

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología I**



**ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA EXPRESION DE
QUIMIOQUINAS EN FIBROBLASTOS DERMICOS EN
LA ESCLEROSIS SISTEMICA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Galindo Izquierdo

Bajo la dirección del doctor:
José Luíz Pablos Álvarez

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2063-3

T 24927

**Departamento de Microbiología I
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5314015345

**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA
EXPRESIÓN DE QUIMIOQUINAS EN
FIBROBLASTOS DÉRMICOS EN LA
ESCLEROSIS SISTÉMICA**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por
MARÍA GALINDO IZQUIERDO

Madrid, Octubre de 2000



BIBLIOTECA

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

El trabajo titulado “Estudio de la regulación de la expresión de quimioquinas en los fibroblastos dérmicos en la Esclerosis Sistémica” ha sido realizado por María Galindo Izquierdo bajo mi dirección.

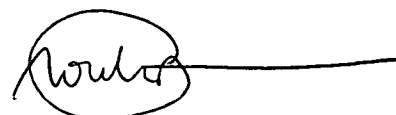
En este estudio se analizan las diferencias en el patrón de expresión basal de quimioquinas entre los fibroblastos dérmicos sanos y los procedentes de pacientes con Esclerosis Sistémica, así como en la respuesta a los estímulos redox y en su regulación.

Los resultados que se presentan demuestran que los fibroblastos dérmicos son capaces de expresar constitutivamente MCP-1 e IL-8, y que la síntesis de estas quimioquinas aumenta tras la exposición a hipoxia/reoxigenación. A diferencia de los fibroblastos sanos, aquéllos que proceden de piel esclerodérmica presentan una expresión constitutiva de MCP-1 aumentada, que no se modifica significativamente tras la exposición al estrés oxidativo y, que no parece dependiente de la activación de NF- κ B y AP-1. En ambos tipos de fibroblastos se ha demostrado que la proteína MCP-1 secretada es quimiotáctica para células mononucleares y, de manera muy heterogénea, parece estar implicada en la expresión de procolágeno α 1(I). Estos resultados se han confirmado *in vivo* por inmunohistoquímica, ya que sólo se ha observado expresión de MCP-1 en las muestras de piel esclerodérmica. La expresión de MCP-1 en estas muestras se extiende a los queratinocitos de las capas profundas de la epidermis y a las células mononucleares además de a los fibroblastos.

Por todo esto considero que el trabajo reviste las características de originalidad y calidad científica requeridas para ser defendido como Tesis Doctoral para la obtención del grado de Doctor.

Madrid, 16 de Octubre de 2000

El director de la tesis



Fdo. Dr. J.L. Pablos Alvarez

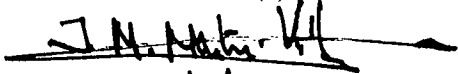
INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

EL TRABAJO TITULADO "ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA EXPRESION DE QUIMIOQUINAS EN FIBROBLASTOS DERMICOS EN LA ESCLEROSIS SISTEMICA" HA SIDO REALIZADO POR MARIA GALINDO IZQUIERDO BAJO MI DIRECCION. EN ESTE ESTUDIO SE ANALIZAN LAS DIFERENCIAS EN EL PATRON DE EXPRESION BASAL DE QUIMIOQUINAS ENTRE FIBROBLASTOS DERMICOS SANOS Y LOS PROCEDENTES DE PACIENTES CON ESCLEROSIS SISTEMICA, ASI COMO EN LA RESPUESTA A LOS ESTIMULOS REDOX Y EN SU REGULACION. LOS RESULTADOS QUE SE PRESENTAN DEMUESTRAN QUE LOS FIBROBLASTOS DERMICOS SON CAPACES DE EXPRESAR CONSTITUTIVAMENTE MCP-1E IL-8, Y QUE LA SINTESIS DE ESTAS QUIMIOQUINAS AUMENTA TRAS LA EXPOSICION A HIPOXIA/REOXIGENACION. A DIFERENCIA DE LOS SANOS, AQUELLOS QUE PROCEDEN DE PIEL ESCLERODERMICA PRESENTAN UNA EXPRESION CONSTITUTIVA DE MCP-1 AUMENTADA, QUE NO SE MODIFICA TRAS LA EXPOSICION AL ESTRES OXIDATIVO Y, QUE NO PARECE DEPENDIENTE DE LA ACTIVACION DE NF-KB Y AP-1. EN AMBOS TIPOS DE FIBROBLASTOS SE HA DEMOSTRADO QUE LA PROTEINA MCP-1 SECRETADA ES QUIMIOTACTICA PARA CELULAS MONONUCLEARES Y, DE MANERA MUY HETEROGENEA, PARECE ESTAR IMPLICADA EN LA EXPRESION DE PROCOLAGENO ALPHA1-I. ESTOS RESULTADOS SE HAN CONFIRMADO IN VIVO POR INMUNOHISTOQUIMICA, YA QUE SOLO SE HA OBSERVADO EXPRESION DE MCP-1 EN LAS MUESTRAS DE PIEL ESCLERODERMICA. LA EXPRESION DE MCP-1 EN ESTAS MUESTRAS SE EXTIENDE A LOS QUERATINOCITOS DE LAS CAPAS PROFUNDAS DE LA EPIDERMIS Y A LAS CELULAS MONONUCLEARES ADEMAS DE A LOS FIBROBLASTOS.

