estructuras que interconectan a los queratinocitos y que proveen la fuerza de tensión en el epitelio, además de la pérdida temporal de la unión dermo-epidérmica, a través de la disolución de hemidesmosomas que unen a la epidermis con la membrana basal. Otra característica de la epidermis en reparación es la carencia de queratinas clásicas del epitelio estratificado, así como la deficiencia de filagrina, cuya participación como cementante es crucial. En esta fase de la reparación, solamente se encuentran presentes las queratinas producidas por los queratinocitos de la capa basal. Cabe señalar que pese a la característica no diferenciada de los queratinocitos migrantes, éstos sí producen involucrina, un componente de membrana celular presente en los queratinocitos diferenciados, así como la transglutaminasa, una enzima que participa en el entrecruzamiento de las proteínas de la membrana celular (Clark, 1995). Lo anterior nos lleva a considerar que la epidermis de transición tiene algunas características de una epidermis clásica pero sin la maduración total, debido a la necesidad de dividirse y migrar en un sistema tridimensional que permita primero, volver a generar una barrera y después, equilibrar el balance proteico-hidro-lipídico necesario para generar la homeostasis del área.

Pero, ¿qué es lo que lleva a la migración de los queratinocitos durante la reepitelización? Aunque no es completamente claro, la respuesta se encuentra en el entorno dañado, tal vez la ausencia de células vecinas en los márgenes de

la herida estimule la migración y la proliferación. Otra posibilidad es la liberación local de citocinas que estimulen dicho proceso, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante α (TGF- α), el factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HB-EGF), así como la familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF); y tal vez otros factores también derivados de los macrófagos o células del parénquima dérmico que actúan de manera parácrina. Cabe señalar, que los mismos queratinocitos tienen la capacidad de producir al TGF- α , así como al TGF- β , lo que hace posible considerar su participación de forma autócrina y parácrina, pues en un modelo de cicatrización *in vitro* a partir de explantes de piel humana, se encontró que el TGF- β 1 se incrementa en los bordes del epitelio dañado y disminuye una vez que se alcanza la confluencia y comienza la estratificación. Lo anterior se relaciona con la capacidad que tiene el TGF- β 1 para inducir la síntesis de integrinas que permitan la locomoción de los queratinocitos y la inhibición en su proliferación. Una vez que los queratinocitos han alcanzado la confluencia en la zona dañada, se presenta un incremento en la producción del TGF- α que estimula la proliferación de esta estirpe celular, lo que permite la estratificación. Lo anterior nos señala que al menos en parte, el proceso de reepitelización se manifiesta de manera autócrina (Kratz y Compton, 1997).

Ahora bien, si el daño incluye a la membrana basal, las células epidérmicas migran sobre una matriz provisional que consta de colágena tipo V, fibrina, fibronectina, tenascina, vitronectina, osteonectina y trombospondina, además de colágena tipo I y III. Pero si la lesión no incluye la membrana basal, la fibronectina se infiltra por ésta, ya que tanto la fibrina como la fibronectina presentes en la matriz transitoria provienen inicialmente del plasma circulatorio. Sin embargo, sólo algunos días después, la fibronectina se produce localmente por los fibroblastos, macrófagos e incluso por los mismos queratinocitos migrantes. Así que la migración de los queratinocitos a través de esta

matriz provisional se debe por un lado, a su capacidad de expresar integrinas que no son producidas habitualmente por ellos, lo que no permite la migración celular a través del tejido seco o no viable (Clark, 1995) y por otro, gracias a su capacidad de secretar colagenasa (Ágren, 1998) y activador del plasminógeno, lo que favorece su migración a través de un entorno provisional viable (Clark, 1995). En las heridas normales y crónicas se ha encontrado colagenasa, estromelisin 1 y 2 y al activador del plasminógeno, donde la regulación de esas metaloproteasas se presenta a través de sus inhibidores tisulares (TIMP), entre otros (Curry et al., 1990). Inclusive se ha observado, que el TIMP-1 se expresa en la membrana basal de heridas normales, pero no en heridas crónicas, lo que nos permite considerar que la dificultad de reepitelizar en estas últimas es por la falta de control en la destrucción de los componentes de matriz necesarios para la migración de los queratinocitos (Vaalamo et al., 1996).

Una vez reepitelizado el sitio dañado, reaparecen la proteínas de la membrana basal en una secuencia muy ordenada desde el margen de la herida hasta el centro, donde las células adquieren su fenotipo normal y se encuentran perfectamente ancladas a su membrana basal a través de los hemidesmosomas y a la neodermis subyacente a través de las fibrillas de colágena tipo VII (Clark, 1995).

El *tejido de granulación* o estroma nuevo, comienza a formarse aproximadamente 4 días después del daño. El nombre se deriva de la apariencia granular al ser examinado visualmente, pues gran cantidad de vasos capilares de neoformación invaden la zona, y la población celular se encuentra constituida por 7% de células endoteliales, 18% como leucocitos, 11% como granulocitos y monocitos, 57% de fibroblastos y 7% de células T (Koschnick et al., 1998), todas ellas embebidas en un tejido conjuntivo laxo.

Para la inducción del tejido de granulación es necesaria la participación de citocinas proinflamatorias con actividades quimioatrayentes, mitogénicas y moduladoras del fenotipo entre otras. Dichas actividades

dependen no solo del tipo de citocinas, sino de su concentración, además de la presencia y afinidad de los receptores en el entorno cicatrizal, el nivel de actividad en la célula blanco y la MEC circundante. Cabe señalar que ya en el plasma sanguíneo varias de estas citocinas se encuentran presentes; sin embargo, las plaquetas activadas liberan cantidades importantes de ellas en el área dañada, que con la llegada de monocitos de sangre periférica y su diferenciación a macrófagos (Hart et al., 1998) establecen las condiciones para la síntesis continua de estos factores y su liberación. Además que las células del parénquima, tanto las dañadas como las activadas, pueden sintetizar y secretar citocinas (Clark, 1995), que junto con las ya presentes en la MEC normal (Kröttsch-Gómez et al., 1998) alcanzan niveles significativamente altos para activar, estimular y diferenciar a las diferentes células del tejido de granulación. De tal forma que los macrófagos, fibroblastos y vasos sanguíneos se dispersan en el área dañada a través de una matriz temporal, que además de proveer soporte, guiar y activar células, permite la difusión de factores solubles como citocinas, hormonas, fragmentos proteicos, etc. Los macrófagos y neutrófilos proveen una fuente continua de citocinas necesarias para estimular la fibroplasia y la angiogénesis (Mast y Schultz, 1996); es decir, los fibroblastos construyen una nueva MEC que favorece la infiltración celular y los capilares transportan el oxígeno y los nutrientes requeridos para mantener todo el metabolismo tisular. Así que en el tejido de granulación existe una reciprocidad dinámica entre los fibroblastos, las citocinas, la MEC y la neovascularización (Clark, 1995).

La fibroplasia (fase II de la figura 1) consta de los componentes del tejido de granulación que provienen de los fibroblastos, donde cada una de las macromoléculas de la MEC se clasifica de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas y fisiológicas. Así que existen proteínas fibrosas de dos tipos: las estructurales, principalmente como la colágena y la elastina, y las que participan en la adhesión como la misma colágena, la fibronectina, la laminina y la

tenascina; ambas clases se encuentran en variedad de tamaños e isoformas que se derivan de la expresión de diferentes genes y constituyen familias de proteínas.

Las variaciones en la composición, la concentración y la manera en cómo están organizadas estas macromoléculas dan lugar a una diversidad de formas, cada una adaptada a los requerimientos particulares de cada tejido. Así tenemos a las colágenas fibrilares del intersticio, que se componen por los tipos I y III principalmente, los cuales se asocian en forma de fibrillas junto con la colágena tipo V, la cual regula el diámetro de las fibras. La concentración alta de la colágena tipo I presente en la mayoría de los tejidos, contribuye a la gran fuerza de tensión y a la resistencia a la deformación. La colágena tipo VI, está organizada como filamentos finos que se intercalan con las fibrillas de colágena; y la distribución tan variada en que se presenta, sugiere un papel en la organización de otros componentes de la matriz (Holbrook y Smith, 1993).

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, la laminina promueve la unión de las células epiteliales a la lámina basal, mientras que la tenascina puede regular la adhesión, dependiendo del tipo de receptores que presente la célula en un momento dado. Las moléculas de glicosaminoglicanos (GAGs) y proteoglicanos, que son cadenas de GAGs asociadas con núcleos proteicos, en el tejido conjuntivo, forman una sustancia fundamental hidratada, tipo gel, en la cual se encuentran embebidas las proteínas fibrosas, de tal forma que este gel resiste las fuerzas compresivas en la matriz. También la fase acuosa del gel de polisacáridos permite la difusión rápida de los nutrimentos, metabolitos, hormonas y otros factores solubles entre la sangre y las células de los tejidos, a lo que se denomina hidrodinamia. Por ejemplo, los fibroblastos fetales producen matrices pericelulares de ácido hialurónico, y éstas son

significativamente más extensas que las producidas por fibroblastos post-natales, donde aparentemente la expresión del ácido hialurónico es una respuesta al factor estimulador de la migración (MSF) que no se observa en los cultivos de fibroblastos *neonatos* o adultos. Así que la mayor proporción del

carbohidrato en tejidos fetales, normales y de reparación, parece tener algún vínculo con la regeneración del tejido dañado, a diferencia de la reparación de menor calidad observada en los tejidos lesionados *neonatos* o adultos (Moriarty et al., 1996).

Tabla I

COMPONENTE DE LA MEC	CITOCINA	SÍNTESIS	CÉLULA BLANCO	ESPECIE
Colágena tipo I	TGF- β , PDGF, IL-1	↑	Fibroblastos, preadipocitos	Humano. Pollo.
Colágena tipo II	TGF- β	↑	Condrocitos	Pollo.
Colágena tipo III	TGF- β	↑	Fibroblastos	Humano.
Colágena tipo IV	IL-1	↑	Fibroblastos	Humano.
Colágena tipo VI [α 1(VI)]	IFN	↑	Fibroblastos	Humano.
Colágena tipo VI [α 3(VI)]	IFN	↓	Fibroblastos	Humano.
MMP	TGF- β , IL-1, IL-10, FGF, EGF	↑	Fibroblastos, adipocitos, queratinocitos, tumorales.	Humano.
MMP	IFN	↑	Macrófagos, tumorales	Humano.
MMP	IFN	-	Fibroblastos	Humano.
Colagenasa 72 kD	TNF- α	↓	Tumorales	Humano.
Colagenasa 92 kD	TNF- α	↑	Tumorales	Humano.
TIMP	EGF, TGF- β , IL-1, GRO α	↑	Fibroblastos, queratinocitos	Humano.
MMP y TIMP	IL-6	↑?	Fibroblastos	Humano.
Fibronectina	TGF- β , IL-1, EGF, TGF- α ,	↑	Fibroblastos, condrocitos, epiteliales, de la granulosa	Humano, pollo, rata y ratón, pollo.
Tenascina	TGF- β , IL-1, FGF, TNF- α , PDGF	↑	Fibroblastos, tumorales	Humano y pollo Humano
Proteoglicanos Biglicano Versicano Agregano	TGF- β	↑	Fibroblastos, condrocitos,	Humano, varios, bovino.
Decorina		↓	Fibroblastos	Humanos, varios.
Proteoglicanos	IL-1	↓	Fibroblastos, condrocitos	Humanos, bovinos.
Proteoglicanos	PDGF	↑	Condrocitos	Bovino.
GAGs	TGF- β	↑	Condrocitos	Bovino.
Hialuronato	EGF, FGF	↑	Fibroblastos	Humano.

Como se mencionó, las proteínas de la MEC son parte estructural del tejido conjuntivo, aunque también tienen un papel informacional para las células adyacentes (Linsenmayer, 1991); ya que se ha demostrado que los sustratos de

colágena y otras proteínas de la matriz, *in vitro*, tienen influencia en la morfología, la diferenciación de varios tipos celulares y la síntesis de macromoléculas características del fenotipo diferenciado. Lo anterior está, en parte,

a cargo de las células derivadas del mesénquima, pues son ellas las que se encargan en buena medida de la síntesis de enzimas, tanto específicas como inespecíficas, para la degradación de los componentes de la MEC, lo cual conlleva a un recambio continuo de la matriz que se afecta durante los procesos de reparación tisular post-inflamatoria y fibrogénesis, además de la organogénesis y la metástasis.

En conclusión, la modulación del metabolismo de los componentes de la matriz se lleva a cabo por varios mecanismos; uno de ellos, es a través de la MEC misma, ya que es capaz de generar señales para controlar varias de las funciones celulares, como son la

migración y la quimiotaxis, la reorganización del citoesqueleto y la forma celular, la regulación en la proliferación celular y la diferenciación (Mauch et al., 1993), así como la síntesis y degradación de algunos de sus componentes proteicos y no proteicos (Schor, 1980). El otro mecanismo, es como se mencionó por medio de citocinas (ver tabla I).

LA COLÁGENA.

Las proteínas colagénicas se consideran como una familia de moléculas con estructuras estrechamente relacionadas pero de distribución variable en los tejidos. Los diferentes tipos se dividen en cuatro grupos de acuerdo con su estructura:

1. El primer grupo se caracteriza por tener dominios helicoidales ininterrumpidos con secuencias características -Gli-X-Y-, donde X es frecuentemente prolina y en la posición Y se presenta hidroxiprolina (Ramachandran y Reddi, 1976). Las colágenas se sintetizan como precursores o procolágenas, conformadas por tres cadenas proc. que se procesan en el medio extracelular dando lugar a triples hélices de cadenas α que subsecuentemente se ensamblan en fibrillas y después en fibras. Los ejemplos de este grupo son los tipos I, II, III, V y XI.

2. El segundo grupo comprende a las colágenas tipo IV y VII, cuyos componentes

polipeptídicos se distinguen por ser muy largos y especialmente por sus triples hélices extendidas. Su estructura primaria se caracteriza por variaciones en el triplete de la secuencia -Gli-X-Y-.

3. El tercer grupo está constituido por moléculas de colágena con triple-hélice corta, que puede estar en forma de dominios helicoidales continuos, como los tipos VI, VIII y X (Kielty et al., 1993).

4. Finalmente, el cuarto grupo está formado por varios productos genéticos diferentes, con distribución variable que comprende a las colágenas con triple-hélices interrumpidas asociadas a fibrillas (FACIT, por sus siglas en inglés). Éstas son moléculas que presentan más de un dominio con triple hélice, con repetición de la secuencia típica -Gli-X-Y-, característica de los dominios colagénicos, separado por segmentos que no son helicoidales. Algunas de sus características son: carencia de procesamiento proteolítico, que sí ocurre con las colágenas fibrilares, no son secretadas como precursores y generalmente se asocian con las colágenas fibrilares. Los representativos de este grupo, son los tipos IX, XII y XIV (Shaw y Olsen, 1991, Kielty et al., 1993).

La regulación génica de la colágena se lleva a cabo, como en otras proteínas, por una región promotora localizada en la posición 5' inmediatamente después del sitio de inicio de la transcripción. En la región del promotor se une la enzima ARN polimerasa II, cuya función es la transcripción de los genes que codifican para las proteínas. Además, se presentan secuencias importantes para la transcripción llamadas incrementadores, que se pueden ubicar hacia la región 5' de los promotores, más allá del extremo 3' de los genes o en el primer intrón. Ambos elementos, el promotor y el incrementador, contienen sitios de unión a proteínas que son específicamente reconocidos por los factores de la transcripción celular, lo cual lleva a que una interacción compleja de los factores de la transcripción unidos al incrementador y al promotor, resulte en la

regulación de la actividad transcripcional. Por otro lado, existen elementos *cis* que afectan positiva o negativamente la transcripción cuya localización ha sido identificada en la región ascendente del gen, así como en el primer intrón de varios de los genes que codifican para la colágena. La regulación de la transcripción de los genes que regulan a la colágena no se lleva a cabo solamente a nivel de los elementos *cis* o los factores de unión al ADN, *trans*, sino también por el estado en la estructura de la cromatina y la metilación de los genes.

En cuanto a la regulación bioquímica, existen moduladores fisiológicos importantes para la síntesis y degradación de la colágena, éstos incluyen a hormonas, tales como los glucocorticoides, varias citocinas (Varga y Jiménez, 1995) y a otros componentes de la MEC. Una de estas citocinas, el TGF- β , representa a una superfamilia de factores con actividades pleiotrópicas. Esta familia incluye morfógenos, reguladores de funciones endócrinas y un amplio espectro de moduladores especializados en la proliferación y diferenciación celular. La distribución de los factores relacionados con el TGF- β es amplia entre las diferentes especies y va desde la mosca de la fruta hasta el humano, además de caracterizarse por mostrar una conservación evolutiva inusualmente estricta.

El TGF- β es una glicoproteína dimérica de 25 kD, con dos subunidades idénticas o diferentes, según la isoforma de TGF- β que se trate 1, 2 ó 3, en mamíferos, el tipo 4 que se encuentra en el pollo y el 5 en sapo. Ambas cadenas se encuentran unidas por puentes disulfuro (Massagué, 1990, Alvaro-Gracia, 1992) y el factor se secreta como una molécula latente que se activa por escisión del propéptido precursor. Su síntesis se ha descrito en una gran variedad de células como los linfocitos T y los B, los macrófagos, los fibroblastos, las plaquetas, las células tumorales y se ha encontrado también en órganos como el riñón, la placenta y el hueso. El TGF- β es un mitógeno indirecto para los fibroblastos, ya que actúa induciendo la síntesis del receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

Existen reportes donde se describe que en los fibroblastos adultos el TGF- β no incrementa la síntesis del receptor mencionado, a diferencia de los fibroblastos derivados de pacientes con esclerodermia, una enfermedad autoinmune caracterizada por presentar un depósito excesivo de proteínas del tejido conjuntivo y un incremento en la proliferación celular. Sin embargo, en fibroblastos derivados del prepucio de niños el factor disminuye la expresión de los receptores α del PDGF (Postlethwaite, 1993). Además, el TGF- β induce la expresión e incorporación de las colágenas tipo I y III en la MEC, donde el incremento es hasta 10 veces mayor que los niveles basales y la regulación se presenta a través del factor nuclear-1 (NF-1), localizado en la región del promotor de estas colágenas (Mauch et al., 1993). Los efectos mencionados se corroboraron por la adición de anticuerpos neutralizantes contra el TGF- β 1 y 2 en un modelo murino de cicatrización cutánea, en donde el infiltrado inflamatorio, así como el depósito de colágena, entre otras proteínas de la MEC, disminuye por la acción bloqueadora de los anticuerpos (Shah et al., 1994).

Por su parte, durante la cicatrización dérmica, las colágenas tipo I y III se expresan en mayor proporción que lo normal, particularmente la tipo III, que disminuye con el tiempo hasta alcanzar casi los niveles normales. Así, los ARN mensajeros (ARNm) que codifican para las cadenas α 1(I) y la α 1(III), se han colocalizado con el ARNm para el TGF- β 1, especialmente en células fibroblastoides derivadas de patologías fibrosantes dérmicas como la cicatriz hipertrófica; además, las células endoteliales adyacentes a las mononucleares, también expresan TGF- β 1, lo cual sugiere una relación entre las células productoras del factor y las responsables de la sobreexpresión de la colágena; probablemente a través de una regulación autócrina y parácrina (Zhang et al., 1995). Por otra parte, se sabe que el TGF- β 1 también es un inductor potente de la expresión de la procolágena tipo I en los preadipocitos, mientras que en los adipocitos diferenciados, la expresión del ARNm transcrito para la

procolágena tipo I es mucho menor (Rizzino,1994), lo que hace considerar su participación en el proceso de cicatrización cuando el daño alcanza la hipodermis.

Otro factor fibrogénico es el PDGF, que es una proteína básica de 30 kD, aislada inicialmente de los gránulos α de la plaquetas, consta de subunidades A y B, las cuales están unidas por puentes disulfuro para formar un dímero. El PDGF existe en 3 isoformas diméricas: un heterodímero AB y dos homodímeros, AA y BB, todos con actividades biológicas, que los monómeros no tienen. El PDGF se secreta por una variedad de células, incluyendo a los fibroblastos, las células musculares, las endoteliales, y los macrófagos activados, lo cual sugiere que participa en el control de la producción de los componentes del tejido conjuntivo durante la cicatrización.

El PDGF AB solamente tiene efectos marginales en la síntesis de la colágena por fibroblastos humanos de pulmón (Kovacs,1991), ya que la mayoría de sus efectos se refieren a la capacidad que tiene para inducir la proliferación de los fibroblastos y a su participación junto con el TGF- β en la síntesis y el depósito de la colágena.

La interleucina I (IL-1) por su parte, se identificó inicialmente como un producto macrofágico con actividad mitogénica tanto en los linfocitos como en los timocitos y como pirógeno endógeno. Existen dos isoformas de esta citocina, la IL-1 α y la β , ambas con un peso molecular de 17 kD en su forma extracelular activa y derivan de un precursor de 31 kD sin actividad biológica. Aunque la homología de ambas isoformas es sólo del 26% en su secuencia de aminoácidos, las dos manifiestan las mismas actividades fisiológicas y se unen al mismo receptor, aparentemente con la misma afinidad. La principal fuente de IL-1 son los monocitos y macrófagos, aunque otras células también la secretan, como es el caso de las células dendríticas, las de Langerhans, las células B y las T, las endoteliales, las mesangiales, las epiteliales, los astrocitos, las células de la microglia, los fibroblastos y los neutrófilos (Alvaro-Gracia,1992).

En cuanto a la relación de la IL-1 con la síntesis de la colágena, tanto la IL-1 α como la β estimulan la síntesis de la procolágena tipo I y de sus mensajeros en fibroblastos humanos, lo cual sugiere un mecanismo pretraduccional para este efecto. Además, la acción es prácticamente específica para la colágena, ya que no incrementa la síntesis de las proteínas totales en más de un 20%, y la degradación intracelular de la colágena recién sintetizada no se altera por efecto de la IL-1. Todo ello parece ser independiente de la prostaglandina E₂ (PGE₂), ya que se sabe que esta prostaglandina se induce por la IL-1 α y β , y que tiene la capacidad de suprimir el crecimiento de los fibroblastos y la producción de la colágena (Postlethwaite et al.,1988). Empero los efectos observados por la acción de la IL-1 son ambiguos, ya que otros autores han demostrado que la IL-1 β no estimula la síntesis de la colágena y que los resultados obtenidos sobre la proteína se pueden deber al efecto que tiene en la estimulación o inhibición de la síntesis de la colagenasa y estromelisin (Kovacs,1991). Lo anterior parece estar influenciado, al menos *in vitro*, por la concentración de la citocina, como se muestra en el trabajo de Diegelmann (Diegelmann et al.,1990, Kovacs y DiPietro,1994). También existen reportes donde se menciona que la IL-1 además de estimular la proliferación de las células endoteliales y liberar la actividad de los procoagulantes, incrementa la producción de la colágena tipo IV por las células epidérmicas (Oppenheim et al.,1986), lo cual se puede relacionar con algunas alteraciones de la piel o bien con el proceso de reepitelización.

El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) se sintetiza como un precursor intracelular de 26 kD, que posteriormente se modifica a la forma extracelular activa de 17 kD. Es uno de los productos de secreción de los macrófagos activados y también lo sintetizan otras células como los linfocitos, las células "asesinas naturales" (NK) y los mastocitos; actualmente se le reconoce más por su actividad proinflamatoria que por sus efectos antitumorales. Este factor comparte casi todas las acciones de la IL-1, salvo la de activación

linfocitaria y es junto con ésta, el paradigma de la citocina proinflamatoria, de tal forma que a menudo ambas actúan en forma sinérgica (Alvaro-Gracia,1992); donde algunos reportes indican que estimula la síntesis de la colágena, mientras que otros que la suprime.

Además de las citocinas mencionadas, de las cuales se sabe más de su actividad sobre la síntesis de colágena, existen otros factores cuya participación es poco clara. La interleucina 4 (IL-4) por ejemplo, es una glicoproteína producida por las células T con actividades pleiotrópicas en varios tipos celulares, se deriva de un precursor de 153 aminoácidos para quedar como una molécula activa de 129. Si bien la mayoría de sus actividades estudiadas son sobre las células de la respuesta inmune, como las células B, también se ha reportado que induce a los fibroblastos dérmicos a secretar colágena (Banchereau et al.,1994).

En contraste al efecto estimulador de la mayoría de las citocinas, los interferones (IFN), que son una familia heterogénea de citocinas multifuncionales, cuya primera demostración de actividad biológica fue la inducción de resistencia celular a la infección viral, se presentan en dos familias muy diferentes entre sí, la superfamilia del IFN- α/β , producidos principalmente por los leucocitos, y la segunda familia que consiste en un solo gen que codifica para una proteína denominada IFN- γ , producida por los linfocitos T (Vilcek,1990). El IFN- γ suprime la producción de la colágena en los fibroblastos a nivel transcripcional, al apagar el gen que codifica para la colágena, pero no el de la fibronectina (Kovacs y DiPietro,1994). También se ha demostrado en estudios *in vitro* que el IFN- γ regula de manera irregular a la colágena tipo VI, es decir, algo similar a lo que ocurre durante el proceso de la cicatrización, ya que las células tratadas con el factor regulan negativamente la síntesis del ARNm para la cadena $\alpha 3$ (VI) de la colágena, mientras que la $\alpha 1$ (VI) se sobreexpresa (Oono et al.,1993).

Otra citocina a la cual hasta hace algunos años se le atribuían solamente funciones inmunológicas, es la interleucina 10 (IL-10). Ésta es un polipéptido de 18.5 kD, el cual fue

originalmente caracterizado como una citocina secretada por clones de células Th2 activadas; y actualmente se sabe que en los humanos la sintetizan los linfocitos T y los macrófagos, mientras que en el ratón, también la producen las diferentes subclases de células T, como son las Th0, las Th1 y las Th2. La IL-10 inhibe la síntesis de varias citocinas en los linfocitos T y macrófagos activados; particularmente, suprime la producción de la IL-2 y el INF- γ , la IL-1 α y la β , la IL-6, la IL-8, el TNF- α , el factor estimulador de las colonias de los granulocitos (G-CSF) y el de los granulocitos y monocitos (GM-CSF). En los fibroblastos dérmicos humanos, esta citocina inhibe la expresión de la colágena tipo I a nivel transcripcional, donde la regulación sobre la expresión génica se puede deber a los efectos directos de ésta sobre algunos elementos de respuesta, como son los factores de transcripción AP-2, el NF-1 y el NF- κ B o a su influencia sobre otras citocinas, que a su vez regulen la síntesis de la colágena (Reitamo et al.,1994).

LA FIBRONECTINA.

La fibronectina es una glicoproteína extracelular que se presenta en dos formas: una soluble, en los fluidos corporales, particularmente en el plasma, y otra insoluble en la MEC. Esta proteína juega un papel muy importante en los procesos fisiológicos, tales como la embriogénesis, la hemostasia, la cicatrización, la fibrosis y la trombosis, y es secretada por una amplia variedad de tipos celulares. La fibronectina presenta modificaciones postraduccionales y puede ser glicosilada, fosforilada o sulfatada. Aunque la fibronectina no glicosilada presenta muchas de las actividades de la proteína nativa, es más sensible a las proteasas, de tal forma que son los carbohidratos los que le confieren la estabilidad contra la proteólisis. Más aún, la presencia de éstos puede modular la unión a la colágena y alterar ligeramente su interacción con las células (Yamada,1991).

La fibronectina se secreta como un dímero, con un peso molecular para cada monómero de aproximadamente 220 a 225 kD; los

monómeros están unidos por dos puentes disulfuro cercanos al extremo carboxilo de la proteína. Como muchas de las otras proteínas de la matriz, incluyendo a la laminina, la tenascina, y la trombospondina; la fibronectina es una proteína mosaico, es decir, está compuesta por unidades modulares, que frecuentemente corresponden a la estructura del exón del gen. Se encuentra formada básicamente por tres tipos de módulos conocidos como Fn1, Fn2 y Fn3. Esos módulos están organizados en dominios funcionales resistentes a la proteólisis y contienen sitios de unión a otras de las proteínas de la MEC, como la colágena y la trombospondina, a los receptores de la superficie celular, a proteínas circulantes de la sangre, como la fibrina y también se unen a GAGs, del tipo de la heparina y al sulfato de condroitín. Además, existen varias isoformas de la fibronectina derivadas de los empalmes alternativos que se presentan en dos regiones del gen.

La estructura terciaria de los módulos de la fibronectina aún se desconoce, sin embargo se sabe que cada uno tiene una estructura consenso, es decir, secuencias particulares que se repiten de manera característica. Los módulos Fn1 se encuentran en los extremos de la proteína, el del extremo carboxilo contiene los sitios de unión a la fibrina, y el del amino a la colágena. Cada módulo consta de 45 aminoácidos aproximadamente y entre ellos se encuentran cuatro residuos de cisteína, los cuales forman dos puentes disulfuro entre sí, mientras que la estructura terciaria del módulo se estabiliza por medio de interacciones hidrofóbicas. Los módulos Fn2, son los menos abundantes y se encuentran después de los Fn1 de la región amino, en la región de unión a la colágena. Cada uno de éstos se compone por 60 aminoácidos aproximadamente. Los módulos Fn3 no contienen puentes disulfuro, están formados por 90 aminoácidos aproximadamente, y cada unidad de la fibronectina contiene entre 15 y 17 módulos de este tipo, dependiendo de la isoforma de fibronectina que se trate. Estos módulos son particularmente importantes dado que se

presentan en diferentes proteínas de varias especies, además en ellos se encuentran regiones específicas de unión a otras proteínas y particularmente un triplete de aminoácidos característico, la secuencia -arginina-glicina-aspartico-, también conocida como el péptido RGD. Esta secuencia es un sitio de unión característico de los receptores celulares del tipo de las integrinas (Potts y Campbell, 1994, Yamada, 1991).

La regulación de la fibronectina se modifica durante procesos que impliquen la modificación de los tejidos, tales como la organogénesis, la inflamación, la reparación, etc. Por ello, se han realizado estudios para conocer la modulación de su síntesis, bien sea, por su interacción con otros componentes de la matriz, o por medio de estímulos celulares como las citocinas. Así, se sabe que la IL-1 (Wong y Wahl, 1990) y el TGF- β , incrementan la expresión de la fibronectina en varios tipos celulares, tanto derivados del mesénquima, como epiteliales, sean normales o transformados (Massagué, 1990). Estos trabajos fueron realizados en fibroblastos dérmicos humanos, donde dicha regulación se lleva a nivel transcripcional, al incrementar la estabilidad de los mensajeros que codifican para la proteína, siendo este proceso independiente de la proliferación celular (Varga et al., 1987, Raghow et al., 1987). Aún más, en trabajos realizados en queratinocitos humanos se observó que el TGF- β induce un incremento en los niveles basales del ARNm que codifica para la fibronectina (Salo et al., 1991, Roark y Greer, 1994). Además, se sabe que la producción de la fibronectina en varias células, como los fibroblastos del embrión de ratón y las células epiteliales de la rata, se incrementa a través de mecanismos transcripcionales por influencia del EGF (Asem y Novero, 1994).

LA TENASCINA.

La tenascina es una glicoproteína oligomérica muy similar a la fibronectina en algunas regiones de sus subunidades. Tiene un tamaño poco común, ya que es muy grande en comparación con otras proteínas de la MEC, aproximadamente 1000 kD, y está formada por

seis subunidades similares, unidas por puentes disulfuro intercadenas. Los pesos moleculares de las tres subunidades de la tenascina del pollo se han calculado en 200, 180 y 170 kD. Más de la mitad de la proteína está compuesta por módulos Fn3 de la fibronectina. Las regiones de la tenascina que no son homólogas con la fibronectina, son similares en la parte carboxilo de la molécula con la región globular del β - y γ -fibrinógeno. En la región amino terminal, los módulos Fn3 están unidos con trece y media repeticiones de dominios del tipo EGF; esos dominios forman fibras largas que se derivan del sitio donde se unen todas las subunidades, y se ha propuesto que la región de unión está formada por una hélice superenrollada de tres subunidades de tenascina y de una región hidrofóbica unida por puentes disulfuro. Posteriormente se unen dos trómeros en el dominio central globular, en donde las seis subunidades contribuyen a la estabilidad de la proteína.

La tenascina fue descubierta como un oligómero hexamérico al cual se denominó hexabraquión. El hallazgo se dió por el grupo de Erickson y el de Iglesias de manera independiente, ellos la detectaron junto con la molécula dimérica de la fibronectina

En contraste con la fibronectina, la tenascina no se encuentra en el suero, sino que se expresa de manera transitoria durante la embriogénesis, en el mesénquima denso que rodea a los órganos en desarrollo, tales como las glándulas mamarias, los dientes o el riñón; también está presente en el cartilago embrionario y en el hueso. En los adultos, la tenascina se localiza en el pericondrio y el periostio, los ligamentos, los tendones y las uniones miotendinosas. Por su parte, el músculo liso también contiene tenascina, mientras que órganos como el corazón, el músculo esquelético o los órganos epiteliales la contienen en cantidades muy bajas o nulas. La tenascina se manifiesta temporalmente durante la cicatrización y es una de las pocas moléculas de la matriz que se han encontrado en el sistema nervioso central y como el principal componente de la MEC en el sistema nervioso periférico.

De las funciones sugeridas para la tenascina, la única que no es discutible es su interacción con los proteoglicanos, ya que las demás son controversiales, lo que se debe a algunas funciones ambiguas de la molécula, ya que es capaz de mediar la adhesión e inhibir las interacciones celulares, es decir, tiene propiedades antiadhesivas que la hacen opuesta en función a la fibronectina con quien, como se mencionó, tiene gran similitud (Yamada,1991, Chiquet-Ehrismann,1990).

La regulación de la expresión de la tenascina presenta un patrón dinámico, dada su modulación durante los procesos normales del desarrollo y los reparativos. En principio, su expresión está asociada a tipos celulares específicos, dado que en general no la sintetizan las células epiteliales, mientras que sí lo hacen los fibroblastos. Así, su regulación se ha visto modificada por componentes séricos, donde se sabe que el TGF- β es uno de los participantes (Chiquet-Ehrismann,1990). Sin embargo, existen otras citocinas que también participan en la modulación de la expresión de la tenascina, incluso en mayor grado que el mismo TGF- β . Esta modulación se supone que ocurre a través de los elementos reguladores *cis* localizados en los extremos del gen que codifica para la tenascina del pollo, que incluyen a las secuencias que confieren la respuesta a los factores solubles y de diferenciación, de tal forma que esos elementos génicos pueden mantener una regulación específica en algunos tipos celulares. El FGF básico (bFGF), que es un polipéptido catiónico con peso molecular de 17 a 18 kD, el FGF ácido (aFGF) que es otra especie del mismo factor con un peso molecular muy cercano al anterior, 16 a 17 kD y la otra isoforma del bFGF, la de 22 a 25 kD (Klagsbrun y Folkman,1990) son los inductores más potentes, al incrementar más de cien veces la síntesis de la proteína, lo que se debe a la unión de estos factores con una serie de receptores comunes. En ese estudio se demostró que la expresión de la tenascina inducida por el FGF en las células derivadas de los tumores neuroectodérmicos, es independiente de los cambios en la proliferación celular, la síntesis de

las proteínas totales o de la producción de otras proteínas de la MEC (Retting et al., 1994).

Por otro lado, se han identificado líneas de fibroblastos con síntesis diferencial de tenascina; así, se encuentran, incluso en el mismo donador, fibroblastos con producción baja, media y alta de tenascina. Con base en lo anterior, ha sido posible llevar a cabo la evaluación de otras citocinas sobre la producción de la proteína, donde se demostró que el PDGF-BB, el TNF- α , la IL-1 α y β , y la IL-4 son inductores muy potentes; aunque el efecto observado con el PDGF-BB en los fibroblastos de producción intermedia de tenascina, fue el mayor. Finalmente, los efectos del TGF- β sobre la expresión de la tenascina pueden ser más complejos de lo que se pensó en un principio, ya que en los fibroblastos humanos el factor puede aumentar o disminuir la expresión de la proteína, dependiendo de la línea de fibroblastos usada y de la presencia de otros factores presentes en el sistema de cultivo (Retting et al., 1994).

LOS GLICOSAMINOGLICANOS Y LOS PROTEOGLICANOS.

Como se mencionó, los proteoglicanos son macromoléculas compuestas por cadenas de GAGs unidas covalentemente a una proteína núcleo. Los componentes de los GAGs están formados por hexosamina, D-glucosamina o D-galactosamina, y unidades del ácido hexurónico, como el ácido D-glucurónico o el L-idurónico, o la galactosa en el sulfato de queratán. Estas unidades de carbohidrato están arregladas de manera alternada en la secuencia ramificada, en donde algunos GAGs contienen sustituyentes sulfatados en varias posiciones. Los GAGs más comunes que se encuentran en los proteoglicanos y que contienen galactosaminoglicanos, son el sulfato de condroitín y el sulfato de dermatán, mientras que entre los glicosaminoglicanos se encuentran el sulfato de heparán, la heparina y el sulfato de queratán. El hialuronato, es otro GAGs pero que se presenta en forma libre, es decir, no se encuentra en los proteoglicanos. El sulfato de dermatán, el de heparán y la heparina contienen

unidades del ácido glucurónico e idurónico, mientras que el sulfato de condroitín solamente contiene al ácido glucurónico como el único constituyente del ácido hexurónico. De esta manera, el número de sustituyentes GAGs por cadena en la proteína núcleo, generalmente unidos a los residuos de la serina, puede variar entre uno y más de cien, lo que genera una gran variabilidad en el tamaño, antigenicidad y función de los proteoglicanos.

Por su parte, las proteínas núcleo de los proteoglicanos pertenecen a una familia de proteínas que está conformada de la siguiente manera: a) los proteoglicanos del sulfato de condroitín, que son grandes moléculas extracelulares y tienen capacidad para interactuar específicamente con el hialuronato. A esta familia pertenecen el agregano, que se encuentra en el cartilago y el versicano, producido por los fibroblastos; b) Los proteoglicanos con proteínas núcleo pequeñas y homólogas, que están sustituidas con una o dos cadenas de GAGs. Esta familia incluye a la decorina, el biglicano y la fibromodulina; c) Los proteoglicanos del sulfato de heparán de la membrana basal tienen un alto peso molecular y son sintetizados por algunas células tumorales; d) Los proteoglicanos de la superficie celular intercalados con la membrana, son moléculas híbridas que contienen tanto al sulfato de condroitín, como al de heparán, en este grupo se encuentra el sindecano. Y finalmente, el grupo e) al que pertenecen las serglicinas, que son proteoglicanos intracelulares de alto peso molecular. Éstos tienen proteínas núcleo con secuencias distribuidas de residuos alternados de serina y glicina que además, están fuertemente combinados con cadenas de sulfato de condroitín y/o heparina.

Los proteoglicanos están distribuidos ampliamente en los tejidos animales y parece que son sintetizados por todos los tipos celulares. Su participación es diversa y va desde funciones mecánicas, que son esenciales en el mantenimiento de la integridad estructural de varios tejidos conjuntivos, hasta los efectos en algunos procesos más dinámicos, como lo son la

movilidad celular, la diferenciación y la morfogénesis (Kjellén y Lindahl, 1991).

La regulación en la producción de los proteoglicanos es particularmente modulada a dos niveles, en la síntesis de la proteína núcleo y en la síntesis de los GAGs; y como los otros componentes de la MEC, este proceso también se modifica por el efecto de las citocinas. Así, el TGF- β es una vez más, uno de los factores que tiene influencia en el aumento de la expresión de los proteoglicanos, donde también puede modular su catabolismo (Morales y Roberts, 1988). El TGF- β 1 y el TGF- β 2 regulan la producción del biglicano y la decorina, no solamente al incrementar la síntesis de la proteína núcleo, sino con un aumento del tamaño de las cadenas de los GAGs unidos a ellas (Massagué, 1990). Sin embargo, también en otros sistemas de células derivadas del mesénquima, como los preadipocitos y las células musculares, ocurre algo similar, un incremento en la masa de los proteoglicanos con los sulfatos de condroitín y dermatán, donde tanto el TGF- β 1 como el β 2 incrementan hasta 20 veces su síntesis (Bassols y Massagué, 1988); y aunque en ese estudio se menciona que la respuesta puede ser particular del TGF- β , existen otros reportes donde se menciona la participación de otros factores en su regulación (Luyten et al., 1992). La regulación del biglicano en los cultivos de fibroblastos humanos de la piel y la encía, por este factor, se lleva a cabo a través de un incremento en los niveles del mensajero, donde se muestra una correlación en la elevación en los niveles del transcrito para la procolágena tipo I con la adición del factor, lo cual sugiere una regulación coordinada de esos dos genes por el TGF- β 1. Sin embargo, la regulación génica del versicano no muestra correlación como en los anteriores, de tal forma que se sugiere que su modulación no esté coordinada. En contraste con el biglicano y el versicano, los niveles del ARNm que codifica para la síntesis de la decorina se reducen de manera importante en presencia del TGF- β 1 en las mismas células. Pero junto con la disminución en la síntesis de la decorina se presenta un aumento en las cadenas laterales de

los GAGs de este proteoglicano (Kähäri et al., 1991). Además, existen reportes donde se argumenta que el mismo TGF- β aumenta la producción del ARNm que codifica para la proteína núcleo del agrecano (Roark y Greer, 1994).

Por otra parte, en un modelo de fibroblastos humanos para la síntesis del hialuronato, el PDGF también incrementa la síntesis del GAGs, donde la isoforma que tiene la mayor actividad es el PDGF-BB, mientras que para el PDGF-AB la actividad es intermedia y con el PDGF-AA es la menor; en este caso es posible que la actividad se deba a que el PDGF-BB se une a los dos receptores, mientras que el PDGF-AA solamente a uno de ellos. Otros dos factores, el EGF y la isoforma básica del FGF también tienen participación en la inducción de la síntesis del hialuronato, aunque en una proporción menor (Heldin et al., 1989). En cuanto a la regulación de los proteoglicanos sulfatados producidos por los fibroblastos, en presencia de la IL-1 β , ésta disminuye principalmente la síntesis de los sulfatos de condroitín y dermatán, donde el efecto es causado parcialmente por una disminución considerable en los niveles del ARNm que codifica para el versicano, mientras que el efecto es mucho menor para la decorina; lo cual indica que el efecto de esta citocina es más intenso sobre los proteoglicanos de mayor tamaño. Asumiendo que existe una función similar entre el versicano en la matriz sintetizada por los fibroblastos y el agrecano en la del cartilago, la disminución en los niveles de esta molécula, inducida por la IL-1, podría tener un efecto importante en las propiedades hidrodinámicas de la MEC (Qwarnström et al., 1993).