POR TODO ESTO CONSIDERO QUE EL TRABAJO REVISTE LAS CARACTERISTICAS DE ORIGINALIDAD Y CALIDAD CIENTIFICA REQUERIDAS PARA SER DEFENDIDO COMO TESIS DOCTORAL PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE DOCTOR.

VºBº


EL TUTOR (2)


19. Octubre 2000

Fdo.: _____
(Fecha y firma)

DNI 5377375

El Director de la Tesis


16. OCTUBRE. 2000

Fdo.: _____
(Fecha y firma)

DNI 7947062X

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO


JOSE PRIETO PRIETO, CATEDRATICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA I DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

INFORMA: Que una vez examinado el trabajo presentado por D^a MARIA GALINDO IZQUIERDO, titulado: "ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA EXPRESION DE QUIMIOQUINAS EN FIBROBLASTOS DERMICOS EN LA ESCLEROSIS SISTEMICA", este Departamento da su conformidad para que dicho Trabajo sea leído y defendido en público con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión
Consejo Departamento

26-10-2.000

El Director del Departamento



Fdo.: JOSE PRIETO PRIETO
(Fecha y firma)

26-10-2.000

Abreviaturas

6Ckine: *6-cysteine chemokine*
ADN: ácido desoxirribonucleico
AP-1: *activating protein-1*
ARN: ácido ribonucleico
BRAK: *breast and kidney derived chemokine*
BSA: *bovine serum albumin*
CHX: cicloheximida
DARC: *Duffy antigen receptor for chemokines*
DC-CK1: *dendritic-cell chemokine-1*
DEPC: dietil pirocarbonato
DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*
DTT: 1,4 ditioneitol
EDTA: *ethylenediaminetetraacetic acid*
ENA-78: *epithelial-cell-derived- neutrophil-activating peptide 78*
ES: esclerosis sistémica
FCS: *fetal calf serum*
FGF: *fibroblast growth factor*
GAG: glucosaminoglucanos
GAPDH: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
GCP: *granulocyte chemotactic protein*
GRO: *growth-related oncogene*
HCC: *hemofiltrate CC chemokine*
HEPES: *N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid*
HIF-1: *hypoxia inducible factor-1*
Hu ER p58/ ER p60: *human ER protease 58/60*
Hu IGFBP-5: *human insulin-like growth factor binding protein 5*
ICAM-1: *intercellular adhesion molecule-1*
IFN- γ : interferón-gamma
IL: interleuquina
IP-10: *interferon-inducible protein 10*
I-TAC: *interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant.*
LAK: *lymphokine activated killer cells*
LARC: *liver and activation-regulated chemokine*
LFA-1: *lymphocyte function-associated antigen-1*
LIX: *lipopolysaccharide-induced CXC chemokine*
LPS: lipopolisacárido
Ltn: linfotactina
MCP-1: *monocyte chemoattractant protein-1*
MDC: *macrophage-derived chemokine*
MEC: matriz extracelular
MIG: *monokine induced by interferon - γ*
MIP: *macrophage inflammatory protein*
NAC: N-acetil-cisteína
NAP-2: *neutrophil-activating peptide 2*

NF- κ B: *nuclear factor-kappa B*

NK: *natural killer*

PAF: *plasminogen activating factor*

PARC: *pulmonary and activation-regulated chemokine*

PBS: *phosphate buffered saline*

PDGF: *platelet derived growth factor*

PF4: *platelet-derived factor 4*

PMSF: *phenylmethylsulphonyl fluoride*

RANTES: *regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*

RLO: *radicales libres de oxígeno*

RPA: *ribonuclease protection assay*

SCYA26: *small inducible cytokine subfamily A member 26*

SDF-1: *stromal-derived factor 1*

SLC: *secondary lymphoid-tissue chemokine*

TARC: *thymus and activation-regulated chemokine*

TECK: *thymus-expressed chemokine*

TGF- β : *transforming growth factor-beta*

TIMP-3: *tissue inhibitor of metalloproteinase-3*

TNF- α : *tumor necrosis factor-alpha*

TPA: *2-O-tetradecanoilforbol 13-acetato*

VCAM-1: *vascular cellular adhesion molecule-1*

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

VIH: *virus de la inmunodeficiencia humana*

VLA-4: *very late antigen-4*

Indice

	Página
Introducción	1
1. Los fibroblastos como células centinela.....	2
2. Quimioquinas o citoquinas quimiotácticas	3
2.1. <i>Las quimioquinas o citoquinas quimiotácticas</i>	3
2.2. <i>Receptores de quimioquinas</i>	7
2.3. <i>Control de la expresión de quimioquinas</i>	9
2.4. <i>Quimioquinas e inflamación</i>	13
3. La esclerosis sistémica como modelo de enfermedad fibrosante	15
3.1. <i>Alteraciones vasculares</i>	16
3.2. <i>Alteraciones inmunológicas</i>	17
3.3. <i>Alteraciones de los fibroblastos</i>	19
4. Importancia del mecanismo de hipoxia/reoxigenación	23
 Objetivos	 26
Objetivos	27
 Material y métodos	 28
1. Material	29
1.1. <i>Células</i>	29
1.2. <i>Anticuerpos</i>	29
1.3. <i>Oligonucleótidos y sondas</i>	29
1.4. <i>Otros reactivos</i>	30
2. Métodos	31
2.1. <i>Cultivos celulares</i>	31
2.2. <i>Extracción de ARN total</i>	32
2.3. <i>Ensayo de protección de la ARNasa</i>	32
2.3.a. <i>Síntesis de ribosondas</i>	32
2.3.b. <i>Hibridación de las muestras de ARN</i>	33
2.3.c. <i>Tratamiento con la ARNasa</i>	33
2.3.d. <i>Electroforesis</i>	34
2.4. <i>Determinación de proteína MCP-1</i>	36
2.5. <i>Ensayo de quimiotaxis</i>	37

	Página
2.6. Ensayo de proliferación celular	37
2.7. Detección de NF- κ B y AP-1 por técnica de retardo en gel.....	38
2.8. Detección de ARN de colágeno (Northern Blot)	39
2.9. Inmunohistoquímica	40
2.10. Análisis estadístico	40
Resultados	41
1. Expresión de MCP-1 e IL-8 en fibroblastos dérmicos	42
1.1. Detección de ARNm de quimioquinas en fibroblastos dérmicos.....	42
1.2. Secreción de proteína MCP-1 por fibroblastos dérmicos	44
2. Activación de NF- κ B y AP-1 en la inducción de la expresión de MCP-1	48
3. Actividad quimiotáctica de MCP-1 sobre células mononucleares MonoMac1.....	49
4. Efecto autocrino de MCP-1 en la expresión de ARNm de procolágeno- α 1(I)	53
5. Efecto de MCP-1 sobre la proliferación celular en fibroblastos dérmicos	54
6. Expresión de MCP-1 en la piel de esclerosis sistémica.....	55
Discusión	56
Discusión	57
Conclusiones	64
Conclusiones	65
Referencias	66
Referencias	67

Introducción

1. Los fibroblastos como células centinela

Los fibroblastos son el componente celular más abundante del tejido conectivo de la piel y otros muchos órganos. Tradicionalmente, estas células han sido consideradas como elementos estructurales que sintetizan las proteínas de la matriz extracelular (MEC), necesarias para la integridad y reparación tisular. Este proceso de síntesis proteica es muy activo durante el desarrollo embrionario y el crecimiento. En el adulto normal, los fibroblastos son poco activos pero conservan una gran capacidad de respuesta frente a una lesión, iniciando el proceso de reparación que conduce a la cicatrización normal. Esta respuesta consiste en la migración de los fibroblastos al foco de lesión, proliferación y activación de la síntesis de proteínas de la MEC, sobre todo de colágenos fibrilares (Deuel y col., 1991). Más recientemente, se ha sugerido que los fibroblastos pueden desempeñar funciones inmunológicas, y como células residentes constituirían la primera línea de defensa del tejido conectivo, iniciando el reclutamiento de leucocitos y desencadenando una respuesta inflamatoria (Smith y col., 1997). La estimulación con sustancias derivadas de microorganismos infecciosos como lipopolisacárido (LPS) (Chakravorty y col., 1999; Huleihel y col., 1990) o con mediadores de la inflamación como el factor de necrosis tumoral (TNF- α , de *tumor necrosis factor- α*), interleuquina(IL)-1 (Chakravorty y col., 1999), IL-4 (Postlethwaite y col., 1991), IL-6 (Duncan y col., 1991), factor de crecimiento transformador (TGF- β , de *transforming growth factor- β*) (Varga y col., 1987; Raghov y col., 1987), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF de *platelet derived growth factor*) (Lynch y col., 1987), o factor de crecimiento fibroblástico (FGF, de *fibroblast growth factor*) (Gospodarowicz y col., 1991), provoca una activación de los fibroblastos seguida de la síntesis de citoquinas y factores de crecimiento solubles que participan en la respuesta inflamatoria y en los procesos de reparación tisular.

Por otra parte, los fibroblastos expresan en su superficie el antígeno CD40, miembro de la “superfamilia” del receptor de TNF- α , que es un elemento importante en la regulación de la respuesta inflamatoria y cuya expresión se activa tras la exposición a citoquinas proinflamatorias. La activación de CD40 por su ligando induce en fibroblastos la expresión de moléculas de adhesión y de quimioquinas (Fries y col., 1995; Sempowski y col., 1997). Por último, la capacidad de los fibroblastos para expresar ciclooxigenasa inducible o COX2 y de sintetizar prostanoïdes en respuesta a estímulos proinflamatorios también puede actuar como

mecanismo regulador de la respuesta inflamatoria y de la inmunoregulación, modificando el balance Th1/Th2 (Crofford y col., 1994; Wang y col., 1996).

Un aspecto importante de la participación de los fibroblastos en la respuesta inflamatoria es pues esta capacidad para recibir y responder a determinados estímulos expresando proteínas relacionadas con el tráfico celular, la síntesis de prostaglandinas, la adhesión celular y la síntesis de proteínas de la MEC. De esta manera, los fibroblastos actúan como diana para diferentes mediadores proinflamatorios y pueden influir de forma importante en la amplificación y perpetuación de los procesos inflamatorios.

2. Quimioquinas o citoquinas quimiotácticas

2.1. Las quimioquinas o citoquinas quimiotácticas

Las quimioquinas son pequeñas citoquinas que inducen una migración dirigida de diferentes tipos de leucocitos durante el desarrollo, en relación con su tráfico normal o en la respuesta inflamatoria (Luster y col., 1998; Ward y col., 1998). Aunque inicialmente las quimioquinas fueron definidas como proteínas de defensa del huésped, ejercen otras funciones que se extienden más allá de un mero control de la migración de leucocitos, como la regulación de la angiogénesis (Koch y col., 1992; Keane y col., 1997), la síntesis de colágeno (Gharaee-Kermani y col., 1996; Schneider y col., 1999), la proliferación de las células progenitoras hematopoyéticas y la agregación plaquetaria (Nagasawa y col., 1996; Abi-Younes y col., 2000). Además, desempeñan una función importante en la patogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a través de su interacción con determinados receptores de quimioquinas como el CXCR4, CCR3, y CCR5, que actúan como correceptores virales (Feng y col., 1996; Dragic y col., 1996; Choe y col., 1996).