Con base en los datos anteriores, podemos concluir que la regulación de los componentes de la MEC se manifiesta como un proceso multifactorial (ver figura 2), el cual se altera durante los procesos de inflamación, tumorigénesis y reparación, dada la presencia de células activadas capaces de secretar citocinas en proporciones mayores a las basales o de expresar otras que no estaban presentes. Además de la presencia de células efectoras

residentes, generalmente mesenquimatosas, que modifican la síntesis de los componentes de la matriz y de las enzimas encargadas de regular su recambio, que si bien, no son parte de la MEC misma, sí participan en la degradación de sus componentes. Por otro lado, se sabe que existen interacciones entre la matriz y algunas citocinas (Gailit y Clark, 1994), lo que la hace un reservorio de factores multifuncionales que conlleva a una regulación todavía más compleja,

ya que cuando se presenta un daño en el tejido conjuntivo se liberan, además de varias citocinas, péptidos biológicamente activos (Mauch et al., 1993) que contienen dominios semejantes a los factores mismos, lo que induce su participación en esta intrincada red de estímulos positivos y negativos, teniendo tanta variedad de células blanco, como de receptores expresados en la superficie de las mismas.

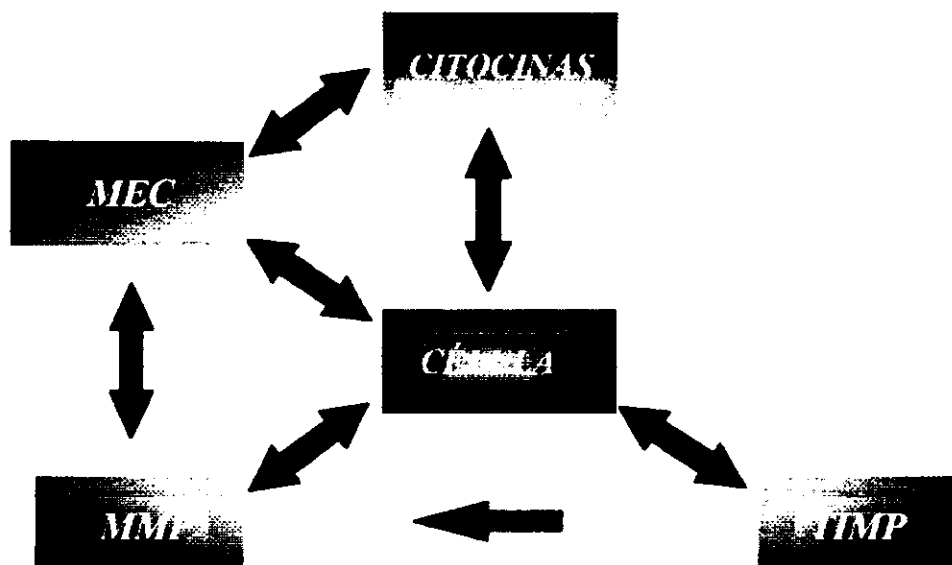


Figura 2. Interacciones entre la célula, las citocinas, las metaloproteasas, los inhibidores y la MEC. Como se puede ver en la figura, la mayoría de los fenómenos son bidireccionales debido a la dinámica tan compleja que se presenta en los tejidos.

Es de esta manera que el fenómeno de la fibroplasia es regulado por una gran variedad de factores, donde si bien se produce una gran cantidad de componentes de la MEC, principalmente colágenas, también se observa la incorporación de fibras de colágena residentes en la zona del daño y sus alrededores. Es decir, la matriz del tejido de granulación comprende fibras de neosíntesis, además de las depositadas en la dermis antes del daño (Ehrlich y Krummel, 1996).

Ahora bien, conforme se va generando una matriz temporal y característicamente laxa, se inicia la neovascularización, por lo que el tejido de granulación implica la presencia de estirpes celulares mesenquimatosas, inflamatorias y vasculares, en donde estas últimas provienen de los vasos capilares remanentes, que por una

variedad de estímulos participan en el proceso conocido como angiogénesis. Éste es un proceso extremadamente complejo que implica la presencia de quimioatrayentes y receptores o proteínas de membrana, alteración fenotípica de la célula endotelial, mitogénesis y tanto disposición como composición de una MEC apropiada.

La angiogénesis comienza aproximadamente a los dos días de ocurrido el daño, cuando los fragmentos de la matriz liberados durante la fase inflamatoria atraen células mononucleares de sangre periférica al sitio de la herida. Aquí, los macrófagos y las células locales activadas liberan factores angiogénicos como el bFGF, aFGF, TGF- α , TGF- β , TNF- α y el PD-ECGF que es el factor de crecimiento de la célula endotelial derivado de plaquetas, la angiogenina,

la angiotropina, el VEGF o factor de crecimiento endotelial vascular, la IL-8, el PDGF, además de otras sustancias de bajo peso molecular, como el péptido KGHK (-lisina-glicina-histidina-lisina-) derivado de la osteopontina o SPARC, aminos biógenas, ácido láctico y una tensión de oxígeno baja, generada por la hipoxia en el sitio del daño.

La presencia de algunos de estos factores, básicamente el FGF, estimulan en las células endoteliales la liberación del activador del plasminógeno y la procolagenasa de fibroblastos y neutrófilos, lo que lleva a la conversión del plasminógeno en plasmina y de la procolagenasa en colagenasa activa, cuyas actividades proteolíticas permiten la digestión de la membrana basal (Nwomeh et al.,1998). Además, se genera la proyección de pseudópodos a través de las membranas basales fragmentadas. Subsecuentemente, la célula endotelial migra al espacio perivascular por la presencia del mismo FGF, los péptidos derivados de la fibronectina que se encuentran presentes en el área dañada, la heparina liberada por las células cebadas y por otros factores quimioatrayentes de la célula endotelial. Sin embargo, para completar el proceso angiogénico, es necesario que la matriz perivascular presente un contenido importante de fibrina y fibronectina, ya que las células endoteliales migrantes expresan la integrina $\alpha\beta 3$ que favorece su adhesión y migración. Posteriormente, la neovasculatura primero deposita su propia matriz provisional, rica en fibronectina y proteoglicanos, para finalmente formar una verdadera membrana basal. Donde el TGF- β estimula la síntesis de estos componentes e induce el fenotipo endotelial a las células para la formación de tubos capilares. Por su parte, el FGF y VEGF así como otros mitógenos, estimulan la proliferación celular, lo que conlleva a la extensión capilar. De esta manera, el proceso se prolonga durante los primeros días hasta que la neovasculatura se interconecta formando asas o plexos capilares a través de los cuales el flujo sanguíneo comenzará a circular.

Si bien es difícil diferenciar si existe una fase de la reparación más activa o más importante que las demás, cabe señalar que la fase de granulación es un proceso coordinado donde se manifiesta una gran cantidad de estímulos solubles, además de la proliferación, migración y diferenciación de casi todas las estirpes celulares locales e inflamatorias capaces de inducir o llevar a cabo por sí mismas, la síntesis y degradación de todos los componentes de la MEC. Esto permite considerar a la fase de granulación como una fase crítica en donde se puede reconocer si la reparación se llevará a cabo de manera normal o se convertirá en una herida crónica, debido al estado cualitativo y cuantitativo de los componentes celulares, solubles y de la matriz. Se sabe que los neutrófilos son abundantes en la fase inflamatoria de un proceso normal de reparación y que 24 horas después del daño son macrófagos los que predominan. De cualquier forma, ambos tipos celulares producen y liberan gran variedad de citocinas entre las que destacan la IL-1 y el TNF- α . No sólo eso, sino que los queratinocitos, el endotelio y los fibroblastos también tienen capacidad para producir esos dos factores, lo que permite como se mencionó, la síntesis y liberación de elastasa y colagenasa de los neutrófilos y otras colagenasas de macrófagos, fibroblastos y queratinocitos que degradan la MEC dañada o desnaturalizada para favorecer la formación de una matriz temporal, pues la IL-1 y el TNF- α incrementan la proliferación de los fibroblastos, indirectamente la síntesis de colágena, se incrementan las metaloproteasas en general y disminuyen los TIMP (Mast y Schultz,1996). Sin embargo, si por algún motivo se alcanza una inflamación mayor a lo esperado normalmente, se genera un tejido de granulación donde el exudado no es mitogénico para los fibroblastos, se incrementa significativamente la proporción de proteasas de matriz y disminuyen sus inhibidores, lo que conlleva a la destrucción indiscriminada de la MEC temporal, necesaria para la reepitelización e infiltración celular, ya que hay un aumento en la proporción de IL-1, TNF- α , factor de crecimiento semejante a la

insulina (IGF-I) e IL-6, aunque la IL-8 y el TGF- α y β se mantengan en la misma proporción que en el exudado del tejido de granulación normal, y el EGF disminuya en comparación con éste. Más aún, el exceso de proteasas afecta directamente el tiempo de vida de los factores solubles y sus receptores, así como el de las integrinas, cuya participación en la migración celular es crucial, lo que conduce a la generación de un proceso inflamatorio crónico y en consecuencia a una herida crónica (Mast y Schultz, 1996) (ver figura 3).

Finalmente, *la remodelación de la matriz* depende de la maduración celular, la apoptosis o muerte celular programada, la síntesis y degradación de los diferentes componentes de la MEC (Fase III de la figura 1). De hecho, la remodelación de la matriz y la maduración de la neoequermis, la fibroplasia y la neovascularización comienzan en el margen de la herida mientras el tejido de granulación aún está invadiendo el área dañada. Los componentes de la MEC se depositan en el mismo sentido, comenzando por el borde dañado para posteriormente avanzar hacia el centro. Cabe señalar que en cuanto a calidad y cantidad la MEC es significativamente diferente en el límite lesionado, en relación con la situada en el centro del daño. Donde la composición y estructura de la matriz presente en el tejido de granulación dependen del tiempo transcurrido a partir del daño, además de la distancia entre los márgenes de la lesión.

Como se ha mencionado, para que los fibroblastos y miofibroblastos locales sintetizen y secreten las diferentes moléculas de la MEC, es necesario que sean estimulados por queratinocitos, macrófagos, células endoteliales, etc. a través de la liberación de citocinas fibrogénicas. Así, una vez que la matriz está establecida disminuye la síntesis de sus componentes, particularmente la colágena tipo I, aún cuando todavía se encuentren presentes varias de estas citocinas: TGF- β , PDGF, TNF- α , etc. De manera que la formación del tejido probablemente depende, no solo de las células, factores y enzimas presentes, sino del entorno de la matriz extracelular y la presencia de receptores específicos para los factores y las

proteínas de la MEC. Donde el control de esta interacción y retroalimentación tan compleja entre las células-citocinas-enzimas y matriz se denomina reciprocidad dinámica.

Otro aspecto notable durante la remodelación del área dañada, es la consideración que los sustratos provisionales depositados durante la formación del tejido de granulación proporcionan soporte e información para la siguiente fase, ya que es claro que la mayoría, si no es que todos los componentes de la MEC pueden regular la función celular a través de receptores de membrana específicos, como son las integrinas. Entonces, la fibronectina presente en el tejido de granulación funciona como un sustrato provisional para la migración e infiltración de células, soporte para los fibroblastos que realizan la contracción (Ehrlich y Krummel, 1996) y como nicho para la fibrillogénesis de la colágena. Las grandes cantidades de ácido hialurónico fuertemente hidratado, permiten la migración de células del parénquima, mientras que la formación temprana de fibrillas de colágena tipo I, III y V genera la fuerza de tensión de la herida. Así que cuando la matriz madura en las semanas siguientes, la fibronectina y el ácido hialurónico disminuyen significativamente, los haces de colágena aumentan de tamaño y grosor, lo que incrementa la fuerza de tensión de la cicatriz, y se depositan proteoglicanos que incrementan la resistencia a la deformación local.

En cuanto al infiltrado celular local en el sitio de la cicatriz, las células endoteliales son las primeras en experimentar apoptosis, seguidas de los miofibroblastos y otras células hasta alcanzar una cicatriz prácticamente acelular, misma que durante los siguientes meses aún presentará cambios continuos (Clark, 1995).

Otra fase muy importante en la remodelación de la matriz, es la necesidad de eliminar el exceso de material depositado, ya que aún cuando existe una gran cantidad de factores que regulan la síntesis y depósito de éste por los fibroblastos y miofibroblastos, siempre se requiere de un recambio intenso para que el sitio dañado permanezca como una fibrosis mínima suficiente y necesaria que permita la

funcionalidad del tejido. Lo anterior se logra a través de enzimas, sus activadores e inhibidores, que delimitan la zona reparada; algunas de las mejor descritas son la metaloproteasas.

LAS METALOPROTEASAS Y SUS INHIBIDORES.

La familia de las metaloproteasas contiene al menos doce miembros genéticamente diferentes: dos colagenasas intersticiales, las cuales degradan a las colágenas tipo I, II y III, tres estromelisininas con actividad sobre las colágenas con triple hélice interrumpida y otras proteínas no colagénicas. También se encuentran las colagenasas tipo IV o gelatinasas, que degradan específicamente a la colágena tipo IV, a la colágena desnaturalizada o gelatina (Reponen et al., 1994, Quantin et al., 1989). Todas ellas son secretadas como zimógenos o proformas inactivas y son bloqueadas, en proporción estequiométrica, por inhibidores específicos del tejido, los TIMP. Cuando una colagenasa se manifiesta en forma activa es porque su secreción es mayor que la de los TIMP, por activación de mecanismos que estimulen su sobreproducción, como cuando existe la activación específica de la células por citocinas (Seltzer et al., 1994), o por el estímulo de activadores biológicos.

Una de las citocinas con capacidad importante para regular la transcripción de varios de los genes que participan en el recambio de la MEC es el TGF- β (Numaguchi et al., 1994); y su capacidad es tal que aún cuando varios factores, incluyendo al FGF, induzcan la síntesis de las metaloproteasas, el TGF- β puede bloquear la expresión del gen. Más aún, el TGF- β es capaz de estimular la producción de los TIMP y su estimulación puede potenciarse a través del FGF (Rizzino, 1988). Particularmente, el TGF- β 1 tiene efectos directos sobre la expresión de las colagenasas, donde alcanza una máxima estimulación de la colagenasa tipo IV, en sus dos tipos, la de 72 kD y la de 92 kD en los fibroblastos de la encía, al incrementar 1.2 veces la actividad basal, mientras que en los queratinocitos humanos, derivados de la mucosa

y de la piel, ambas enzimas se incrementan de 2 a 3, y 5 veces, respectivamente. Sin embargo, el TGF- β 1 no muestra efecto en las líneas derivadas de la mucosa de la rata, lo que puede deberse a una característica específica de la regulación del factor en la especie o bien, estar relacionada con los diferentes fenotipos de las células murinas (Salo et al., 1991). Lo anterior refleja el papel multifuncional del TGF- β , ya que en algunos sistemas estimula la producción de las colagenasas y en otros la bloquea.

Por su parte, la IL-1 α y la β también estimulan la síntesis de las colagenasas y de los TIMP con una potencia similar entre las dos isoformas (Postlethwaite et al., 1988). Otra de las citocinas con actividad reguladora en la degradación de la colágena es la IL-6. Esta citocina fue descrita inicialmente como el IFN β -2, y es una glicoproteína de 23 a 32 kD, producida por las células T y las B, los macrófagos, los fibroblastos, las células endoteliales, las mesangiales, etc. Tiene efecto inductor en la proliferación de linfocitos T y B; sin embargo, en la mayoría de los casos requiere de un estímulo adicional para lograr el efecto, como puede ser el que aportan otras citocinas como la IL-2 y la IL-4 (Alvaro-Gracia, 1992). Su actividad sobre el recambio de la colágena se debe al efecto positivo que presenta sobre su síntesis y la inhibición de los TIMP por los fibroblastos, lo que le da un papel importante en padecimientos fibrosantes como la esclerodermia (Postlethwaite, 1993). En otros sistemas, como los cultivos de las células sinoviales, las endoteliales y en los fibroblastos mismos, la IL-6 incrementa la producción de los TIMP, lo cual conlleva al desequilibrio de la relación metaloproteasas/TIMP, opuesto a lo que ocurre con la IL-1 (Shingu et al., 1993). Pero todos estos reportes son parte de la controversia existente acerca de la modulación de la síntesis de la colagenasa y los TIMP, ya que también existen reportes que indican que la IL-6 sola o en combinación con la IL-1, no tienen ningún efecto sobre la producción de la colagenasa intersticial, la estromelisinina y los TIMP en fibroblastos dérmicos humanos; donde la confirmación se llevó a nivel transcripcional,

mientras que en otros estudios solamente se observó a la proteína. Las diferencias en los resultados mencionados pueden explicarse por la variación en la línea celular, el origen de la preparación del reactivo (IL-6) o variaciones en las condiciones experimentales, como la dosis empleada por ejemplo (Emonard et al., 1992).

La IL-10 por su parte, también regula la actividad de la colagenasa y la estromelisin en cultivos de fibroblastos, donde los niveles de los ARNm para estas MMPs se incrementan por el tratamiento con la citocina, mientras que no tiene ningún efecto sobre la expresión génica de los TIMP. Cabe señalar que los resultados obtenidos en el estudio sugieren que la regulación en el incremento del transcrito para las metaloproteasas, se debe a una regulación a nivel postranscripcional. Lo anterior podría justificarse porque el gen que codifica para la colagenasa, contiene varias secuencias ricas en AU, que pueden estar implicadas en la regulación de mecanismos postranscripcionales, dado que se ha sugerido que esas secuencias estabilizan al ARNm y evitan su degradación (Reitamo et al., 1994).

Otro factor, el de crecimiento epidérmico, incrementa de manera coordinada los mensajeros para la procólagenasa tisular, la proestromelisin y los TIMP. Lo anterior es dependiente del estado de la confluencia de las células y el depósito de su propia MEC. Este efecto estimulador ocurre rápidamente y la regulación podría operar, al menos para la colagenasa, a nivel transcripcional. Esta respuesta es consistente con la estimulación mediada por los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun*, dado que su expresión se induce por el EGF y algunos otros factores (Colige et al., 1992).

El FGF, si bien es un factor que estimula la proliferación de los fibroblastos, así como la angiogénesis, también incrementa la producción de la gelatinasa de 72 kD en las células metastásicas HRCC KG-2, junto con el TGF- β y otros. Por su parte, el TNF- α incrementa la producción de la gelatinasa de 92 kD en las células de fibrosarcoma, pero disminuye la de 72 kD. Otro factor más, el INF- γ , suprime la biosíntesis inducida por lipopolisacáridos, de la

colagenasa intersticial y la estromelisin en los macrófagos alveolares del pulmón. Además, en las células humanas del carcinoma de colon, el IFN- β disminuye la producción de la gelatinasa de 72 kD y en consecuencia, reduce la destrucción de la colágena tipo IV. En conclusión, los IFN no regulan la producción de la gelatinasa de 72 kD en los fibroblastos humanos normales, lo que sugiere que su actividad sobre esta metaloproteasa pueda ser específica de ciertos tipos celulares, particularmente de las líneas tumorales (Gohji et al., 1994). Finalmente, un miembro de la superfamilia de las quimiocinas, la GRO α , es un potente inductor de los TIMP en los fibroblastos de la sinovia, lo que ha llevado a considerarla, junto con la IL-6, entre los procesos de inflamación crónica, como en la artritis reumatoide (Hogan et al., 1994).

Lo anterior describe la idea clásica de la enzima o el inhibidor que son regulados por factores solubles; sin embargo, Kikuchi y cols., demostraron que el TIMP-1 puede comportarse por sí mismo como factor de crecimiento en fibroblastos de escleroderma, ya que el inhibidor tiene efecto mitogénico sobre estas células (Kikuchi et al., 1997). Esto permite incorporar al TIMP-1 entre las moléculas con actividad reguladora de las células y su participación dual, como inhibidor enzimático y como fibroproliferador, lo que conduce directamente a la síntesis y depósito de proteínas de la matriz (ver figura 2).

Con base en lo anterior, podemos concluir que el proceso de cicatrización depende de una gran cantidad de factores fisiológicos que interactúan durante y después del daño (figura 3). Sin embargo, existen factores mecánicos importantes que dictan la intensidad con la que actuará la fisiología, es decir, si la lesión es incisional, escisional, el tamaño y la profundidad de ésta. Por ejemplo, una herida incisional, cerrada quirúrgicamente por sutura presenta en la primera semana una resistencia de solamente el 3%, mientras que la resistencia final de una cicatriz de este tipo ya es equivalente al 80% de la observada en la piel intacta. La disminución en la resistencia a la tensión de la cicatriz es el

resultado de una desorganización fibrilar de la colágena, cuyo soporte es adecuado al centro de la secuela, pero débil en la frontera con el tejido no dañado. Por otro lado, el grosor de las fibras de colágena en la cicatriz es de un diámetro menor cuando se comparan con aquellas en la piel normal. Además que en la cicatriz las fibras tienden a organizarse paralelas a la superficie de la piel, mientras que en la piel normal el arreglo es reticular (Ehrlich y Krummel, 1996).