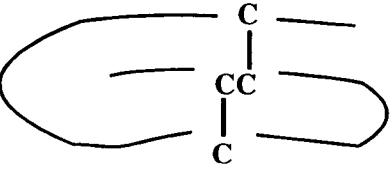
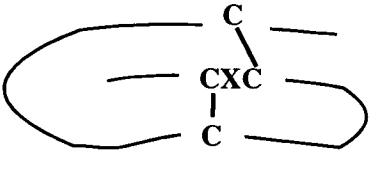
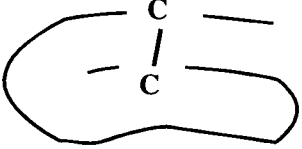
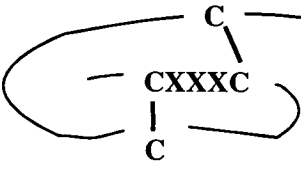
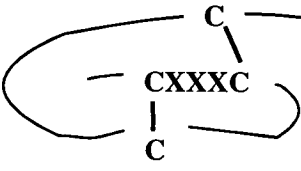
Las quimioquinas forman un grupo de proteínas de bajo peso molecular (6-15 kD), con una homología del 20 al 70 % en la secuencia de aminoácidos, y se caracterizan por la presencia de cuatro residuos de cisteína agrupados por dos puentes disulfuro. Hasta el momento, han sido descritas aproximadamente 50 quimioquinas diferentes en humanos (Luster y col., 1998; Baggiolini y col., 1997). Las quimioquinas se clasifican en cuatro familias de acuerdo con la posición de los dos residuos de cisteína más próximos al grupo aminoterminal. La gran mayoría de las quimioquinas se incluyen en dos grupos, la familia α o CXC, en la que estos residuos están separados por un aminoácido, y la familia β o CC, en la que ambos se hallan

contiguos. Las quimioquinas CXC tienen una homología del 20 al 50% en la secuencia de aminoácidos y, en humanos, sus genes se localizan en el cromosoma 4. Dentro de la familia α , aquellas que contienen la secuencia glutamato-leucina-arginina (E-L-R) previa al grupo CXC actúan como quimiotácticas para los neutrófilos y activan la angiogénesis y, aquellas que no la presentan, son fundamentalmente quimiotácticas para los linfocitos (Clark-Lewis y col., 1991). La familia de las quimioquinas CC tiene una homología del 28 al 45% y sus genes se localizan, en humanos, en el cromosoma 17. Este grupo ejerce quimiotaxis sobre monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos con una selectividad variable. Las quimioquinas CC se dividen a su vez en dos subgrupos, uno que comprende las proteínas quimiotácticas para monocitos (MCP-1,-2,-3,-4,-5) y la eotaxina, idénticas en aproximadamente un 65%, y otro formado por el resto de las β -quimioquinas (como I-309, MIP, RANTES, etc.) (Luster y col., 1997). Al igual que en la familia de las α -quimioquinas, la secuencia de aminoácidos aminoterminal previa al grupo CC determina la actividad biológica y la selectividad sobre los leucocitos. Otras quimioquinas no incluidas en estas dos familias han sido descritas, la linfotactina (Ltn) o γ -quimioquina con sólo dos grupos cisteína (Kelner y col., 1994), y la fractalquina o δ -quimioquina, una glucoproteína de membrana en la que los dos residuos de cisteína se hallan separados por tres aminoácidos (CXXXC) y en la que el dominio activo de la quimioquina se encuentra en una prolongación similar a la mucina (Bazan y col., 1997). Ambas quimioquinas actúan sobre células linfoides (células T y NK, de *natural killer*) y, además, la fractalquina es también activa sobre monocitos (Pan y col., 1997). Algunas quimioquinas, al ser secretadas, sufren un proceso proteolítico en el extremo aminoterminal que altera su actividad como es el caso de la proteína básica plaquetaria, que bajo la acción de proteasas monocíticas se transforma en NAP-2 (de *neutrophil activating peptide-2*) (Walz y col., 1990).

Las quimioquinas no son activas únicamente sobre una población de leucocitos y, en general, una determinada población de leucocitos expresa distintos receptores y responde a múltiples moléculas. Es posible que casi todas las células puedan producir algún tipo de quimioquina en determinadas condiciones. Quimioquinas como SDF-1 (de *stromal derived factor-1*) o MDC (de *macrophage-derived chemokine*) se expresan de forma constitutiva, MDC en células y órganos especializados como macrófagos, células dendríticas, timo y otros órganos linfoides (Godiska y col., 1997), y SDF-1 de manera más extendida (Pablos y col., 1999). Un grupo de quimioquinas CC descritas recientemente, que incluye TARC (de *thymus and activation-regulated chemokine*), MIP-3 β (de *macrophage inflammatory protein-3 β*),

SLC (de *secondary lymphoid-tissue chemokine*), LARC (de *liver and activation-regulated chemokine*) y DC-CK1 (de *dendritic-cell chemokine-1*), se expresa de forma constitutiva en grandes cantidades en el timo, nódulos linfáticos y otros tejidos linfoides (Yoshie y col., 1997, Adema y col., 1997). La producción constitutiva y restringida de estas quimioquinas en los tejidos linfoides y su aparente selectividad por receptores expresados por los linfocitos explica su intervención en la regulación del tráfico normal de los leucocitos en condiciones fisiológicas. No obstante, múltiples quimioquinas se expresan de forma inducible tras la activación celular como respuesta a señales inmunológicas, inflamatorias o microbiológicas. Esta distinción entre expresión constitutiva e inducible es, en ocasiones, meramente teórica ya que se superponen en determinadas condiciones, como MCP-1 (de *monocyte chemoattractant protein-1*) y MDC que siendo inducibles, aparecen de manera constitutiva en las neoplasias o en órganos linfoides respectivamente (Mantovani y col., 1999). En la tabla 1 se resumen las principales quimioquinas descritas en humanos.

Tabla 1. Quimioquinas descritas en humanos.

	<p>Eotaxina-1, -2 I-309 MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1α, 1β, 3β (ELC), 3α (LARC, exodus-1), 1δ RANTES TARC MDC TECK CK β4, β8, β9, β12, β13 HCC-1, -2, -3, -4 PARC DC-CK1 SLC 6CKine (exodus-2) SCYA26</p>
	<p>ENA 78 GRO-α, β, γ IL-8 GCP-2 NAP-2 LIX IP-10 MIG PF4 SDF-1 CK α1, α2 I-TAC BRAK</p>
	<p>Linfotactina</p>
	 <p>Fractalquina</p>

Abreviaturas: BRAK, breast and kidney derived chemokine; DC-CK1, dendritic-cell chemokine-1; ENA-78, epithelial-cell-derived neutrophil-activating peptide 78; GCP, granulocyte chemotactic protein; GRO, growth-regulated oncogene; HCC, hemofiltrate CC chemokine; IP-10, interferon-inducible protein 10; I-TAC, interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant; LARC, liver and activation-regulated chemokine; LIX, lipopolysaccharide-induced CXC chemokine; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MDC, macrophage-derived chemokine; MIG, monokine induced by interferon- γ ; MIP, macrophage inflammatory protein; NAP-2, neutrophil activating peptide 2; PARC, pulmonary and activation-regulated chemokine; PF4, platelet factor-4; RANTES, regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted; SCYA26, small inducible cytokine subfamily A member 26; SDF-1, stromal-derived factor-1; SLC, secondary lymphoid-tissue chemokine; TARC, thymus and activation-regulated chemokine; TECK, thymus-expressed chemokine.

2.2. Receptores de quimioquinas

Las quimioquinas ejercen su acción a través de receptores específicos de membrana que forman parte de la familia de la rodopsina con siete dominios transmembrana ligados a proteínas G (Murphy y col., 1994). Las quimioquinas presentan dos zonas de interacción con los receptores, una en la región aminoterminal, y otra en un asa del eje que une el segundo y tercer residuos de cisteína (Clark-Lewis y col., 1995). La zona de la región aminoterminal es esencial para la activación del receptor. Se cree que el receptor reconoce inicialmente la zona del asa, y que esta interacción es necesaria para la correcta unión al dominio de activación (Clark-Lewis y col., 1995). Aunque la mayoría de los receptores pueden unirse a más de una quimioquina, los del grupo CC reconocen sólo quimioquinas CC, y los del grupo CXC, quimioquinas CXC. Esta restricción radica en la diferencia estructural entre las quimioquinas CC y CXC, con estructuras primaria, secundaria y terciaria similares, y diferente estructura cuaternaria (Luster y col., 1998). Al igual que otros miembros de la familia de receptores ligados a proteínas G, los receptores de quimioquinas pueden activar fosfolipasas a través de dichas proteínas. La estimulación de estos receptores desencadena señales intracelulares relacionadas con la generación de inositol trifosfato, la liberación de calcio intracelular, y la activación de la protein-kinasa C (Lodi y col., 1994). La unión de las quimioquinas a sus receptores puede asimismo activar la unión de las proteínas de la familia Ras y Rho a la guanosina-trifosfato (Laudanna y col., 1996).

Los receptores de quimioquinas influyen en la movilidad y polarización celular regulando procesos dependientes de actina como cambios de membrana, formación de pseudópodos y activación de los complejos de adhesión (Sánchez-Madrid y col., 1999).

Los receptores para quimioquinas se expresan en diferentes tipos de leucocitos, bien de forma restringida a un determinado subtipo celular (i.e. CXCR1 restringido a neutrófilos), o bien de forma más amplia (i.e. CCR2 que se expresa en monocitos, células T, células NK, células dendríticas y basófilos).

Los receptores para quimioquinas pueden expresarse de forma constitutiva o inducida por activación o diferenciación de las células. Así, CCR1 y CCR2 se expresan de forma constitutiva en monocitos pero, en linfocitos, sólo tras la activación con IL-2 (Loetscher y col., 1996). Múltiples receptores varían su expresión en relación con los procesos de activación y diferenciación celular. Así, CXCR3 y CCR5 se expresan en linfocitos Th1 activados mientras que CCR3, además de expresarse en eosinófilos y basófilos, lo hace de forma preferente en linfocitos Th2 activados (Sallusto y col., 1997). Esta inducción transitoria

de ciertos receptores de quimioquinas en los leucocitos permite una amplificación selectiva de la respuesta inmune mediada por células Th1 o Th2. Algunos receptores se expresan también en células no hematopoyéticas como neuronas, astrocitos, células epiteliales y endoteliales.