Ahora bien, el manejo terapéutico de una herida incisional es mucho más simple que una escisional, debido a que la primera permite afrontar los bordes y por lo tanto las fases de reparación requieren de un tiempo menor. La herida escisional por lo contrario, carece de un fragmento del tejido lo que hace más largo el periodo de reparación, que no modifica cualitativa-, aunque sí cuantitativamente a los componentes del proceso, el cual requerirá de mayor tiempo.

Las heridas escisionales implican mayor depósito de tejido conjuntivo, reepitelización para cubrir el defecto y contracción que reduzca el volumen de tejido cicatrizal necesario para cubrir el espacio dañado. En este tipo de lesión

no se observa reepitelización durante la fase de granulación, aunque sí se presenta una gran densidad de fibroblastos y MEC inmadura. Sin embargo, si el tejido conserva algunos anexos cutáneos, entonces se manifiesta una reepitelización relativamente rápida, debido a que los queratinocitos de éstos pueden migrar a la superficie y generar focos de epitelización. Pero si el daño fue tan intenso que no existen dichos anexos, entonces la reepitelización comenzará por los bordes y llevará un periodo considerablemente largo (Ehrlich y Krummel, 1996). El retraso en el cierre de una lesión incrementa el infiltrado inflamatorio, lo que conduce el proceso con una mayor cantidad de componentes celulares y solubles que sobrestimulan a los fibroblastos y miofibroblastos locales para generar un depósito de matriz significativamente mayor a lo normal y deriva en un proceso fibroso.

Las causas para la formación de una secuela fibrosa o cicatriz patológica pueden ser varias. Como se mencionó, la extensión del daño es un factor que promueve la inflamación crónica

Tabla II

CICATRIZACIÓN ANORMAL

CICATRIZ HIPERTRÓFICA

- La secuela permanece en el borde de la herida.
- Causa de un proceso inflamatorio recurrente.
- Puede resolverse espontáneamente en periodos menores a un año.

CICATRIZ QUELOIDE

- La secuela no respeta el borde de la herida.
- Causa de un proceso inflamatorio recurrente con trasfondo genético.
- No se resuelve espontáneamente.
- Presenta niveles elevados de testosterona y sus receptores
- Probable mosaico celular.

(Morris et al., 1997). Pero además si la lesión cursa con hipoxia o infección o presencia de un cuerpo extraño o si se generó en contra de la líneas de tensión de la piel, entonces se presenta una dehiscencia y el daño tendrá que cerrar de segunda intención lo que también promueve la inflamación crónica y conduce a la patología conocida como cicatriz hipertrófica. Más aún, si el paciente presenta cierta predisposición a exacerbar el depósito de matriz, también se deriva una patología similar a la anterior conocida como cicatrización queloide, donde la diferencia con la cicatriz hipertrófica reside en algunas de sus características morfológicas y bioquímicas (McPherson y Piez, 1988, Rockwell et al., 1989, Thomas et al., 1994, Schierle et al., 1997) (ver tabla II).

En la cicatriz hipertrófica, donde se presenta un infiltrado inflamatorio abundante, se encuentran sobreexpresadas en el endotelio y en algunas células extravasculares, moléculas de adhesión celular (MAC), como son la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) (Castagnoli et al., 1993 y 1994), la moléculas de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión de los leucocitos al endotelio 1 (ELAM-1) (Krötzsch-Gómez et al., 1998), lo que permite la extravasación o diapedesis de más células inflamatorias y la subsecuente liberación de citocinas proinflamatorias y fibrogénicas que conducen al depósito continuo de componentes de la MEC, produciendo un desequilibrio en su recambio (Kovacs, 1991). Además, los niveles de esas citocinas son consistentes con un infiltrado celular que consta de fibroblastos, queratinocitos, macrófagos y linfocitos T; todos ellos liberando una gran variedad de citocinas que incrementan a su vez los receptores para más factores solubles, así como la proliferación, la quimiotaxis, etc. Como ya se mencionó, varios de estos factores participan en los

procesos de reparación normal. Sin embargo, algunos de ellos se han identificado en proporciones elevadas en la cicatriz hipertrófica, con respecto a la piel normal o la cicatriz normal (Ghahary et al., 1995, Krötzsch-Gómez et al., 1998).

Lo anterior ha llevado desde hace tiempo a enfocar parte de la investigación en salud en el mejoramiento de los procesos de reparación, evitar la formación de secuelas fibrosas y la resolución de patologías fibrosantes dérmicas como la cicatriz hipertrófica y queloide. Donde se han probado terapias tan variadas como la información que existe acerca de las patologías. Estas estrategias comprenden terapias físicas como la cirugía, la radiación y la presión; terapias químicas como ácidos corrosivos y soluciones fijadoras (formalina) y terapias farmacológicas como la administración de corticoides (Darzi y Chowdri, 1992, Lawrence, 1991, Ahn et al., 1991, Soderberg et al., 1982, Tang, 1992). Otras alternativas en el tratamiento de la cicatriz hipertrófica han sido los bloqueadores de la síntesis de colágena (Rosenbloom et al., 1986, ^a y ^b Kawaguchi et al., 1992); sin embargo, esos compuestos carecen de especificidad y pueden afectar el metabolismo de otros tejidos.

Así que todas estas terapias y las combinaciones de algunas de ellas, han sido empleadas por los clínicos para tratar de resolver la cicatrización hipertrófica e incluso la queloide. Desafortunadamente, no ha habido un éxito total, ya que la mayoría de los tratamientos resultan incómodos, con efectos colaterales adversos o caros, lo que deja un campo amplio para la investigación de nuevas estrategias terapéuticas que inclusive se puedan extrapolar a otros tipos de patologías fibrosantes, pues el componente predominante de tales procesos es la presencia de un infiltrado inflamatorio crónico.

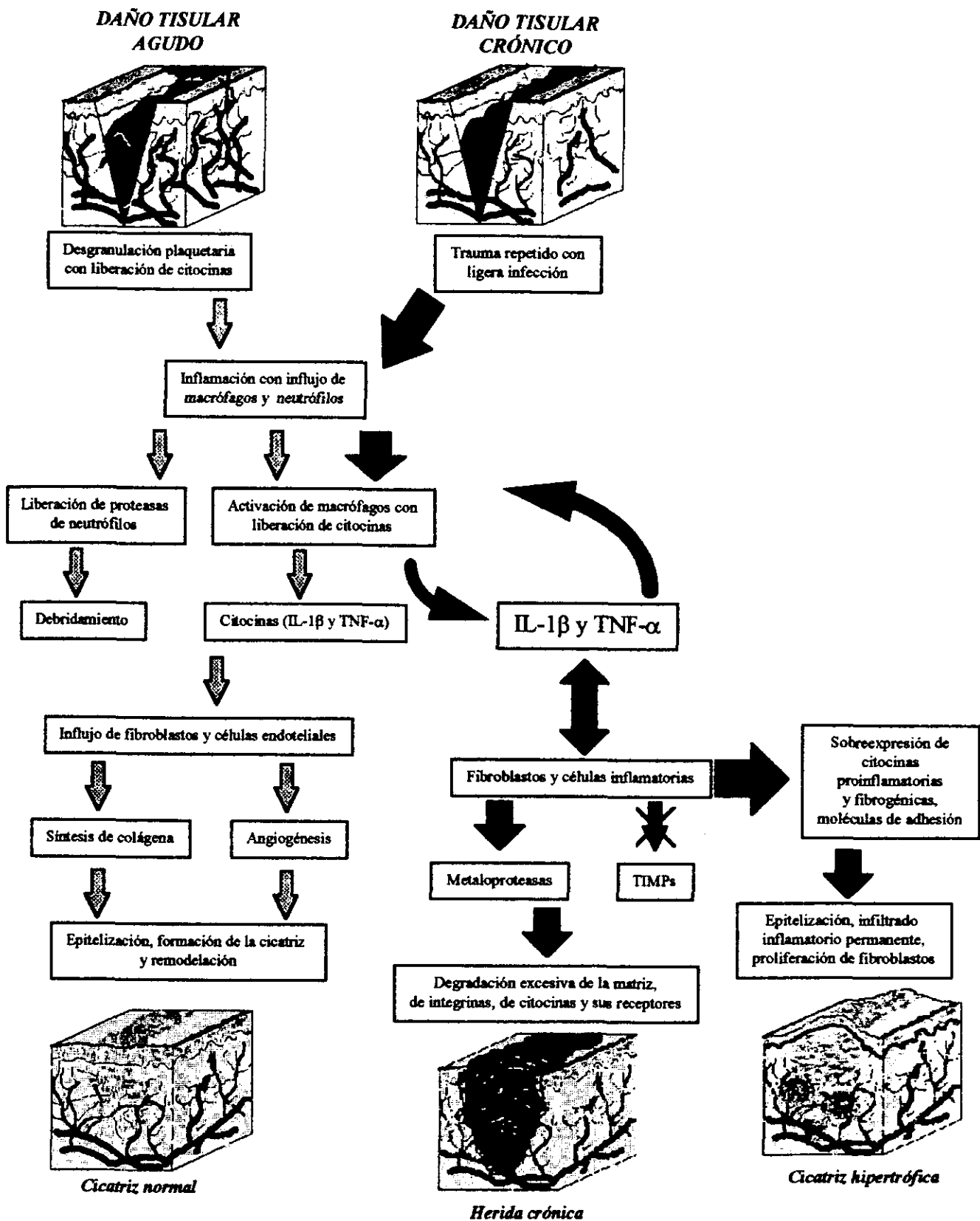


Figura 3. Proceso de cicatrización normal, patológica y sus secuelas (modificado de Mast y Schultz, 1996).

IV. ANTECEDENTES

Desde hace algún tiempo, nuestro grupo ha trabajado en la evaluación de un fármaco biológico llamado Fibroquel^{MR}, formado por la mezcla γ -irradiada de polivinilpirrolidona de bajo peso molecular y colágena porcina tipo I pepsinizada (colágena-pvp). Este biofármaco ha mostrado tener efectos positivos cuando se administra en heridas incisionales en rata (Kröttsch-Gómez et al., 1993), en humanos (manuscrito en preparación), en fracturas murinas (Almazán Díaz et al., 1996, Chimal-Monroy et al., 1998) y en la resolución de patologías fibrosantes en piel humana, como es el caso de esclerodermia y esclerosis generalizada progresiva (Barile et al., 1998), fibrosis tendinosa en humanos (Ruiz-Lozano y Hernández, observaciones no publicadas), y también en el proceso inflamatorio y el recambio de la matriz en explantes de sinovia de pacientes con artritis reumatoide (Furuzawa-Carballeda et al., 1999).

Asimismo, el compuesto ha tenido efectos benéficos notables cuando se administra intralesionalmente en cicatrices hipertróficas y queloides; donde el tratamiento elimina los síntomas asociados, como el prurito y el dolor; además de disminuir el infiltrado inflamatorio, mejorar la arquitectura del tejido y permitir el aplanamiento de la cicatriz hasta alcanzar el borde normal de la piel (Díaz de León et al., 1994). La mejoría clínica y morfológica que se alcanza después del tratamiento con la colágena-pvp, se asocia a la regulación negativa

de citocinas como la IL-1 β , el TNF- α , el PDGF y moléculas de adhesión como ELAM-1, que presentan valores locales semejantes a los de la piel normal (Kröttsch-Gómez et al., 1998).

Por otro lado, algunos ensayos *in vitro* reflejaron que la colágena-pvp incrementa la síntesis de colágena y disminuye la actividad colagenolítica en fibroblastos de rata, mientras que incrementan la actividad colagenolítica en una línea de macrófagos de ratón. Estos efectos son atribuibles únicamente al biofármaco, ya que sus componentes por separado, la colágena y la polivinilpirrolidona, manifestaron actividades nulas o diferentes en los mismos sistemas. Además, pudimos observar efectos cooperativos sobre el metabolismo de la colágena, cuando se incubaron fibroblastos en presencia de los sobrenadantes de cultivo de macrófagos incubados previamente con colágena-pvp y *viceversa* (Kröttsch-Gómez, 1995).

Finalmente, al considerar la bioseguridad del medicamento, hemos podido constatar por ensayos toxicológicos agudos, evaluaciones séricas agudas y crónicas (Castillo-Rodríguez et al., observaciones no publicadas), parámetros hematológicos y hepáticos agudos y ensayos de genotoxicidad por electroforesis unicelular (Furuzawa-Carballeda y Rojas, observaciones no publicadas) que la administración de la colágena-pvp no induce efectos colaterales adversos, al menos en las patologías probadas, incluso en el tratamiento a largo plazo en voluntarios (18 años de tratamiento con al menos 4 ml distribuidos en 3 aplicaciones anuales).

V. HIPÓTESIS

La modulación autócrina por algunas citocinas proinflamatorias a través de la colágena-polivinilpirrolidona, lleva a los fibroblastos humanos derivados de cicatriz hipertrófica, a acelerar el recambio de algunos componentes de la MEC sobreexpresados en dicha patología. Más aún, esta modulación permite a los fibroblastos regular a su vez otros tipos celulares que participan en el proceso inflamatorio crónico asociado a la cicatrización hipertrófica, lo que se refleja como la normalización del proceso cicatrizal.

VI. OBJETIVO

En este trabajo pretendemos contribuir con información acerca del recambio de la colágena y la expresión bioquímica de los GAGs y algunas citocinas proinflamatorias y fibrogénicas en fibroblastos humanos derivados de piel normal, cicatriz hipertrófica y cicatriz hipertrófica tratada con colágena-pvp hasta su resolución clínica. Además de observar el efecto que tiene directamente la colágena-pvp sobre los parámetros metabólicos mencionados en esos cultivos de fibroblastos.

V. HIPÓTESIS

La modulación autócrina por algunas citocinas proinflamatorias a través de la colágena-polivinilpirrolidona, lleva a los fibroblastos humanos derivados de cicatriz hipertrófica, a acelerar el recambio de algunos componentes de la MEC sobreexpresados en dicha patología. Más aún, esta modulación permite a los fibroblastos regular a su vez otros tipos celulares que participan en el proceso inflamatorio crónico asociado a la cicatrización hipertrófica, lo que se refleja como la normalización del proceso cicatrizal.

VI. OBJETIVO

En este trabajo pretendemos contribuir con información acerca del recambio de la colágena y la expresión bioquímica de los GAGs y algunas citocinas proinflamatorias y fibrogénicas en fibroblastos humanos derivados de piel normal, cicatriz hipertrófica y cicatriz hipertrófica tratada con colágena-pvp hasta su resolución clínica. Además de observar el efecto que tiene directamente la colágena-pvp sobre los parámetros metabólicos mencionados en esos cultivos de fibroblastos.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico. Las biopsias se obtuvieron durante cirugía plástica y con el consentimiento correspondiente. Dos fueron de piel normal de individuos femeninos de 11 y 29 años, 1 de un paciente masculino de 8 años con cicatriz hipertrófica de 3 años de evolución y 2 de pacientes (masculino y femenino) con cicatriz hipertrófica de 1 y 5 años de evolución, respectivamente, tratados hasta resolución de la cicatriz con administraciones intralesionales de colágena-pvp en dosis de 0.2 ml por semana cuando la cicatriz medía menos de 5 cm en su longitud máxima, 0.4 ml por semana si la longitud era de 5 a 10 cm y 0.6 ml por semana si la longitud máxima era mayor a 10 cm. El periodo de tratamiento fue de 1 a 3 meses y se consideró resuelta la lesión cuando clínicamente se habían eliminado los signos y síntomas, además de haber alcanzado el borde normal de la piel. Cabe señalar que las administraciones mayores a 0.2 ml siempre se realizaron distribuyendo la dosis en aplicaciones de 0.2 ml en varios sitios de la cicatriz para evitar isquemia por la aplicación.

Las muestras se trasladaron inmersas en medio Dulbecco-Eagle Modificado (D-MEM con glutamina y alta concentración de glucosa) complementado con 10% de suero de bovino fetal inactivado a 56 °C por 30 minutos (SBF) y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 5 µg/ml de estreptomocina).

Cultivos celulares. Los cultivos de fibroblastos de piel normal, cicatriz hipertrófica y cicatriz hipertrófica tratada y resuelta, se generaron de la biopsia lavada tres veces con D-MEM con antibióticos. El tejido se transfirió a una solución de colagenasa bacteriana tipo II (SIGMA) al 0.25% en solución de Hank, 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 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 flotantes 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 10% 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. Cuando 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 a los pases cuarto a sexto, que fueron utilizadas para los experimentos metabólicos.

Condiciones experimentales en los cultivos. Las líneas de fibroblastos fueron sembradas a subconfluencia en placas de 24 pozos (2 cm² c/u) con 5 x 10⁴ células/cm², con 1 ml de D-MEM 10% SBF, y 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 colágena tipo I (Pentapharm) en concentraciones de 1, 5 y 10% en D-MEM, con respecto a su contenido en la fórmula de colágena-pvp, y 500 µl de colágena-pvp en concentraciones de 1, 5 y 10% en D-MEM, los cultivos se incubaron por 18 h, después de las cuales se realizaron las evaluaciones.

Cabe señalar que antes de aplicarse al cultivo, tanto la colágena como la colágena-pvp se dializaron contra ácido acético 5mM por 24

horas a 4°C, habiendo corregido la concentración de cada compuesto por la cuantificación de hidroxiprolina. Además, todas las determinaciones se normalizaron con base en el contenido de ADN de las muestras y se probaron al menos por triplicado, excepto para los ensayos de citocinas, donde la evaluación fue por duplicado.

Cuantificación de ADN. Para realizar la normalización de las determinaciones bioquímicas se analizó la cantidad de ADN en cada una de las líneas celulares, así como en cada una de las condiciones probadas. La técnica utilizada para ello fue la descrita por Labarca y Paigen (Labarca y Paigen, 1980). Básicamente, se homogenizó la monocapa (MC) y el sobrenadante (SN) del cultivo por 20 segundos al 40 % de la potencia de un sonicador (Sonic dismembrator" modelo 50, Fischer Scientific), de ahí se tomaron 400 µl y se mezclaron con 3.6 ml de un amortiguador de fosfatos 0.05 M con NaCl 2.0 M, pH 7.4, que contenía 0.1 µg/ml finales del reactivo Hoechst 33258. La mezcla se leyó en un fluorómetro (Perkin-Elmer) con longitud de onda para excitación igual a 360 nm y 460 para emisión, de donde se obtuvieron los valores que se intrapolaron posteriormente de una curva estándar de ADN con valores entre 0 y 1000 ng/ml de ADN. La técnica mencionada se basa en la unión del reactivo de Hoechst con el ADN, y no requiere que éste se encuentre como doble cadena; además, la sensibilidad del ensayo es de 60 ng/ml del ADN.

Incorporación de timidina [³H]. La cuantificación de la timidina incorporada se llevó a cabo con la técnica de Miki y cols. (Miki et al., 1987). Para las muestras de incorporación de timidina [³H] se adicionó 1 µCi 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 periodo se eliminó el medio y los pozos fueron lavados tres veces con PBS y después se fijaron con 300 µl 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 NaOH 1 M y se agitaron vigorosamente hasta obtener la disolución total; de esta solución se tomaron alícuotas de 50 µl para determinación de radioactividad en un contador de centelleo (Beckmann)

Incorporación de prolina [¹⁴C]. La cuantificación de la incorporación de la prolina se llevó a cabo con una modificación a la técnica de Diegelmann y cols. (Diegelmann, et al., 1990, Chojkier et al., 1980, Peterkofsky y Diegelmann, 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. Los homogenizados de MC y 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 490 µl de un amortiguador HEPES 0.2 M, CaCl₂ 0.5 mM, NEM 2.5 mM, pH 7.2 y se adicionaron 10 µl (5 µg) 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 con TCA y L-Pro 10 mM a una concentración final del 10% y se centrifugó a 13,600 x g por 10 minutos. Del SN se tomaron los primeros 50 µl y se depositaron en un vial, el resto del SN se eliminó y el botón se resuspendió en 500 µl de TCA 5% y L-Pro 1 mM y se centrifugó nuevamente como antes. De este SN se tomaron los segundos 50 µl y se mezclaron con los anteriores. Al vial que contenía 100 µl de muestra se le adicionaron 2.5 ml de líquido de Bray para determinación de

radioactividad de las proteínas degradadas por colagenasa (PDC). El sobrenadante que restaba se eliminó y el botón se resuspendió en 500 μ l de un amortiguador Tris 0.1 M, dodecil sulfato de sodio 0.5%, ditiotreitól 5 mM, pH 7.4; de esta solución se tomaron 100 μ l y se mezclaron con líquido de Bray para determinación de radioactividad de las proteínas no degradadas por colagenasa (PNDC). Las cuentas por minuto (cpm) para PDC y PNDC se obtuvieron por evaluación de los viales en un contador de centelleo modelo LS 1801 (Beckman) y fueron corregidas por los volúmenes totales. Los datos resultantes se calcularon por medio de la ecuación de Diegelmann y Peterkofsky para conocer la cantidad relativa de colágena (Diegelmann y Peterkofsky, 1972).

Cuantificación de la actividad colagenolítica. Para cuantificar la actividad colagenolítica se siguió la técnica de Murawaki y cols. (Murawaki, 1990) con algunas modificaciones. A las placas de 24 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 acetilfenilmercurico (APMA) 5 mM (SIGMA), CaCl_2 25 mM, pH 7.4 y 10 μ l de colágena [^3H] con una actividad específica de 4,000 cpm/ μ l (Amersham). A los tubos para blanco se les adicionó lo mismo excepto por el amortiguador, que 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. La colágena radioactiva de las muestras y sus blancos fue precipitada por la adición de 500 μ l de dioxano y posterior centrifugación a 9,000 x g, 15 minutos a 4 °C.

Del SN se tomaron alicuotas de 500 μ l y se mezclaron con 2.5 ml de líquido de Bray; finalmente la evaluación de radioactividad se realizó en un contador de centelleo.

Cuantificación de glicosaminoglicanos. La cuantificación de GAGs se realizó en los homogenados de MC y SN de los diferentes cultivos de fibroblastos. Para ello se utilizó el sistema de placas de 24 pozos como se describe anteriormente, incorporando 30 μ Ci de glucosamina [^3H] (New England), 50 μ g/ml de ácido ascórbico por pozo junto con las condiciones de prueba y se incubaron por 18 horas. Después de este periodo se adicionaron 500 μ l de agua destilada a cada pozo, se sonicó el homogenado y se trató cada muestra por separado con 10 mg/ml de Pronasa, por 24 horas a 48 °C, procedimiento que se repitió al día siguiente con Pronasa fresca. Después del segundo periodo de tratamiento con la mezcla enzimática, los homogenados se precipitaron por 1 h a 4 °C con TCA, para llegar a una concentración final del 15%. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13,000 x g, 15 min a 4 °C. Los SN del centrifugado, se mezclaron con 20 μ g de cada uno de los siguientes GAGs: condroitin 4 y 6-sulfato, ácido hialurónico y heparina. A esta solución se le adicionaron 3 volúmenes iguales de 1.4 % de acetato de potasio (AcOK) en EtOH abs, por 24 h a -20 °C. La suspensión se centrifugó a 100,000 x g, 1 h a 4 °C y el botón se resuspendió en 300 μ l de agua destilada, para después volverse a precipitar con 3 volúmenes de AcOK como antes. La suspensión se centrifugó a 13,000 x g, 30 min a 4 °C y se lavó dos veces. Finalmente, los botones se resuspendieron en 1.0 ml de agua destilada y de ahí se tomaron 100 μ l para su determinación de radioactividad en solución de Bray (Kao et al., 1990).

Cuantificación de TIMP-1. Se determinó la concentración de TIMP-1 en 100 μ l de sobrenadante del cultivo por medio de un inmunoensayo de tipo ELISA ("sandwich", Amersham) que identifica tanto al inhibidor libre

como el unido a la proMMP-9 o las formas activas de las MMP-1, 2, 3 y 9.

Cuantificación de citocinas. Para conocer la concentración de IL-1 β , TNF- α , PDGF-AB y TGF- β 1 en los SN de los cultivos de fibroblastos, se tomaron 200 μ l del SN y se procesaron por medio de un ensayo inmunoenzimático de tipo ELISA ("sandwich") de acuerdo con las instrucciones del fabricante del sistema (R&D Systems). Estas determinaciones identifican al factor cuando éste es captado por el receptor correspondiente que se encuentra adherido a la placa. Es importante señalar que la determinación del TGF- β 1 se puede considerar específica ya que los reactivos identifican solamente a este factor y no al TGF- β 2 o 3. Por otro lado, el sistema determina al

TGF- β 1 activo, por lo que fue necesario tratar a los sobrenadantes con HCl 1 N para la activación del factor que se encontrase como proforma, así que nuestra determinación fue del factor total.

Procesamiento estadístico de los datos. Las diferencias entre los grupos de variables cuantificables se determinaron por la prueba *t* de Student y U de Mann-Whitney.

VIII. RESULTADOS

Las evaluaciones bioquímicas realizadas a las líneas de fibroblastos derivadas de piel normal, cicatriz hipertrófica y cicatriz hipertrófica tratada con colágena-pvp y resuelta clínicamente, tuvieron el objeto de comparar el metabolismo celular entre estos grupos. Sin embargo, también era importante conocer cómo se comportaba cada uno de los grupos en presencia de colágena o colágena-pvp, ya que ello nos podría sugerir si la regulación del fibroblasto era autócrina, así como su correlación por la comparación de los fibroblastos de cicatriz tratada cultivados en condiciones basales, con los fibroblastos de cicatriz hipertrófica tratados *in vitro* con colágena-pvp.

Proliferación celular. Esta evaluación se realizó a través de un ensayo de incorporación de timidina radioactiva en cultivos de fibroblastos previamente sincronizados en fase Go. La determinación se realizó por

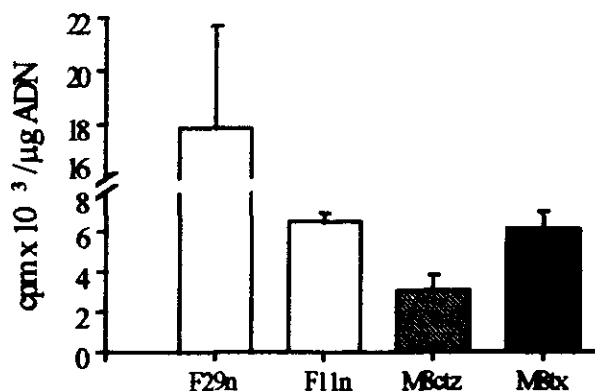


Figura 4. Evaluación de la proliferación de fibroblastos cultivados en D-MEM a través de la incorporación de ³H Timidina. Las barras indican el promedio \pm DE. F = femenino, M = masculino, n = normal, ctz = cicatriz hipertrófica y tx = cicatriz hipertrófica tratada *in vivo* con colágena-pvp y resuelta clínicamente.

cuadruplicado en dos líneas de fibroblastos derivados de piel normal, una de cicatriz hipertrófica y una de cicatriz hipertrófica tratada con colágena-pvp.

Como se mencionó previamente, primero se comparó la proliferación entre las diferentes líneas celulares (Figura 4). Los fibroblastos de cicatriz hipertrófica (M8ctz) incorporaron la mitad de timidina que los de piel normal (F11n) y los de cicatriz tratada con colágena-pvp (M8tx); estas diferencias fueron estadísticamente significativas con una $p < 0.001$. Por su parte, los cultivos de fibroblastos de piel normal mostraron diferencias entre las dos líneas cultivadas, ya que los derivados de un paciente femenino con 29 años de edad (F29n) incorporaron dos veces más timidina que los de una de 11 años, F11n; donde estas variaciones podrían deberse a la diferencia en las edades de las pacientes. Finalmente, los fibroblastos de cicatriz tratada y resuelta, M8tx, mostraron niveles similares a los de piel normal, F11n, lo que correlaciona con la hipótesis de la edad.

Una vez ubicadas las diferencias basales entre las diferentes líneas celulares, evaluamos la incorporación de timidina en cada uno de los cultivos, pero ahora tratados por 18 horas con 1% de colágena o colágena-pvp a diferentes concentraciones, 1,5 y 10%. Los resultados se expresan en la tabla III, donde se puede observar que en todos los casos la administración de 1% de colágena al medio de cultivo llevó a una disminución estadísticamente significativa en la incorporación del nucleósido en todos los grupos, F11n, F29n, M8ctz y M8tx. Sin embargo, en los fibroblastos de cicatriz tratada, M8tx, al incubarlos en presencia de diferentes concentraciones de colágena-pvp se observó un incremento alrededor del 60% con respecto al control sin suero, y estas diferencias también fueron estadísticamente significativas.

Tabla III

PROLIFERACIÓN CELULAR

	F29n	F11n	M8ctz	M8tx
Clg 1%	60.1* ± 8.5	61.3* ± 2.3	52.7* ± 24.6	73.0* ± 15.6
Clg-pvp 1%	118.9 ± 27.5	98.8 ± 20.5	90.3* ± 29.2	164.2* ± 28.2
Clg-pvp 5%	54.9* ± 11.5	58.7* ± 13.9	41.8* ± 5.9	154.1* ± 11.2
Clg-pvp 10%	54.4* ± 11.4	54.0* ± 9.6	65.0* ± 20.8	168.1* ± 24.7

Evaluación de la proliferación de fibroblastos, los datos representan el porcentaje promedio de cuadruplicados con respecto al control de cada donador (MEM sin SBF) ± la desviación estándar. F = femenino, M = masculino, n = normal, ctz = cicatriz hipertrófica y tx = cicatriz hipertrófica tratada *in vivo* con colágena-pvp y resuelta clínicamente. * $p < 0.05$ para el tratamiento indicado vs. el control.

Síntesis de colágena. La síntesis de colágena se reportó como el porcentaje relativo de colágena en los homogenados de monocapa y sobrenadante de los cultivos de fibroblastos. La determinación adquiere especificidad al distinguir durante el ensayo la prolina incorporada en las proteínas degradadas por colagenasa y las no degradadas por esta enzima. Para este ensayo, se evaluaron 2 líneas de piel normal, F11n y F29n, una de cicatriz hipertrófica, M8ctz y dos de cicatriz hipertrófica tratada y resuelta, M8tx y F28tx. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas líneas celulares (Figura 5).

Por otro lado, en la evaluación de la síntesis de colágena en tres de las líneas celulares, normal, Ctzh y cicatriz tratada, se observó que la concentración del 10% de colágena-pvp disminuyó la producción de la proteína en todos los casos, siendo incluso estadísticamente significativa para los fibroblastos de cicatriz tratada, mientras que la presencia de colágena al 1% no modificó la actividad metabólica en ningún caso.

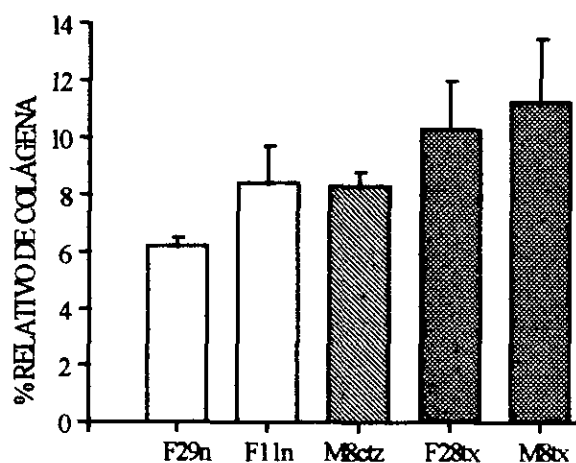


Figura 5. Síntesis de colágena por fibroblastos cultivados en D-MEM a través de la incorporación de ^{14}C Prolina. Las barras indican el promedio ± DE. F = femenino, M = masculino, n = normal, ctz = cicatriz hipertrófica y tx = cicatriz hipertrófica tratada *in vivo* con colágena-pvp y resuelta clínicamente.

Tabla IV

SÍNTESIS DE COLÁGENA

	F11n		M8ctz		M8tx	
Clg 1%	104.8	± 2.4	114.5	± 32.5	85.0	± 8.8
Clg-pvp 1%	88.1	± 6.0	98.8	± 3.6	91.2	± 14.2
Clg-pvp 5%	79.8	± 14.3	106.0	± 27.7	41.6*	± 0.9
Clg-pvp 10%	67.9	± 16.7	84.3	± 14.5	40.7*	± 5.3

Los datos representan el porcentaje promedio de triplicados con respecto al control de cada donador (MEM sin SBF) \pm la desviación estándar. F = femenino, M = masculino, n = normal, ctz = cicatriz hipertrófica y tx = cicatriz hipertrófica tratada *in vivo* con colágena-pvp y resuelta clínicamente. * $p < 0.05$ para el tratamiento indicado vs. el control.

Actividad colagenolítica. La evaluación funcional de la colagenasa intersticial, así como otras enzimas con actividad colagenolítica dependientes de calcio, se evaluó en los homogenados de monocapa y sobrenadante de cultivo en las líneas F11n, F29n, M8ctz y M8tx a través de la degradación de un sustrato radioactivo, la colágena tipo I en su estado nativo. La actividad colagenolítica evaluada en este trabajo fue la total, ya que todas las muestras se activaron previamente con APMA, como se indica en Material y Métodos.

La actividad colagenolítica en condiciones basales no presentó diferencias estadísticamente significativas; más aun, los cultivos M8ctz prácticamente tuvieron la misma actividad que los normales, mientras que los M8tx fueron ligeramente mayores (Figura 6).

En cuanto a la actividad colagenolítica en cada una de las líneas tratadas *in vitro* con colágena o colágena-pvp, se observó que la adición de colágena a los cultivos F29n y M8ctz incrementó la degradación de colágena alrededor del 20%, mientras que en F11n y M8tx disminuyó de manera incipiente (Tabla V). Tampoco se observó una diferencia notable en los cultivos tratados con 1% de colágena-pvp. En contraste, todas las líneas celulares manifestaron una disminución importante de colagenasa cuando fueron tratadas con concentraciones mayores al 5% de colágena-

pvp; incluso ésta fue estadísticamente significativa en F29n.

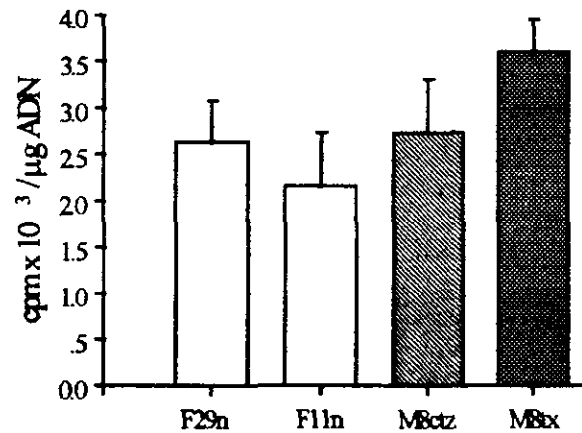


Figura 6. Evaluación de la actividad colagenolítica de fibroblastos cultivados en D-MEM a través de la degradación de ³H colágena. Las barras indican el promedio \pm DE. F = femenino, M = masculino, n = normal, ctz = cicatriz hipertrófica y tx = cicatriz hipertrófica tratada *in vivo* con colágena-pvp y resuelta clínicamente.

Tabla V

ACTIVIDAD COLAGENOLÍTICA

	F29n		F11n		M8ctz		M8tx	
Clg 1%	122.4	± 7.4	80.2	± 12.6	121.0	± 1.0	86.2	± 38.6
Clg-pvp 1%	115.9	± 30.5	83.5	± 15.1	103.4	± 21.3	87.1	± 0.0
Clg-pvp 5%	45.5*	± 4.1	62.4	± 23.8	57.2	± 22.0	57.1	± 16.5
Clg-pvp 10%	30.5*	± 6.3	34.2	± 24.4	30.1	± 0.6	29.7	± 7.7

Los datos representan el porcentaje promedio de triplicados con respecto al control (MEM sin SBF) \pm la desviación estándar. X = promedio, DE = desviación estándar, F = femenino, M = masculino, n = normal, ctz = cicatriz hipertrófica y tx = cicatriz hipertrófica tratada *in vivo* con colágena-pvp y resuelta clínicamente. * $p < 0.05$ para el tratamiento indicado vs. el control.

Cuantificación del inhibidor tisular de metaloproteinasas 1 (TIMP-1). Los inhibidores de metaloproteinasas, junto con la actividad colagenolítica y la síntesis total de colágena, nos dan una idea del recambio general de esta proteína. Así que al evaluar la cantidad del TIMP-1 en los sobrenadantes de cultivo de las líneas F29n, M8ctz y M8tx (Figura 7), encontramos que la línea celular normal presentó niveles muy similares a los de la línea de cicatriz tratada. Por su parte, los fibroblastos derivados de la cicatriz hipertrófica manifestaron niveles del doble que los dos anteriores.

Por otro lado, al analizar la expresión del TIMP-1 en los sobrenadantes de cultivo de las líneas mencionadas, encontramos que el tratamiento *in vitro* con 1% de colágena no estimuló ningún cambio, mientras que los tratamientos con diferentes concentraciones de colágena-pvp, llevó a disminuciones menores en la expresión del inhibidor en las líneas F29n y M8tx, mientras que en la línea M8ctz aparentemente hubo una disminución mayor, ya que alcanzó hasta un 26% menos que el control (Tabla VI).

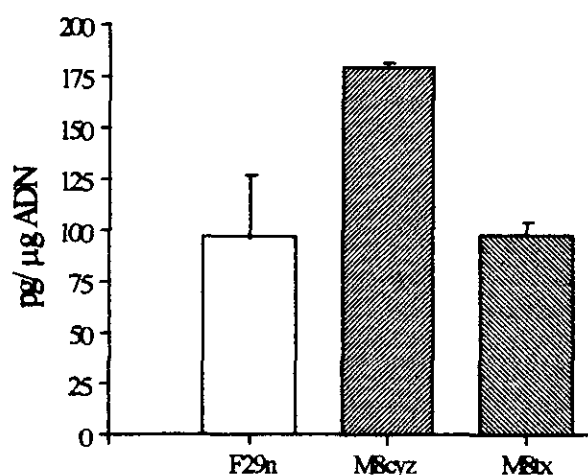


Figura 7. Cuantificación de TIMP-1 en SN de fibroblastos cultivados en D-MEM, a través de un ensayo de tipo ELISA. Las barras indican el promedio \pm DE. F = femenino, M = masculino, n = normal, ctz = cicatriz hipertrófica y tx = cicatriz hipertrófica tratada *in vivo* con colágena-pvp y resuelta clínicamente.

Tabla VI

CUANTIFICACIÓN DE TIMP-1

	F29n	M8ctz	M8tx
Clg 1%	112.8 ± 24.7	99.8 ± 12.6	98.7 ± 6.3
Clg-pvp 1%	86.6 ± 4.5	90.1 ± 12.9	109.7 ± 4.1
Clg-pvp 5%	90.3 ± 3.7	73.0 ± 12.3	95.2 ± 22.6
Clg-pvp 10%	80.1 ± 3.1	56.7 ± 8.5	85.9 ± 21.2

los datos representan el porcentaje promedio de duplicados con respecto al control (MEM sin SBF) ± la desviación estándar. F = femenino, M = masculino, n = normal, ctz = cicatriz hipertrófica y tx = cicatriz hipertrófica tratada *in vivo* con colágena-pvp y resuelta clínicamente.

Síntesis de Glicosaminoglicanos. La incorporación de glucosamina radioactiva nos permitió cuantificar a este grupo de moléculas no proteicas cuya participación en la MEC es tanto estructural como informacional. Como se puede observar de la evaluación realizada a las líneas F29n, M8ctz y M8tx (Figura 8), existe un incremento del doble en la síntesis de GAGs en los fibroblastos de cicatriz hipertrófica y los de cicatriz hipertrófica tratada y resuelta, donde incluso en la última, existen diferencias estadísticamente significativas con una $p = 0.018$.

Asimismo, el análisis de los cultivos de fibroblastos normales señalaron que existe un incremento en la síntesis de GAGs paralelo a la concentración de colágena-pvp utilizada; sin embargo, tanto los cultivos de cicatriz hipertrófica, como los de cicatriz tratada mostraron una disminución en la síntesis de GAGs, donde el valor mínimo llegó a ser alrededor de 60% menos con respecto al control sin suero (Tabla VII).

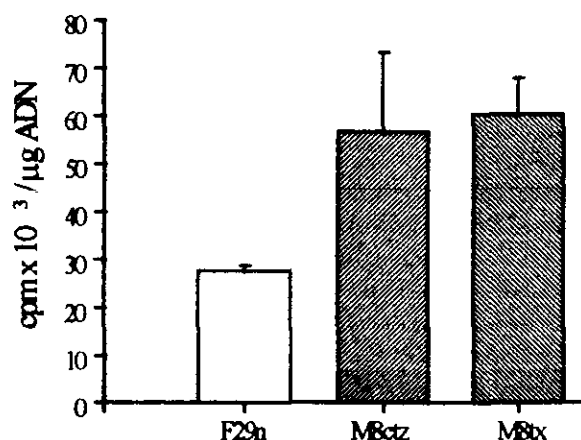


Figura 8. Cuantificación de GAGs en MC y SN de fibroblastos cultivados en D-MEM a través de la incorporación de ³H Glucosamina. Las barras indican el promedio ± DE. F = femenino, M = masculino, n = normal, ctz = cicatriz hipertrófica y tx = cicatriz hipertrófica tratada *in vivo* con colágena-pvp y resuelta clínicamente.

Tabla VII

CUANTIFICACIÓN DE GAGs

	F29n	M8ctz	M8tx
Clg-pvp 1%	109.4 ± 5.7	88.6 ± 7.9	92.5 ± 2.5
Clg-pvp 5%	161.5 ± 87.8	44.0 ± 2.1	43.3 ± 1.9
Clg-pvp 10%	178.0 ± 61.7	181.0 ± 14.4	67.1 ± 9.4

Cuantificación de GAGs en MC y SN de cultivo de fibroblastos, los datos representan el porcentaje promedio de triplicados con respecto al control (MEM sin SBF) \pm la desviación estándar. F = femenino, M = masculino, n = normal, ctz = cicatriz hipertrófica y tx = cicatriz hipertrófica tratada *in vivo* con colágena-pvp y resuelta clínicamente. * $p < 0.05$ para el tratamiento indicado vs. el control.

Cuantificación de citocinas fibrogénicas en los sobrenadantes de cultivo. Para correlacionar el metabolismo de la colágena con los factores que llevan a cabo su regulación, se cuantificó en los sobrenadantes del cultivo de fibroblastos, por medio de un sistema de tipo ELISA, la secreción de IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1 y PDGF-AB. La IL-1 β y el TNF- α no pudieron ser cuantificados, probablemente debido a la sensibilidad del sistema de detección ya que ésta fue de 3.9 y 7.8 pg/ml, respectivamente; si bien algunas muestras sí fueron inmunodetectadas, los valores no alcanzaron a ser intrapolables. Sin embargo, los otros dos factores sí fueron cuantificados a través del sistema mencionado.