Además de los receptores descritos, las quimioquinas pueden unirse a otras moléculas diferentes. El receptor eritrocitario de quimioquinas DARC (de *Duffy antigen receptor for chemokines*) se relaciona estructuralmente con los receptores descritos pero, a diferencia de éstos, no induce la entrada de calcio en la célula tras unirse a las quimioquinas CC y CXC (Horuk y col., 1993). Este receptor puede anclarse a quimioquinas y eliminarlas de la circulación. Otro grupo de receptores tienen estructura similar al proteoglicano heparán sulfato, y se unen a quimioquinas de la MEC y de la superficie de las células endoteliales (Tanaka y col., 1993).

Por último, se han descrito al menos dos estructuras de origen viral homólogas a los receptores de quimioquinas, US28 producto del citomegalovirus humano que se une a determinadas quimioquinas CC como RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β (Gao y col., 1993) y a la fractalquina (Kledal y col., 1998), y ECRF3 derivado del Herpesvirus saimiri, que se une a la IL-8 humana (Alcami y col., 1995). La tabla 2 recoge los diferentes receptores de quimioquinas descritos en humanos.

Tabla 2. Receptores de quimioquinas.

RECEPTORES	QUIMIOQUINAS
CXCR	
-1	IL-8, GCP-2
-2	IL-8, GRO- α , NAP-2, ENA-78, GCP-2
-3	IP-10, MIG, I-TAC
-4	SDF-1
-5	BCA-1
CCR	
-1	MIP-1 α , -1 β , -1 δ , RANTES, MCP-1, -2, -3, MIP-1, HCC-1
-2 a/b	MCP-1, -2, -3, -4
-3	Eotaxina 1-3, RANTES, MIP-1 α , -1 β , -1 δ , MCP-3, -4
-4	MCP-1, MIP-1 α , RANTES, TARC, MDC
-5	MIP-1 α , -1 β , RANTES, MCP-2
-6	MIP-3 α / LARC/ Exodus
-7	ELC/ MIP-3 β , 6CKine
-8	I-309, TARC, MIP-1 β
-9 (GPR-9-6)	TECK
XCR1	Linfotactina
CX₃CR1	Fractalquina
DARC	IL-8, GRO- α , NAP-2, ENA-78, RANTES, MCP-1, MCP-3
US28	MIP-1 α , RANTES, MIP-1 β , MCP-1, fractalquina
ECRF3	IL-8, GRO- α , NAP-2

No se conocen los receptores para las quimioquinas específicas de los linfocitos SLC/exodus-2 y DC-CK1/PARC.

2.3. Control de la expresión de quimioquinas

La expresión de quimioquinas varía según el tipo celular y, generalmente, es controlada a través de la transcripción. Así, en la región promotora de sus genes se han descrito zonas de unión a diversos factores de transcripción, siendo los factores de la familia NF- κ B/Rel los mejor conocidos (Ghosh y col., 1998) (Figura 1). El control de la expresión de las diferentes quimioquinas depende de múltiples factores de transcripción y esta regulación varía en función del tipo celular y del estímulo activador. Se ha descrito la intervención de NF- κ B en la activación de determinadas quimioquinas y, hasta el momento, se sabe que regula la transcripción de IL-8, MCP-1, MIP-1 α , IP-10, RANTES, GRO- α y eotaxina en diferentes tipos celulares (Ebnet y col., 1997; Agarwal y col., 1995; Weih y col., 1995; Xia y col., 1997;

Tomura y col., 1999; Jobin y col., 1999; Roebuck y col., 1999; Ping y col., 1999; Yang y col., 1998; Marumo y col., 1997; Duque y col., 1997). Aunque este es el factor mejor conocido, otros elementos reguladores están implicados en la transcripción de las quimioquinas. Los factores activados por interferón-gamma (IFN- γ) (IRF, de *IFN- γ -regulated factor*) regulan la expresión de IP-10 y RANTES (Luster y col., 1987; Lin y col., 1999). El factor nuclear activado por IL-6 (NF-IL6) regula la expresión de MIP-1 α (Matsumoto y col., 1998). Por último, otro factor de transcripción implicado en la expresión de quimioquinas es AP-1 (de *activating protein-1*). Los promotores de ciertas quimioquinas como IL-8, MCP-1 y RANTES contienen regiones de unión a AP-1 con respuesta a estímulos redox (Takeshita y col., 1995, Martín y col., 1997). La mayoría de los genes codificados por AP-1 son de “respuesta-inmediata”, es decir, genes cuya transcripción se induce rápidamente tras la estimulación celular e independientemente de la síntesis *de novo* de proteínas. Como ocurre con otros factores de transcripción, la activación de AP-1 depende del estímulo y del tipo celular. Así, se ha visto que AP-1 responde a diferentes estímulos como factores de crecimiento, citoquinas, activadores de células T, neurotransmisores, oncogenes y radiación ultravioleta.