Así, la cuantificación del TGF- β 1 total (activo y activable) mostró diferencias importantes en los valores absolutos obtenidos de los cultivos tratados en condiciones basales (Figura 9), aunque éstos no fueron estadísticamente significativos. Cabe señalar que incluso entre dos de las líneas de fibroblastos normales, F29n y F11n, se observaron valores muy diferentes, donde una vez más, lo podemos atribuir a la edad de las pacientes. Otra parte interesante es que la línea derivada de cicatriz hipertrófica, M8ctz, presentó niveles similares a los observados por una de las líneas normales, F11n, incluso correlacionando con las edades. Finalmente, la cuantificación del TGF- β 1 en la línea de cicatriz tratada, en este caso F28tx, mostró valores entre 3 y 4 veces menores a los observados por las líneas de cicatriz y piel normal mencionadas.

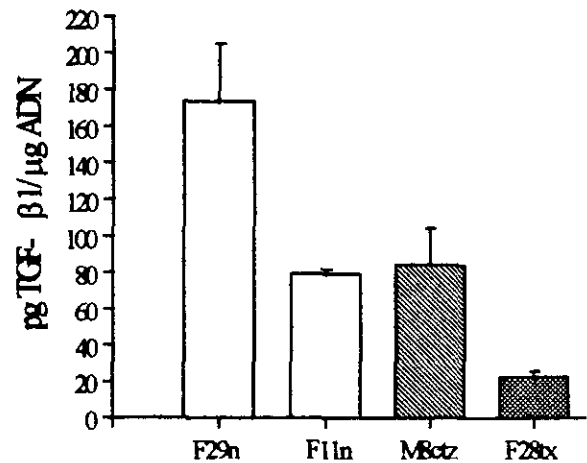


Figura 9. Cuantificación de TGF- β 1 en SN de fibroblastos cultivados en D-MEM a través de un ensayo de tipo ELISA. Las barras indican el promedio \pm DE. F = femenino, M = masculino, n = normal, ctz = cicatriz hipertrófica y tx = cicatriz hipertrófica tratada *in vivo* con colágena-pvp y resuelta clínicamente.

En cuanto a la variación en la cantidad de la proteína total del TGF- β 1 por el tratamiento con 1% de colágena o concentraciones variables de colágena-pvp (Tabla VIII), la línea normal F29n no presentó ningún cambio, a diferencia de la línea F11n, donde la concentración del factor en los sobrenadantes del cultivo se incrementó en aproximadamente un 50% cuando los fibroblastos fueron tratados con 1% de colágena ó 1% de colágena-pvp; sin embargo el tratamiento con concentraciones mayores del

biofármaco hace que disminuya ligeramente el factor hasta alcanzar los nivel basales, es decir sin suero. Por otro lado, en el tratamiento de los fibroblastos de cicatriz hipertrófica, M8ctz, parece muy claro que solamente la concentración del 10% de colágena-pvp es

capaz de disminuir la síntesis del TGF- β 1, llegando a valores de la mitad del control sin suero (Tabla VIII).

Tabla VIII

CUANTIFICACIÓN DE TGF- β 1

	F29n		F11n		M8ctz	
Clg 1%	99.7	± 9.4	159.8	± 12.8	114.1	± 17.4
Clg-pvp 1%	90.2	± 0.2	159.8	± 40.0	91.1	± 3.2
Clg-pvp 5%	96.6	± 11.9	73.9	± 24.7	91.8	± 29.1
Clg-pvp 10%	95.0	± 19.6	108.9	± 4.7	43.9	± 14.2

Los datos representan el porcentaje promedio de duplicados con respecto al control (MEM sin SBF) \pm la desviación estándar. F = femenino, M = masculino, n = normal, ctz = cicatriz hipertrófica y tx = cicatriz hipertrófica tratada *in vivo* con colágena-pvp y resuelta clínicamente.

La cuantificación del PDGF-AB como un factor fibroproliferativo nos permitiría asociar cada línea celular con su capacidad de división, lo cual resulta importante al tratar de conjuntar síntesis de MEC con capacidad proliferadora. Al analizar tres de las líneas celulares en condiciones basales (Figura 10) pudimos observar que evidentemente la línea de cicatriz hipertrófica, M8ctz, presentaba niveles significativamente mayores, entre 4 y 5 veces, a los de la línea normal F11n ($p < 0.001$), siendo además notable la expresión mínima del PDGF-AB ($p < 0.001$) en los cultivos de cicatriz hipertrófica tratada y resuelta clínicamente, M28tx. Aún entre éstos y los de piel normal existieron diferencias aunque no fueron significativas.

Ahora bien, cuando los cultivos de piel normal se trataron con 1% de colágena, se observó un incremento en la cantidad del PDGF-AB 17 veces mayor al control sin suero, mientras que para las diferentes concentraciones de colágena-pvp, éste fue de aproximadamente 6 veces para el 1 y 5% y 3.5 veces para el 10% (Tabla IX). Cabe señalar que pese a la enorme diferencia entre los valores con respecto al control, no existieron diferencias estadísticamente significativas debido a la

dispersión de los valores. Algo interesante fue el haber obtenido valores cercanos al control

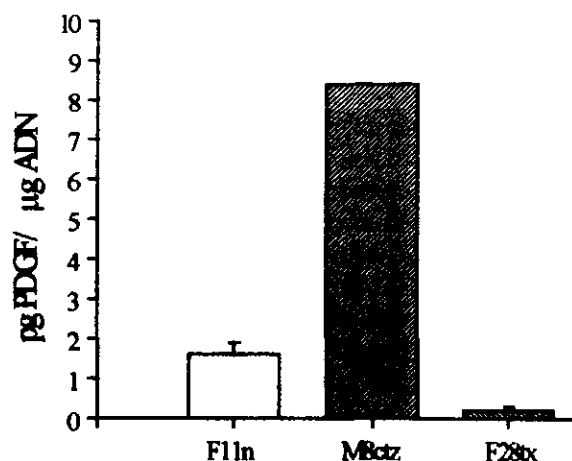


Figura 10. Cuantificación de PDGF-AB en SN de fibroblastos cultivados en D-MEM a través de un ensayo de tipo ELISA. Las barras indican el promedio \pm DE. F = femenino, M = masculino, n = normal, ctz = cicatriz hipertrófica y tx = cicatriz hipertrófica tratada *in vivo* con colágena-pvp y resuelta clínicamente.

en los cultivos de fibroblastos derivados de cicatriz hipertrófica tratados con 1% de colágena o la misma concentración de colágena-pvp, ya que las variaciones fueron mínimas. Sin embargo, en esta misma línea celular sí pudimos

observar variaciones más importantes, aunque tampoco significativas estadísticamente, cuando los cultivos se trataron con concentraciones

entre 5 y 10% de colágena-pvp, pues los niveles del factor disminuyeron hasta casi 4 veces.

Tabla IX

CUANTIFICACIÓN DE PDGF-AB

	FIn	M8ctz
Clg 1%	1,737 ± 543	97.6 ± 21.4
Clg-pvp 1%	588 ± 143	138.1 ± 42.9
Clg-pvp 5%	675 ± 100	38.1* ± 11.9
Clg-pvp 10%	356 ± 50	28.6* ± 16.7

los datos representan el porcentaje promedio de duplicados con respecto al control (MEM sin SBF) ± la desviación estándar. F = femenino, M = masculino, n = normal, ctz = cicatriz hipertrófica y tx = cicatriz hipertrófica tratada *in vivo* con colágena-pvp y resuelta clínicamente.

IX. DISCUSIÓN

El proceso de cicatrización depende de una gran variedad de células, todas ellas con capacidad de diferenciación, producción y depósito de componentes de la MEC y/o las enzimas que los degradan, la producción de inhibidores enzimáticos, de citocinas pro- y antiinflamatorias, etc. (Postlethwaite et al., 1988, Alvaro-Gracia, 1992, Raghov, 1994, Gailit y Clark, 1994, Clark, 1995). Las proporciones y la espacio-temporalidad de cada uno de los componentes mencionados dirigen la intensidad en la resolución del daño; sin embargo, cuando el infiltrado inflamatorio no desaparece en el periodo normal de cicatrización, se generan estímulos que conllevan al establecimiento de un proceso fibroso. Ahí los fibroblastos y los miofibroblastos se consideran más como células efectoras que como reguladoras, aunque se sabe que ellos mismos tienen capacidad de producir citocinas que influyen en el proceso (Kovacs, 1991); además, los fibroblastos son el componente celular más abundante en el tejido de granulación, con el 57% de la población celular total (Koschnick et al., 1998) y se consideran como la estirpe celular efectora más activa, pues son los responsables del recambio de la matriz, es decir, su síntesis y degradación.

Con la intención de conocer parte del mecanismo de acción de la colágena-pvp como fibrolítico, y dado que el fibroblasto es una célula importante en la secuela fibrosa posterior a la reparación, consideramos útil la evaluación de las variaciones metabólicas entre diferentes líneas de fibroblastos humanos derivados de piel normal, cicatriz hipertrófica y cicatriz hipertrófica tratada *in vivo* con colágena-pvp y resuelta bajo criterios clínicos. Los parámetros analizados fueron la proliferación, el recambio de colágena, la síntesis de GAGs y la expresión de citocinas, así como el comportamiento de los diferentes grupos celulares cuando se trataron *in vitro* con colágena-pvp.

Las pruebas se realizaron en dos líneas derivadas de piel normal, una de cicatriz hipertrófica y dos de cicatriz hipertrófica tratada y resuelta de acuerdo con los criterios clínicos,

considerando como basal, la actividad metabólica de las líneas de fibroblastos normales. Así, los cultivos de cicatriz hipertrófica presentaron menor proliferación y recambio de colágena, pero mayor expresión del PDGF. En cuanto a los cultivos de cicatriz tratada, la proliferación y el recambio de colágena fueron semejantes a lo normal y los niveles de expresión de TGF- β 1 y el PDGF fueron incluso menores a los determinados en fibroblastos de piel normal, aunque la expresión de los GAGs fue elevada en relación con los cultivos normales, tanto en los fibroblastos de cicatriz como en los de cicatriz tratada.

Ahora bien, el recambio de la colágena comprende tres aspectos; la síntesis, la degradación y la inhibición de los mecanismos de degradación, todos ellos regulados de manera coordinada. Sin embargo, nosotros no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos para la síntesis de colágena y la actividad colagenolítica; no obstante, la expresión del TIMP-1 en los sobrenadantes del cultivo de fibroblastos de cicatriz hipertrófica aumentaron casi al doble los niveles en comparación con los de piel normal y cicatriz tratada, lo que nos permitió considerar una posible regulación negativa sobre el recambio de la colágena. Si bien se sabe que los fibroblastos derivados de patologías fibrosantes generalmente tienen mayor capacidad que los de piel normal para depositar colágena y disminuir su actividad colagenolítica, así como de responder, entre otras, a una combinación de TGF- β 1 y PDGF (Uitto et al., 1979, Yamakage et al., 1992), también se sabe que existen subpoblaciones metabólicamente diferentes, como las reportadas en el trabajo de Arakawa y cols. En el se estableció que los fibroblastos derivados de la periferia de la cicatriz hipertrófica, así como los que están un poco más allá del borde, expresan niveles más altos de los ARNm para las colágenas tipo I y III, que los fibroblastos derivados de piel normal. Además, en esos mismos cultivos de cicatriz, la expresión de la colagenasa fue baja, mientras que la del TIMP fue mayor. Por otro lado, en los cultivos

derivados de la región central de la misma cicatriz, encontraron una expresión menor de los mensajeros para el TIMP y para la colagenasa todavía más bajos que los de la orilla de la misma (Arakawa et al., 1996). Sin embargo, los datos de Arakawa y cols. no concuerdan con los de Varedi y cols., ya que éstos no encuentran diferencia en la expresión del ARNm para la enzima entre fibroblastos de piel normal y de cicatriz hipertrófica (Varedi et al., 1995). Esto indica que la presencia de clones de fibroblastos y/o miofibroblastos presentes en esta patología tiene un carácter espacial, lo que permite considerar que el recambio de la colágena puede variar de acuerdo al tipo o evolución de la fibrosis. Aún más, algunas líneas derivadas de cicatriz queloide expresan niveles semejantes o ligeramente menores de colágena y su mensajero, que aquellas derivadas de piel normal, (Bettinger et al., 1996), lo cual refuerza la consideración de la actividad clonal.

De esta manera, se puede justificar el comportamiento de los diferentes grupos celulares estudiados en este trabajo, considerando que aún cuando algunos resultados se muestran heterogéneos, la conclusión es que los fibroblastos derivados de cicatriz hipertrófica tratada y resuelta, se comportan de manera semejante a los derivados de piel normal, lo que concuerda con los hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos de los tejidos de donde se aislaron dichas células (Krötzsch-Gómez et al., 1998).

En cuanto a la actividad de los cultivos de fibroblastos incubados de 18 a 24 horas en ausencia de suero y en presencia de colágena-pvp o colágena, los datos revelaron que el tratamiento con diferentes concentraciones de colágena-pvp disminuye la proliferación, la síntesis de colágena y la actividad colagenolítica en todos los grupos, mientras que la expresión del TIMP-1 y el TGF- β 1, prácticamente no mostraron cambios, excepto para el inhibidor que disminuyó en los cultivos de fibroblastos de cicatriz. Cabe señalar que los GAGs fueron el parámetro más variable junto con los niveles del PDGF, pues los primeros se incrementaron en los fibroblastos normales y disminuyeron en los

derivados de cicatriz y cicatriz tratada; mientras que el factor se incrementó entre 3.5 y 6.7 veces en los fibroblastos normales y disminuyó hasta casi la cuarta parte en los derivados de cicatriz. Siendo notorios en algunas ocasiones los cambios en relación con la concentración. Además, las evaluaciones realizadas en los cultivos tratados *in vitro* con colágena, no mostraron cambios en la actividad colagenolítica ni en la expresión del TIMP-1, aunque sí disminuyó la proliferación en todos los casos. El TGF- β 1 se incrementó específicamente en las células de cicatriz hipertrófica, así como el PDGF que alcanzó niveles hasta 17 veces mayores en relación con los cultivos de piel normal. Esto nos muestra claramente que existen diferencias observadas entre los tratamientos *in vitro*, es decir colágena *versus* colágena-pvp, como lo habíamos observado previamente. Así que existen ciertas variaciones atribuibles solamente al tratamiento con el biofármaco (Krötzsch-Gómez, 1995) y éstas pueden deberse a una modificación en la estructura de la colágena por la adición del polímero que se entrecruza, por efecto de la radiación γ , formando un complejo ligeramente más pesado que la colágena (Chimal-Monroy et al., 1997), lo que probablemente lleva a la colágena-polivinilpirrolidona a interactuar con receptores diferentes a los empleados por la célula cuando interacciona con colágena fibrilar (Eckes et al., 1993). Por ejemplo, en el trabajo de Koseki y Yoshizato, se observa que la interacción de las células con el sustrato depende de la integridad de éste, ya que los fibroblastos cultivados sobre plástico o gelatina se comportan diferente de los cultivados sobre colágena fibrilar, pues los últimos producen aproximadamente 80 proteínas más que los primeros dos, argumentando que el efecto es dependiente de la configuración de la colágena. Además, el contenido de la proteína "nativa" es importante, ya que los fibroblastos que crecen sobre matrices de colágena con concentración menor a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ presentan una forma celular muy similar a los crecidos sobre plástico, mientras que los cultivados sobre matrices de colágena de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, manifiestan cambios

morfológicos específicos con abundantes protuberancias citoplasmáticas (Koseki y Yoshizato, 1994).

Con base en esta consideración, los cultivos de fibroblastos a los que adicionamos la colágena, todavía soluble y que después formó un gel muy laxo, presentaron algunos cambios metabólicos pese a que la concentración que utilizamos fue de aproximadamente $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. No obstante la concentración tan baja de la proteína, que fue equivalente en el tratamiento con colágena-pvp al 1%, existen actividades fisiológicas relevantes y que tienen efecto directo sobre el recambio de la colágena endógena. Es importante considerar que probablemente algunas de las actividades observadas en nuestros ensayos no pueden ser comparadas totalmente con lo reportado en la literatura, dado que generalmente las pruebas para evaluar la morfología o las actividades metabólicas debidas a la interacción célula-matriz, se realizan con cantidades de colágena muy superiores a lo que nosotros empleamos. Tal es el caso de los fibroblastos inmersos en geles de colágena tipo I fibrilar, con concentraciones entre 1 y $2 \text{ mg}/\text{cm}^2$, donde se indica que las condiciones de cultivo favorecen la activación de la gelatinasa de 72 kD y que esta activación no se presenta si los fibroblastos se cultivan sobre plástico o sobre colágena tipo IV, ya que la interacción célula-colágena tipo I se da a través de la integrina $\alpha 2\beta 1$, que incluso se disocia por efecto de la misma metaloproteasa que se activa. Además, se muestra que la expresión del TIMP-2, tanto el mensajero como la proteína, no cambia cuando las células crecen sobre plástico o aún sobre las matrices de colágena tipo I (Seltzer et al., 1994). Este punto resulta muy interesante, dado que en este estudio ninguno de los cultivos tratados con colágena modificó su expresión de TIMP-1 con respecto al control, lo que podría en un momento dado ser una generalidad en la transducción de la señal a través de integrinas que interaccionan con colágena tipo I; o sea que el mensaje de transducción sería específico para los genes de colágena y colagenasa, lo que indicaría que su regulación no está coordinada

con la expresión de los TIMP. Por lo que la modulación negativa del TIMP-1 en los fibroblastos derivados de cicatriz hipertrófica tratada con colágena-pvp, podría llevarse por una vía diferente a la integrina $\alpha 2\beta 1$, que como dijimos antes, probablemente no sea ella la que interaccione con el biofármaco.

Otra de las formas de regulación para el recambio de colágena es la influencia de factores solubles. Así que citocinas proinflamatorias y fibrogénicas, como la IL-1 β , el TNF- α , el TGF- $\beta 1$ y el PDGF fueron evaluadas en los sobrenadantes de cultivo de los diferentes grupos de fibroblastos. Primero es necesario indicar que tanto la IL-1 β como el TNF- α no pudieron ser cuantificados, lo anterior probablemente se debe a la concentración en que se encontraban en el cultivo, ya que el sistema comercial para la detección de ambos factores tiene un límite de sensibilidad. No obstante, se observaron en la placa de ELISA algunos valores de la reacción colorimétrica, lo que indicaría la presencia del factor pero en concentraciones menores a la sensibilidad de la curva patrón. En cuanto a los otros dos, el TGF- $\beta 1$ y el PDGF, ambos fueron detectados y cuantificados por el sistema inmunoenzimático de tipo ELISA. En este caso, las diferencias observadas fueron muy claras para el PDGF, mientras que para el TGF- $\beta 1$ no se presentaron o solo ocurrieron en los fibroblastos tratados con las concentraciones de 5 y 10% de colágena-pvp en los fibroblastos de cicatriz y cicatriz tratada, respectivamente. De cualquier manera, los efectos observados no se correlacionan con la proliferación o la síntesis y degradación de colágena, donde ambos factores tienen efectos directos sobre estos parámetros (Varga et al., 1987, Raghow et al., 1987, Xu y Clark, 1996) e indirectos en la estimulación de otros factores como el factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), que también participa en la inducción de la proliferación y depósito de tejido conjuntivo en los fibroblastos (Grotendorst, 1997, Takeda et al., 1998).



Finalmente, nos encontramos con que la hipótesis planteada originalmente resultó nula, pues como se menciona antes, los niveles del

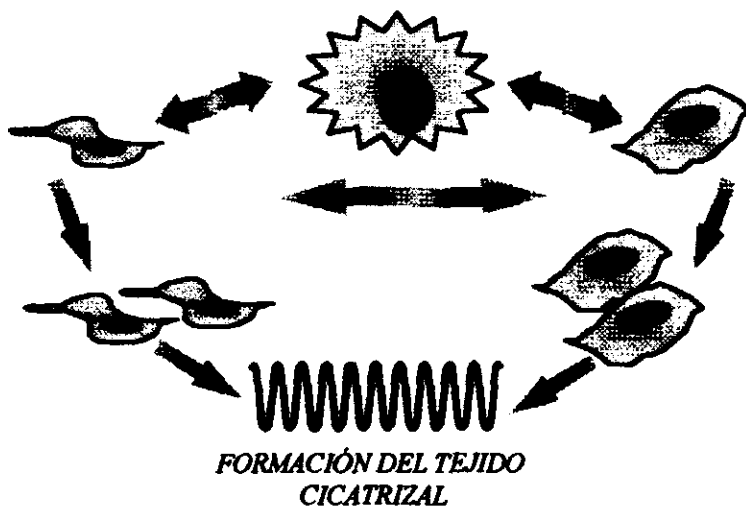
TGF- β 1 y el PDGF no fueron suficientes para generar una estimulación autócrina. Esta consideración contempla la posibilidad que las células no tuvieran los receptores para ambos factores, aunque existe información acerca de la colocalización de los ARNm para TGF- β 1 y colágena, donde la inducción en la transcripción del mensajero de la colágena puede ser estimulada de manera autócrina y parácrina por el TGF- β 1 (Zhang et al., 1995). Aunque por otro lado, Kratz y Compton establecen que, aún cuando en el proceso de cicatrización, tanto los fibroblastos como las células endoteliales secretan al TGF- β 1, las concentraciones derivadas de estas dos células no contribuyen de manera significativa en la regulación del proceso, lo que se complementa con otros estímulos sistémicos o a través de células inflamatorias (Kratz y Compton, 1997). Así que los efectos observados en los cultivos de fibroblastos derivados de piel normal, cicatriz hipertrófica y cicatriz hipertrófica tratada *in vivo* con colágena-pvp, aparentemente no se deben a una estimulación autócrina, aunque es necesario evaluar otros factores que pudieran llevar a datos nuevos en la mecánica del biofármaco.

Asimismo, es necesario evaluar qué tipos de integrinas de unión a colágena se expresan en los cultivos tratados *in vitro* con colágena-pvp, con el fin de identificar si el biofármaco interacciona con la célula vía algún receptor de matriz.

No obstante la necesidad de estímulos sistémicos para incrementar o disminuir el proceso fibroso asociado con la cicatrización hipertrófica, los resultados obtenidos en el curso de este estudio correlacionan con el incremento en la expresión *ex vivo* de los factores fibrogénicos, TGF- β 1 y PDGF, en las biopsias de donde se obtuvieron las células, incluyendo los resultados observados al evaluar el porcentaje de células dispersas inmunorreactivas en los cortes de cicatriz hipertrófica (Krötzsch-Gómez et al., 1998), donde una buena parte de ellas tiene aspecto fibroblastoide. Finalmente, es importante señalar que si bien los resultados obtenidos en este trabajo son parte de la evaluación mecanística de la actividad fibrolítica de la colágena-pvp, se vuelve necesario explorar su efecto en un número mayor de líneas celulares, así como en diferentes estirpes.

X. CONCLUSIÓN

	<i>Cicatriz hipertrófica</i>	<i>Cicatriz hipertrófica tratada con colágena-pvp</i>
Condiciones basales (Sin suero)		
● Recambio de colágena con respecto a la piel normal	↓	=
● GAGs	↑	↑
● TGF-β1 PDGF-AB	=, ↑	↓
Colágena-pvp in-vitro		
● Recambio de colágena con respecto a la piel normal	↑	↓
● GAGs	↓	↓
● TGF-β1 PDGF-AB	↓	↓



XI. LISTA DE ABREVIATURAS

AcOK	Acetato de potasio	IFN	Interferón
ADN	Ácido desoxirribonucleico	IL-1	Interleucina 1
APMA	Ácido fenil, metil-mercurico	IL-4	Interleucina 4
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	IL-6	Interleucina 6
[¹⁴ C]	Carbono 14	IL-10	Interleucina 10
°C	Grados centígrados	MC	Monocapa
CaCl ₂	Cloruro de calcio	μCi	Microcuries
Clg	Colágena tipo I	MEC	Matriz extracelular
Clg-pvp	Colágena-polivinilpirrolidona	MeOH	Alcohol metílico
cpm	Cuentas por minuto	μl	Microlitros
CO ₂	Dióxido de carbono	MMP	Metaloproteasa
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conjuntivo	NEM	N-etilmaleimida
Ctz	Cicatriz	PBS	Solución salina de fosfatos
CtzH	Cicatriz hipertrófica	PDC	Proteínas degradadas por colagenasa
D-MEM	Medio de Dulbecco-Eagle Modificado	PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético	PNDC	Proteínas no degradadas por colagenasa
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	PVP	Polivinilpirrolidona
EtOEt	Éter etílico	SBF	Suero de bovino fetal
EtOH	Alcohol etílico	SN	Sobrenadantes
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico	S/S	D-MEM sin suero
x g	Tantas veces la gravedad	TA	Temperatura ambiente
GAGs	Glicosaminoglicanos	TCA	Ácido tricloroacético
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos	TGF-α	Factor de crecimiento transformante α
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos	TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
[³ H]	Tritio	TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteasas
IGF	Factor de crecimiento semejante a la insulina	VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

XII. REFERENCIAS

- Adzick NS, Lorenz HP. Cells, matrix, growth factors, and the surgeon. The biology of scarless fetal wound repair. *Ann Surgery*. 1994;220(1):10-18.
- Agren MS. Topical matrix metalloproteinase inhibitor reduces epithelial migration during cutaneous wound healing. *Wound Rep Reg*. 1998;6:A496.
- Ahn ST, Monafo WW, Mustoe TA. Topical silicone gel for the prevention and treatment of hypertrophic scar. *Arch Surg*. 1991;126:499-504.
- Alvaro-Gracia JM. Citocinas en la Membrana Sinovial de la Artritis Reumatoide. *Revista Española de Reumatología*. 1992;19(9):378-387.
- Almazán Díaz A, de la Cruz García JC, Lira Romero JM, Arrellin G, Chimal Monroy J, Díaz de León L, Furuzawa Carballada J, Kröttsch Gómez F. "Investigación experimental de la regeneración ósea en fémures de rata después de la aplicación de colágena I polimerizada: Estudio radiológico, histológico e histoquímico". *Rev Mex Ortop Traum*. 1996;10(3):142-152.
- Arakawa M, Hatamochi A, Mori Y, Mori K, Ueki H, Moriguchi T. Reduced collagenase gene expression in fibroblasts from hypertrophic scar tissue. *Br J Dermatol*. 1996;134:863-868.
- Asem EK, Novero RP. Stimulation of fibronectin production and deposition by chicken granulosa cells *in vitro* by epidermal growth factor and transforming growth factor α . *J Rep Fertility*. 1994;101: 375-384.
- Ashcroft GS, Horan MA, Ferguson MW. The effects of ageing on cutaneous wound healing in mammals. *J Anatomy*. 1995;187:1-26
- Banchereau J, Brière F, Galizzi JP, Moissec P, Rousset F. Human interleukine 4. *J Lipid Med Cell Signalling*. 1994;9:43-53.
- Barile L, Furuzawa-Carballada J, Kröttsch-Gómez FE, Espinosa-Morales R, Alcalá M, Díaz de León L. Comparative study of collagen-polyvinylpyrrolidone vs. triamcinolone acetate in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*, 1998;16:370.
- Bassols A, Massagué J. Transforming growth factor β regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*. 1988;263(6):3039-3045.
- Bettinger DA, Yager DR, Diegelmann RF, Cohen IK. The effect of TGF- β on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis. 1996;98:827-833.
- Castagnoli C, Stella M, Berthod Ch, Magliacani G, Momigliano Richiardi P. TNF production and hypertrophic scarring. *Cell Immunol*. 1993;147:51-63.
- Castagnoli C, Stella M, Magliacani G, Ferrone S, Momigliano Richiardi P. Similar ectopic expression of ICAM-1 and HLA Class II molecules in CtzH following thermal injury. *Burns*. 1994;20(5):430-433.
- Chaman PT, Haskard DO. Leukocyte adhesion molecules. *Br Med Bulletin*. 1995;51(2):296-311.
- Chimal-Monroy J, Bravo-Ruiz T, Kröttsch Gómez FE, Díaz de León L. Implantes de Fibroquel aceleran la formación de hueso nuevo en defectos óseos inducidos

experimentalmente en cráneos de rata: un estudio histológico. *Rev Biomed.* 1997;8:81-88.

•Chimal-Monroy J, Bravo-Ruiz T, Furuzawa-Carballeda GJ, Lira JM, De la Cruz JC, Almazán A, Kröttsch Gómez FE, Arrellin RG, Díaz de León L. Collagen-PVP accelerates new bone formation of experimental induced bone defects in rat skull and promotes the expression of osteopontin and Sparc during bone repair of rat femora fractures. *Ann NY Acad Sci.* 1998; 857:232-236.

•Chiquet-Ehrismann R. What distinguishes tenascin from fibronectin?. *FASEB J.* 1990;4:2598-2604.

•Chojkier M, Peterkofsky B, Bateman J. A new method for determining the extent of proline hydroxylation by measuring changes in the ratio of 4-³H: ¹⁴CProline in collagenase digests. *Anal Biochem.* 1980;108:385-393.

•Clark RAF. Wound repair, overview and general considerations. En Richard AF Clark. *The molecular and cellular biology of wound repair.* Segunda edición. Plenum Press, 1995, New York, USA.

•Colige AC, Lambert CA, Nusgens BV, Lapière CM. Effect of cell-cell and cell-matrix interactions on the response of fibroblasts to epidermal growth factor *in vitro.* *Biochem J.* 1992;285:215-221.

•Curry TE, Mann JS, Estes RS, Jones PBC. α 2-macroglobulin and tissue inhibitor of metalloproteinases: collagenase inhibitors in human preovulatory ovaries. *Endocrinology.* 1990;127:63-68.

•Darzi MA, Chowdri NA. Evaluation of various methods of treating keloids and hypertrophic scars, a 10 year follow up study. *Br J of Plast Surg.* 1992;45(5):374.

•Díaz de León HL, Kröttsch-Gómez FE, Guerrero-Padilla E, Cervantes-Viramontes R, Reyes-Márquez R. A Novel Approach for the Treatment of Tissular Fibrosis. *Matrix Biol.* 1994;145(5):401,abstr.

•Diegelmann RF, Peterkofsky B. Inhibition of collagen secretion from bone and cultured fibroblasts by microtubular disruptive drugs. *Proc Nat Acad Sci.* 1972;69(4):892-896.

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

•Eckes B, Mauch C, Hüppe G, Krieg T. Downregulation of collagen synthesis in fibroblasts within three-dimensional collagen lattices involves transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Fed Eur Biochem Soc.* 1993;318(2):129-133.

•Emonard H, Munaut C, Mlin M, Lortat-Jacob H, Grimaud J-A. Interleukin-6 does not regulate interstitial collagenase, stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases synthesis by cultured human fibroblasts. *Matrix.* 1992;12:471-474.

•Ehrlich HO, Krummel TM. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. *Wound Rep Reg.* 1996;4:302-210.

•Furuzawa-Carballeda J, Alcocer-Varela J, Díaz de León L. Collagen-pvp decreases collagen turnover in synovial tissue cultures from rheumatoid arthritis patients. *Ann NY Acad Sci.* 1999;878, en prensa.

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

- Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Tredget EE. Immunolocalization of TGF- β 1 in human hypertrophic scar and normal dermal tissues. *Cytokine*. 1995;7(2):184-190.
- Gohji K, Fidler IJ, Tsan R, Radinski R, Von Eschenbach AC, Tsuruo T, Nakajima M. Human recombinant interferons-beta and gamma decrease gelatinase production and invasion by human KG-2 renal-carcinoma cells. *Int J Cancer*. 1994;58:380-384.
- Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF- β action on fibroblasts. *Cytokine and Growth factor reviews*. 1997;8(3):171-179.
- Hart J, Amin E, Harding KG. Platelet-derived growth factor (AB) priming and its effects on macrophage recruitment. *Wound Rep Reg*. 1998;6:A502.
- Heldin P, Laurent TC, Heldin C. Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochem J*. 1989;258:919-922.
- Herovici C. Polychrome stain for differentiation precollagen from collagen. *Stain Technology*. 1963; 38:204-205.
- Hogan M, Sherry B, Ritchlin C, Fabre M, Winchester R, Cerami A, Bucala R. Differential expression of the small inducible cytokines GRO α and GRO β by synovial fibroblasts in chronic arthritis: possible role in growth regulation. *Cytokine*. 1994;6(1):61-69.
- Holbrook KA, Smith LT. Morphology of connective tissue: Structure of the skin and tendon. En: Peter M. Royce, Beat Steinmann. *Connective Tissue and its Heritable Disorders*. 1993, Wiley-Liss, Inc.:59, U.S.A.
- Kähäri V, Larjava H, Uitto J. Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. *J Biol Chem*. 1991;266(16):10608-10615.
- Kao J, Huey G, Kao R y Stern R. Ascorbic acid stimulates production of glycosaminoglycans in cultured fibroblasts. *Exp Mol Pathol* 1990;53:1-10.
- Kawaguchi Y, Kitani A, Hara M, Harigai M, Hirose T, Suzuki K, Kawakami M, Hidaka T, Ishizuka T, Kawagoe M, Nakamura H. Cytokine regulation of prolyl 4-hydroxylase production in skin fibroblast cultures from patients with systemic sclerosis: Contribution to collagen synthesis and fibrosis. *J Rheumatol*. 1992^a;19:1195-1201.
- Kawaguchi Y, Harigai M, Kitani A, Suzuki K, Kawakami M, Ishizuka T, Hidaka T, Hara M, Kawagoe M, Nakamura H. Effect of prolyl 4-hydroxylase inhibitor on fibroblast collagen production *in vitro*: An approach to the treatment of systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1992^b;19:1710-1715.
- Kielty CM, Hopkinson I, Grant ME. *Collagen: The collagen family: structure, Assembly, and organization in the extracellular matrix, en Connective Tissue and Its Heritable Disorders*. Capítulo 3, parte I:103-147, Wiley-Liss, Inc., 1993.
- Kikuchi K, Kadono T, Masutaka F, Tamaki K. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) may be an autocrine growth factor in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1997;108:281-284.
- Kjellén L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Ann Rev Biochem*. 1991;60:443-475.
- Klagsbrun M, Folkman J. *Angiogenesis. en Peptide Growth Factors and Their*

Receptors II, Editado por Sporn M. B. y Roberts A.B., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 553 -554, 1990, Alemania.

•Koschnick M, Busser F, Keller J, Hanselmann R, Koch B, Mutschler W, Rösken F. The cellular composition of human granulation tissue analyzed by fluorescence activated cell sorting (FACS). *Wound Rep Reg.* 1998;6:A489.

•Koseki N, Yoshizato K. Collagen-induced changes in the pattern of protein synthesis of fibroblasts. *Cell Adh Commun.* 1994;1:355-366.

•Kovacs EJ. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol Today.* 1991;12(1):17-23.

•Kovacs E, DiPietro LA. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J.* 1994;8: 854-861.

•Kratz G, Compton C. Tissue expression of transforming growth factor- β 1 and transforming growth factor- α during wound healing in human skin explants. *Wound Rep Reg.* 1997;5:222-228.

•Kröttsch-Gómez FE, Guerrero-Padilla E, Díaz de León L. Morphological studies on the effects of Fibroquel during wound healing of surgical wounds in rats. *J Cell Biochem.* 1993;137(17E suppl):R506, abstr.

•Kröttsch-Gómez FE. Efecto del Fibroquel^{MR} sobre el metabolismo de la colágena en cultivos celulares de fibroblastos y macrófagos de rata. Tesis de maestría. 1995.

•Kröttsch-Gómez FE, Furuzawa-Carballeda J, Reyes-Márquez R, Quiróz-Hernández E, Díaz de León L. Cytokine expression is downregulated by collagen-

polyvinylpyrrolidone in hypertrophic scars. *J Invest Dermatol.* 1998;111:828-834.

•Labarca C, Paigen K. A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem.* 1980;102:344-352.

•Lawrence WT. In search of the optimal treatment of keloids: report of a series and a review of the literature. *Ann Plast Surg.* 1991;27(2):164.

•Linsenmayer TF. Collagen. en *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Capítulo 1, Editado por Hay E., Plenum Press: 7-44, 1991, U.S.A.

•Luyten FP, Yu YM, Yanagishita M, Vukicevic S, Hammonds RG, Reddi AH. Natural bovine osteogenin and recombinant human bone morphogenetic protein-2B are equipotent in the maintenance of proteoglycans in bovine articular cartilage explant cultures. *J Biol Chem.* 1992;267(6):3691-3695.

•Massagué J. The transforming growth factor- β family. *Ann Rev Cell Biol.* 1990;6:597-641.

•Mast BA, Schultz GS. Interaction of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Rep Reg.* 1996;4:411-420.

•Mauch C, Eckes B, Hunzelmann N, Oono T, Kozłowska E, Krieg T. Control of fibrosis in systemic scleroderma. *J Invest Dermatol.* 1993;100:92S-96S.

•McPherson JM, Piez KA. Collagen in dermal wound repair. En: Clark RAF, Henson PM, *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York, 1988, Plenum Press 471-496.

- Miki Y, Narayanan AS, Page RC. Mitogenic activity of cementum components to gingival fibroblasts. *J Dental Res.* 1987;66:1399-1403.
- Morales TI, Roberts AB. Transforming growth factor β regulates the metabolism of proteoglycans in bovine cartilage organ cultures. *J Biol Chem.* 1988;263(26):12828-12831.
- Moriarty KP, Crombleholme TM, Gallivan EK, O'Donnell C. Hyaluronic acid-dependent pericellular matrices in fetal fibroblasts: implication for scar-free wound repair. *Wound Rep Reg.* 1996;4:346-352.
- Morris DE, Wu L, Zhao LL, Bolton L, Roth SI, Ladin DA, Mustoe TA. Acute and chronic animal models for excessive dermal scarring: Quantitative studies. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100:674-681.
- Murawaki Y, Yamada S, Koda M, Hirayama C. Collagenase and collagenolytic cathepsin in normal and fibrotic rat liver. *J Biochem.* 1990;108:241-244.
- Numaguchi S, Okuno M, Moriwaki H, Moto Y. Modulation of collagen synthesis and degradation by retinoids and cytokines in 3T3 L1 preadipocytes. *Intern Med.* 1994;33(6):309-316.
- Nwomeh BC, Liang H, Diegelmann RF, Cohen K, Yager DR. Dynamics of the matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-8 in acute open human dermal wounds. *Wound Rep Reg.* 1998;6:127-134.
- Oono T, Specks U, Eckes B, Majewski S, Hunzelmann N, Timpl R, Krieg T. Expression of type VI collagen mRNA during wound healing. *J Invest Dermatol.* 1993;100:329-334.
- Oppenheim JJ, Kovacs EJ, Matsushima K, Durum SK. There is more than one interleukin 1. *Immunol Today.* 1986;7(2):45-56.
- Peterkofsky B, Diegelmann R. Use of a mixture of proteinase-free collagenase for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry.* 1971;10(6):988-993.
- Postlethwaite AE, Raghov R, Stricklin GP, Poppleton H, Seyer JM, Kang AH. Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1α and β . *J Cell Biol.* 1988;106:311-318.
- Postlethwaite AE. Connective tissue metabolism including cytokines in scleroderma. *Current Op Rheumatol.* 1993;5:766-772.
- Potts JR, Campbell ID. Fibronectin structure and assembly. *Curr Op Cell Biol.* 1994;6:648-655.
- Quantin B, Murphy G, Breathnach R. PUMP-1 cDNA codes for a protein with characteristics similar to those of classical collagenase family members. *Biochemistry.* 1989;28:5327-5334.
- Qwarnström EE, Järveläinen HT, Kinsella M, Ostberg CO, Sandell LJ, Page RC, Wight TN. Interleukin- 1β regulation of fibroblasts proteoglycan synthesis involves decrease in versican steady-state mRNA levels. *Biochem J.* 1993;294:613-620.
- Raghow R, Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Transforming growth factor- β increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin

messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *J Clin Invest.* 1987;79:1285-1288.

•Raghow R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *The FASEB J.* 1994;8:823-831.

•Ramachandran GN, Reddi AH. *Biochemistry of collagen.* Plenum Press, 1976, USA.

•Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Uitto J. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J Clin Invest.* 1994;94:2489-2492.

•Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff Y, Tryggvason K. High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *J Cell Biol.* 1994;124(6):1091-1102.

•Retting WJ, Erickson HP, Albino AP, Garin-Chesa P. Induction of human tenascin (neuronectin) by growth factors and cytokines: cell type-specific signals and signalling pathways. *J Cell Sci.* 1994;107:487-497.

•Rizzino A. Transforming growth factor- β : multiple effects on cell differentiation and extracellular matrices. *Develop Biol.* 1988;130:411-422.

•Roark EF, Greer K. Transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein-2 act by distinct mechanisms to promote chick limb cartilage differentiation *in vitro.* *Develop Dyn.* 1994;200:103-116.

•Rockwell WB, Cohen IK, Ehrlich HP. Keloids and hypertrophic scars: a comprehensive review. *Plast Reconstr Surg.* 1989;84:827-837.

•Rosenbloom J, Feldman G, Freundlich B, Jimenez SA. Inhibition of excessive scleroderma fibroblast collagen production by recombinant γ -interferon. *Arthritis Rheum.* 1986;29:851-856.

•Salo T, Lyons JG, Rahemtulla F, Birkedal-Hansen H, Larjava H. Transforming growth factor- β 1 up-regulates type IV collagenase expression in cultured human keratinocytes. *J Biol Chem.* 1991;266(18):11436-11441.

•Schierle HP, Scholz D y Lemperle G. Elevated levels of testosterone receptors in keloid tissue: An experimental investigation. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100:390-395.

•Schor SJ. Cell proliferation and migration on collagen substrata *in vitro.* *J Cell Sci.* 1980;41:159-175.

•Seltzer JL, Lee A-Y, Akers KT, Sudbeck B, Southon EA, Wayner EA, Eisen AZ. 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. *Exp Cell Res.* 1994;213:365-374.

•Shah M., Foreman DM, Ferguson MWJ. Neutralizing antibody to TGF- β 1,2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. *J Cell Sci.* 1994;107:1137-1157.

•Shaw LM, Olsen BR. FACIT, collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. *TIBS.* 1991;16:191-194.