El factor de transcripción NF- κ B se identificó inicialmente como un elemento regulador de la expresión de la cadena ligera kappa en los linfocitos B murinos (Sen y col., 1986) pero, posteriormente, se demostró su presencia en muchos otros tipos celulares. NF- κ B está formado por un dímero de proteínas de la familia rel (Tabla 3). Cada una de estas proteínas tiene una fracción aminoterminal de 300 aminoácidos conocida como dominio de homología rel. Esta región es la responsable de la unión al ADN, dimerización, e interacción con su inhibidor I κ B. Los componentes de esta familia pueden asociarse entre sí a través del dominio rel, formando homo o heterodímeros, generando una amplia diversidad de complejos que van a diferir en su potencial de transactivación y en su capacidad de unión a los diferentes consenso κ B (Fujita y col., 1992). Dentro del conjunto de proteínas que forman la familia NF- κ B/Rel, el factor NF- κ B1 (p50) (Kieran y col., 1990) puede combinarse formando homodímeros o heterodímeros con RelA (p65) (Nolan, 1991). Ambos dímeros aparecen en el citoplasma celular induciéndose la translocación al núcleo del heterodímero p50/p65 (forma activa del complejo) durante los procesos de activación celular (Baeuerle y Henkel, 1994). La regulación de la translocación nuclear de NF- κ B viene determinada fundamentalmente por dos procesos: la proteólisis de la proteína p105, precursora de p50 (Bours y col., 1990), y su unión a la familia de proteínas inhibidoras I κ B. La familia de proteínas I κ B se caracteriza por presentar entre tres y siete repeticiones de una misma secuencia de 33 aminoácidos

denominada motivo ankirina. Esta secuencia es capaz de unirse al dominio de homología rel impidiendo tanto su translocación nuclear como su unión al ADN, actuando así como principal mecanismo de regulación de los factores NF- κ B/Rel (Ghosh y col., 1998) (Tabla 3). En células no activadas, NF- κ B se encuentra en el citoplasma ligado a I κ B α e I κ B β que inhiben su entrada en el núcleo. La disociación de NF- κ B de su inhibidor I κ B requiere una serie de modificaciones de éste último: fosforilación, ubiquitinación y degradación en el proteasoma. Aunque la mayoría de las proteínas NF- κ B son transcripcionalmente activas, algunas combinaciones parecen actuar como complejos inactivos o supresores. Así, p50/p65, p50/c-rel, p65/p65, y p65/c-rel son complejos activos, mientras que los homodímeros p50 y p52 son transcripcionalmente supresores. Tanto p50 como p52 carecen del dominio variable carboxiterminal presente en las proteínas rel, y este dominio parece ser el responsable de la activación de los genes inducidos por NF- κ B (Brown y col., 1994; Plaskin y col., 1993). La forma activa de NF- κ B suele ser el heterodímero p65 (relA) y p50.

En las células no linfoides, NF- κ B actúa en la transactivación de genes inducibles por estímulos, mientras que RelB media la expresión constitutiva de estos genes en las células linfoides. En ciertas líneas de fibroblastos de ratón, RelB actúa como una proteína inducible por mitógenos (Olashaw y col., 1996). Los fibroblastos quiescentes expresan bajos niveles de RelB unido a I κ B α y, por tanto, inactivo. Tras la estimulación con PDGF, 2-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA), TNF- α y suero, se produce una activación de NF- κ B y RelB. El factor RelB ejerce una función decisiva en el desarrollo del epitelio medular, la función de las células dendríticas maduras, la organización de los órganos linfoides secundarios y la selectividad negativa del timo, mientras que en los fibroblastos frena la activación desencadenada por NF- κ B (Weih y col., 1995; Xia y col., 1997; Tomura y col., 1999; Jobin y col., 1999; Roebuck y col., 1999; Ping y col., 1999; Yang y col., 1998; Marumo y col., 1997; Duque y col., 1997; Burkly y col., 1995). Al suprimir la transactivación, RelB limita la expresión de mediadores proinflamatorios modulando la estabilidad de la proteína I κ B α . En un modelo animal de ratas genéticamente deficitarias para RelB se ha observado que desarrollan un fenotipo característico que incluye atrofia del timo con disminución del número de células dendríticas en la médula, alteración de la inmunidad celular, esplenomegalia secundaria a hematopoyesis extramedular, hiperplasia mieloide medular, y la presencia de múltiples infiltrados inflamatorios. Los fibroblastos desarrollan una expresión aumentada de IL-1 α , IL-1 β , TNF- α tras la estimulación con LPS así como una síntesis descontrolada de quimioquinas. Estos animales desarrollan un síndrome de inflamación

multiorgánica con infiltrados leucocitarios intersticiales que les provoca una muerte precoz (Xia y col., 1997). Este modelo ilustra la importancia de la síntesis de quimioquinas por los fibroblastos y su control por NF- κ B en la patogenia de la inflamación (Xia y col., 1999).

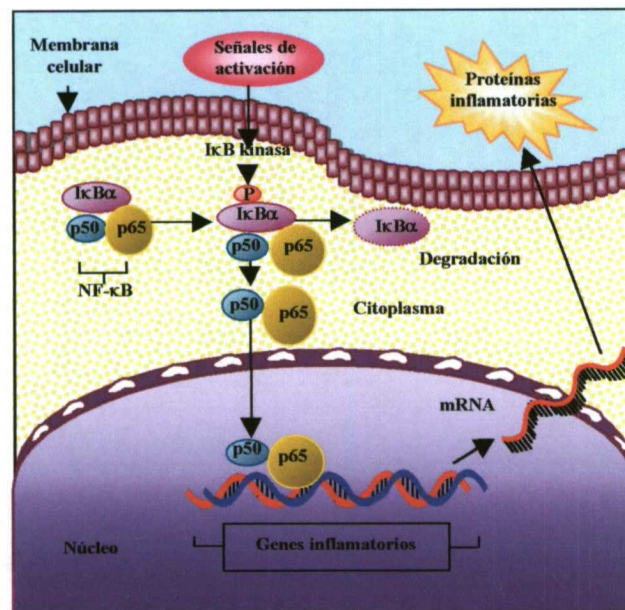


Figura 1. La activación de NF- κ B depende de la fosforilación y posterior degradación proteolítica de la proteína inhibidora I κ B por kinasas específicas. El factor NF- κ B libre (heterodímero p50/p65) entra en el núcleo, donde se une a los puntos κ B en las regiones promotoras de los genes de las proteínas inflamatorias como las citoquinas, enzimas, y moléculas de adhesión.