•Shingu M, Nagai Y, Isayama T, Naono T, Nobunaga M, Nagai Y. The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production

by synovial cells and endothelial cells. *Clin Exp Immunol.* 1993;94:145-149.

•Soderberg T, Hallimans G, Bartholdson L. Treatment of keloids and hypertrophic scars with adhesive zinc tape. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1982;16:261.

•Takeda A, Sone Y, Sezaki K, Ui K, Uchinuma E. The expression of connective tissue growth factor in hypertrophic scars and keloids. *Wound Rep Reg.* 1998;6(5):A492.

•Tang YW. Intra and postoperative steroid injections for keloids and hypertrophic scars. *Br J Plast Surg.* 1992;45(5):371.

•Thomas DW, Hopkinson I, Harding KG, Shepherd JP. The pathogenesis of hypertrophic/keloid scarring. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1994;23:232-236.

•Tredget EE, Shen YJ, Liu G, Forsyth N, Smith C, Harrop AR, Scott PG, Ghahary A. Regulation of collagen synthesis and messenger RNA levels in normal and hypertrophic scar fibroblasts *in vitro* by interferon alfa-2b. *Wound Rep Reg.* 1993;1:156-165.

•Uitto J, Bauer EA, Eisen AZ. Scleroderma increased biosynthesis of triple-helical type I and type III procollagens associated with unaltered expression of collagenase by skin fibroblasts in culture. *J Clin Invest.* 1979;64:921-930.

•Vaalamo M, Weckroth M, Puolakkainen P, Kere J, Saarinen P, Lauharanta J, Saarialho-Kere UK. Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression in chronic and normal healing human cutaneous wounds. *Br J Dermatol.* 1996;135:52-59.

•Varedi M, Tredget EE, Scott PG, Shen YJ, Ghahary A. Alteration in cell

morphology triggers transforming growth factor- β 1, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-I expression in normal and hypertrophic scar fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 1995;104:118-123.

•Varga J, Rosenbloom J y Jimenez SA. Transforming growth factor β (TGF β) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem J.* 1987;247:597-604.

•Varga J, Jimenez SA. Modulation of collagen gene expression: its relation to fibrosis in systemic sclerosis and other disorders. *Ann Intern Med.* 1995;122:60-62.

•Vilcek J. Interferons. en *Peptide Growth Factors and Their Receptors factors and their receptors II*, Editado por Sporn M B, Roberts AB. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 3-38, 1990, Alemania.

•Wong HL, Wahl SM. Inflammation and repair. en *Peptide Growth Factors and Their Receptors factors and their receptors II*, Editado por Sporn MB, Roberts AB. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 529-530, 1990, Alemania.

•Xu J, Clark RAF. Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. *J Cell Biol.* 1996;132(1y2):239-249.

•Yamada KM. Fibronectin and other cell interactive glycoproteins. en *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Capítulo 4, Editado por Hay E., Plenum Press:111-135, 1991, U.S.A.

•Yamakage A, Kikuchi K, Smith EA, LeRoy EC, Trojanovska M. Selective upregulation of platelet-derived growth factor B in scleroderma fibroblasts. *J Exp Med.* 1992;175:1227-1234.

•Zhang K, Garner W, Cohen L, Rodriguez J, Phan S. Increased types I and III collagen and transforming growth factor- β 1 mRNA and protein in hypertrophic burn scar. *J Invest Dermatol.* 1995;104:750-754.

Cytokine Expression is Downregulated by Collagen-Polyvinylpyrrolidone in Hypertrophic Scars¹

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

^aCollagen-PVP was administered once per week

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

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

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

MATERIALS AND METHODS

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

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

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

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

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

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

RESULTS

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

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

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

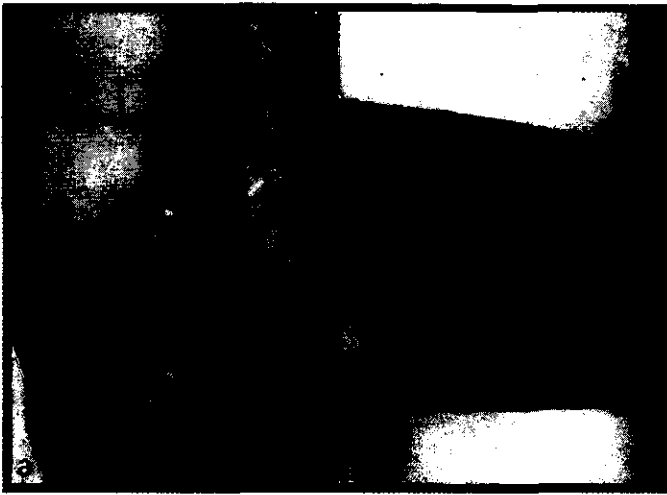


Figure 1. HSc before and after treatment with collagen-PVP. Forty-three year old female patient with HSc in the popliteal space with 2 y of evolution (a). The scar was treated for 10 wk with a weekly intralesional administration of 0.4 ml in the collagen-PVP. Note the mark of the scar is present, although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



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

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

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

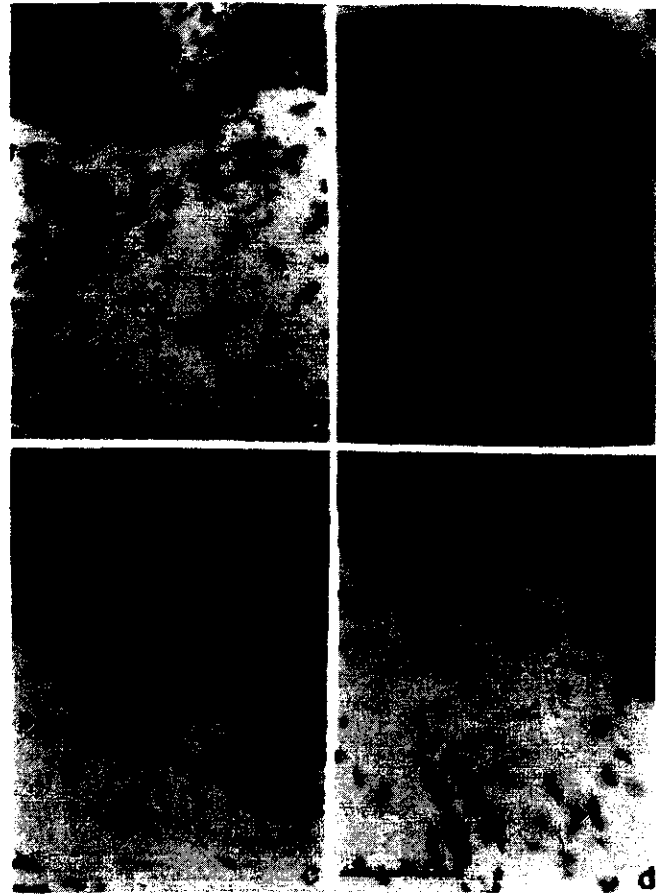


Figure 3. Immunolocalization of IL-1 β in human skin sections frozen with the immunoperoxidase technique (avidin-biotin-peroxidase system). (a) Photomicrograph of negative control; (b) photomicrograph of normal skin; (c) photomicrograph of HSc, arrows indicate immunoreactive cells; (d) photomicrograph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

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

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

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

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

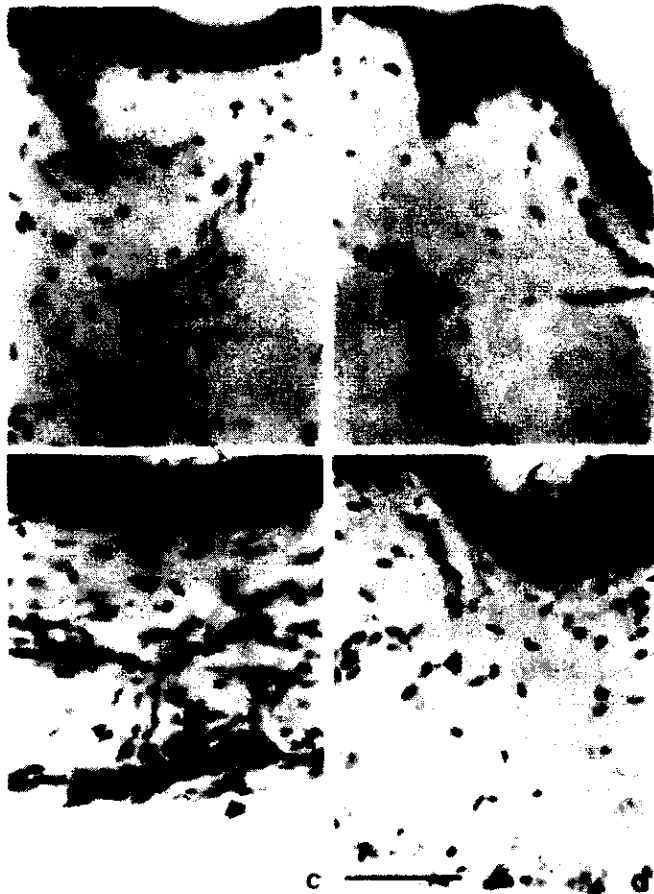


Figure 4. Immunolocalization of TNF- α in human skin sections frozen with the immunoperoxidase technique (avidin-biotin-peroxidase system). (a) Photomicrograph of negative control; (b) photomicrograph of normal skin; (c) photomicrograph of HSc, *arrows* indicate immunoreactive cells; (d) photomicrograph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

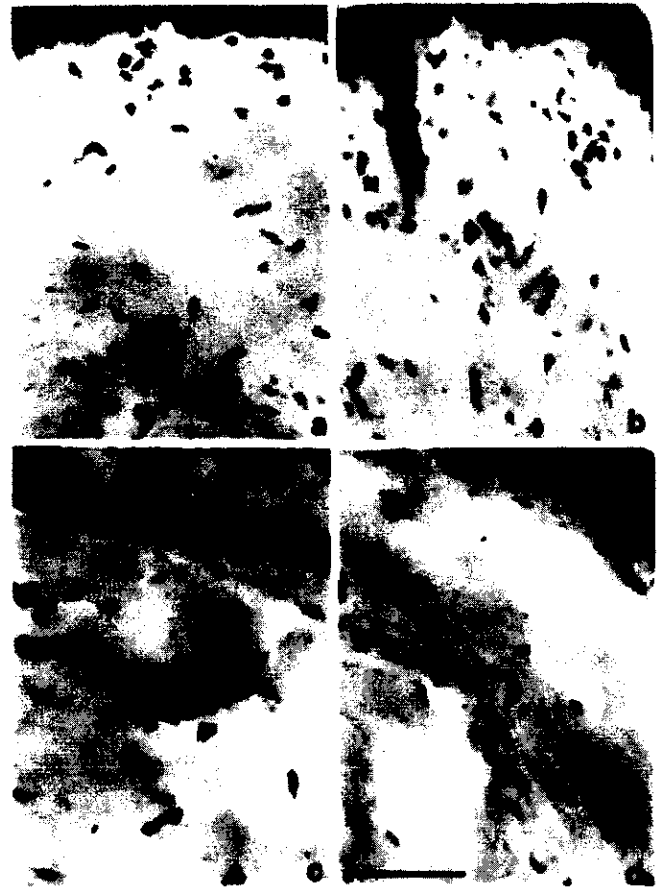


Figure 5. Immunolocalization of TGF- β 1 in human skin sections frozen with the immunoperoxidase technique (avidin-biotin-peroxidase system). (a) Photomicrograph of negative control; (b) photomicrograph of normal skin; (c) photomicrograph of HSc, *arrows* indicate immunoreactive cells; (d) photomicrograph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

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

DISCUSSION

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

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

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

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

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

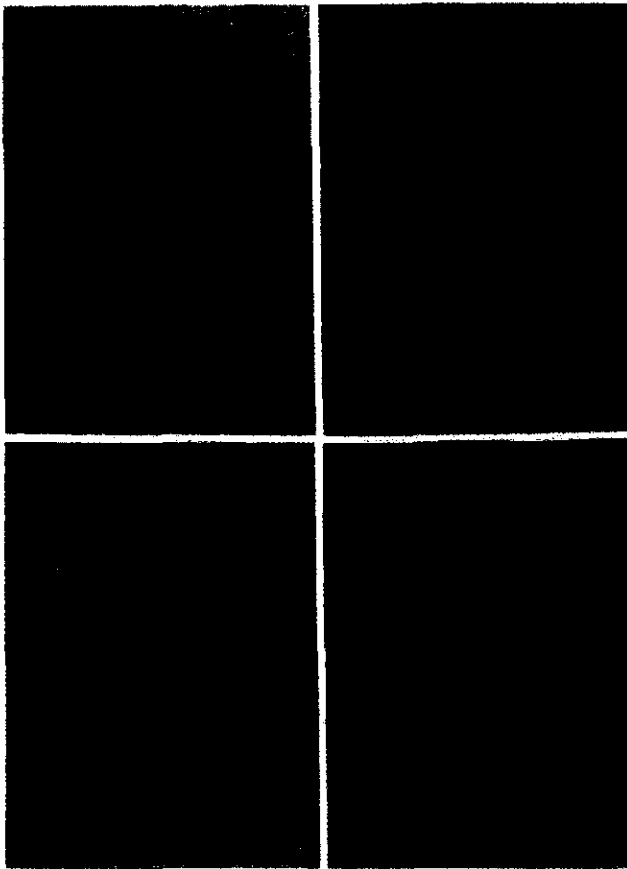


Figure 6. Immunolocalization of PDGF in human skin sections frozen with the immunoperoxidase technique (avidin-biotin-peroxidase system). (a) Photomicrograph of negative control; (b) photomicrograph of normal skin; (c) photomicrograph of HSc, arrows indicate immunoreactive cells; (d) photomicrograph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

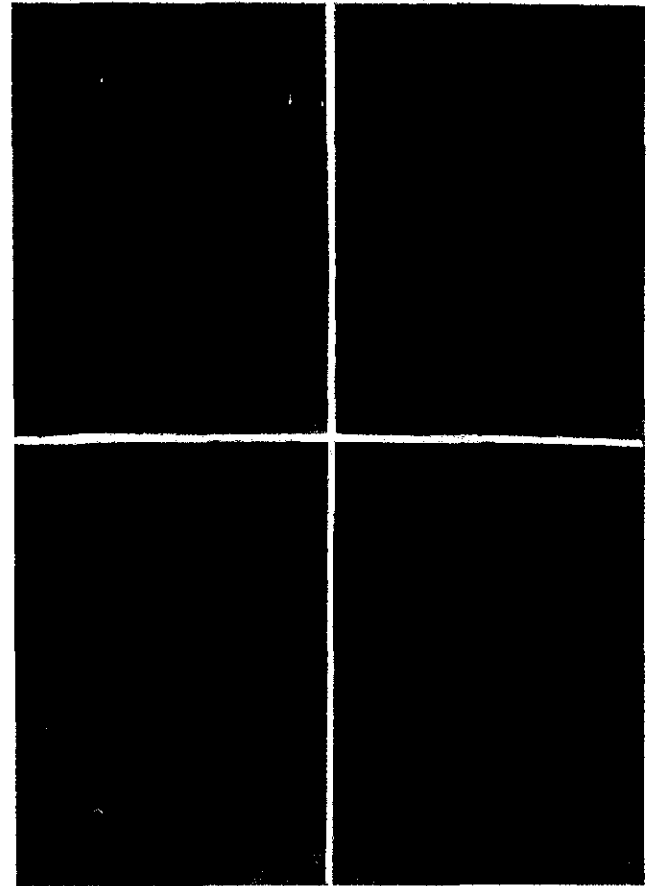


Figure 8. Human skin sections frozen with the immunoperoxidase technique (avidin-biotin-peroxidase system) using an anti-ELAM-1 as primary antibody. (a) Photomicrograph of negative control; (b) photomicrograph of normal skin; (c) photomicrograph of HSc, arrows indicate immunoreactive cells; (d) photomicrograph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

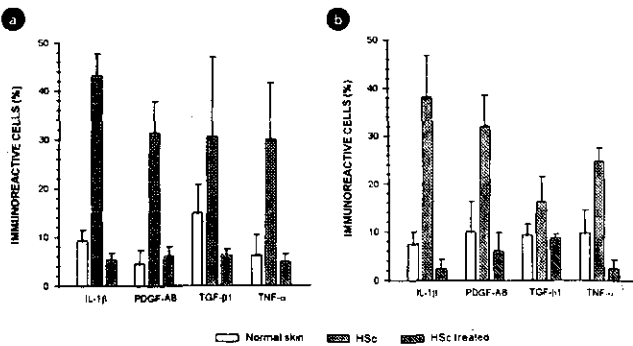


Figure 7. Collagen-PVP effect on pro-inflammatory cytokine expression in HSc. The percentage of cytokine expressing immunoreactive cells was determined for normal skin, HSc, and collagen-PVP treated HSc. Cytokine values were compared between treated and untreated samples as mentioned in *Materials and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

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

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

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

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

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

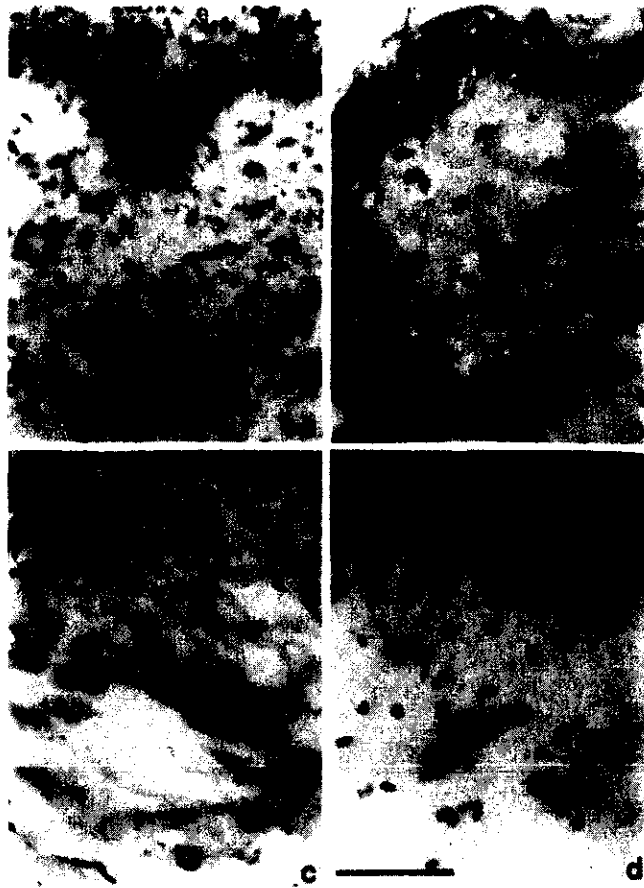


Figure 9. Human skin sections frozen with the immunoperoxidase technique (avidin-biotin-peroxidase system) using an anti-VCAM-1 as primary antibody. (a) Photomicrograph of negative control; (b) photomicrograph of normal skin; (c) photomicrograph of HSc, arrows indicate immunoreactive cells; (d) photomicrograph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

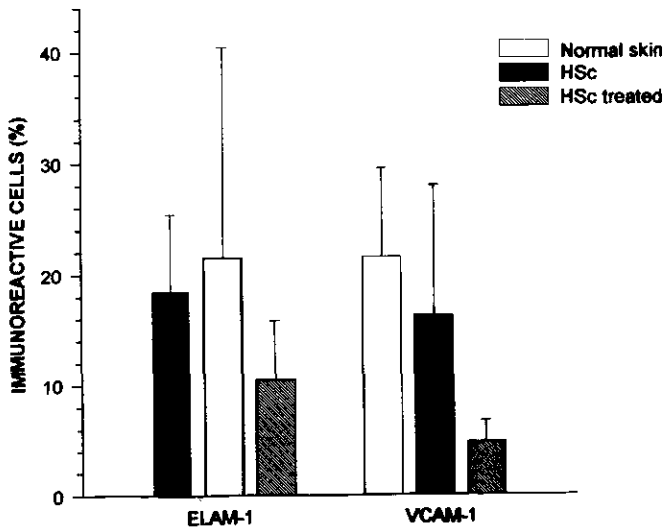


Figure 10. Collagen-PVP effect on adhesion molecule expression in treated HSc. The percentage of adhesion molecule-expressing immunoreactive cells was determined in blood vessels of normal skin, HSc, and collagen-PVP-treated HSc. Adhesion molecule values were compared between treated and untreated samples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

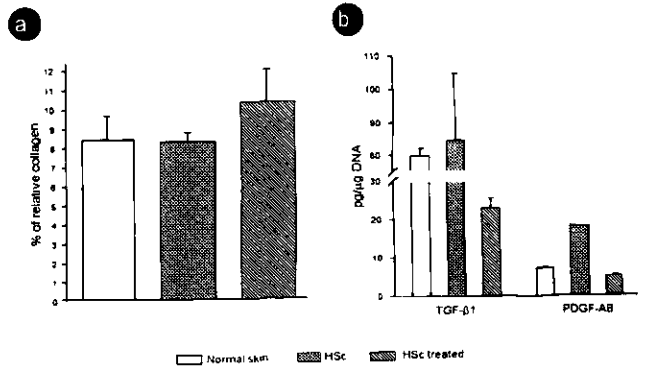


Figure 11. Fibroblasts derived from HSc treated with collagen-PVP were assayed for collagen synthesis and cytokine expression. The percentage of relative collagen was determined by [14 C]-Proline incorporation, values were compared between treated and untreated groups, but they were not significantly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

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

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

REFERENCES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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