Tabla 3. Proteínas que componen las familias NF- κ B/Rel-I κ B.

FAMILIA NF- κ B/Rel		FAMILIA I κ B
NF- κ B1 (p50)		I κ B α
NF- κ B2 (p52)		I κ B β
Rel A (p65)		I κ B γ
Rel B (p68)		I κ B ϵ
c-Rel (p85)		Bcl3
(Precursor de p50)	p105	(Bloquea la translocación nuclear)
(Precursor de p52)	p100	(Bloquea la translocación nuclear)

2.4. Quimioquinas e inflamación

Las quimioquinas controlan el tráfico fisiológico de los leucocitos. Los leucocitos se forman en la médula ósea pero migran a otros tejidos. La circulación continua y organizada de los linfocitos a través de la sangre, tejidos y órganos linfoides arrastra a los linfocitos no activados a los nódulos linfoides. En éstos, los linfocitos se exponen al antígeno y se transforman en células activadas que pueden migrar al foco de inflamación junto a los macrófagos, eosinófilos o neutrófilos. El papel de las quimioquinas en la regulación del tráfico normal se ha demostrado en modelos animales genéticamente deficitarios para SDF-1 o eotaxina (Nagasawa y col., 1996; Rothenberg y col., 1997).

Durante la inflamación aguda se produce un aumento de la secreción de quimioquinas que resulta en un reclutamiento selectivo de leucocitos por el tejido inflamado. Estas citoquinas quimiotácticas también activan los leucocitos aumentando su capacidad de adherencia, citotoxicidad y secreción enzimática, de forma que participan decisivamente en las reacciones inflamatorias. El mayor estímulo para la producción de quimioquinas, como se expuso previamente, es la liberación precoz de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 y el TNF- α , y los productos virales o bacterianos, como LPS. Las quimioquinas contribuyen al reclutamiento de leucocitos promoviendo la interacción secuencial entre leucocitos y endotelio, e induciendo cambios estructurales en las integrinas leucocitarias (LFA-1, de *lymphocyte function-associated antigen-1* y VLA-4, de *very late antigen-4*) y la expresión de sus receptores endoteliales (ICAM-1, de *intercellular adhesion molecule* y VCAM-1, de *vascular cellular adhesion molecule-1*), lo que determina una unión de alta afinidad y la migración leucocitaria hacia el foco inflamatorio (Tanaka y col., 1993). Esto se debe a la capacidad de las quimioquinas para unirse a los proteoglicanos de la superficie endotelial y de la MEC. Esta unión les permite, por un lado, estimular a los leucocitos y al endotelio sin ser arrastradas por el flujo sanguíneo y, por el otro, crear un gradiente quimiotáctico imprescindible para dirigir el movimiento leucocitario (Baggiolini y col., 1998; Tanaka y col., 1998).

Las quimioquinas han sido implicadas en la patogenia de diferentes procesos inflamatorios en los que se ha demostrado un aumento en su expresión en el tejido lesionado, y se ha confirmado una inhibición del proceso inflamatorio al tratar con antagonistas de estas proteínas y/o de sus receptores. En la inflamación de la vía aérea por reacción de hipersensibilidad, se ha demostrado un aumento de la expresión de MIP-1 α y RANTES que se acompaña de un aflujo de eosinófilos. El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-

MIP-1 α y anti-RANTES disminuye la extravasación de eosinófilos en un 60% (Lukacs y col., 1995). En la isquemia miocárdica, la hipoxia seguida de reoxigenación induce la expresión de MCP-1 e IL-8 en las células endoteliales (Karakurum y col., 1994). En otros episodios agudos, como la neumonía bacteriana y el síndrome de distrés respiratorio del adulto, se desencadena un tráfico masivo de neutrófilos hacia el tejido lesionado y, se ha objetivado una elevada concentración de quimioquinas como IL-8 en el lavado broncoalveolar de estos pacientes (Chollet-Martin y col., 1993). En las meningitis virales, el infiltrado inflamatorio está constituido predominantemente por monocitos y linfocitos y, así, se ha demostrado un aumento en la concentración de MCP-1 e IP-10 en el líquido cefalorraquídeo de estos pacientes que se correlaciona con el grado de infiltración mononuclear (Lahrtz y col., 1997).

Los trastornos inflamatorios crónicos se caracterizan de igual modo por una expresión aumentada de quimioquinas. Existen pruebas de su participación en la patogenia de la inflamación crónica tanto en modelos animales como en humanos. Numerosos estudios demuestran su implicación en enfermedades como lesiones cutáneas inflamatorias, artritis reumatoide, fibrosis pulmonar y renal, cirrosis hepática, pancreatitis crónica, enfermedades granulomatosas, arteriosclerosis, y esclerosis múltiple. Se ha demostrado la expresión de MCP-1 por células endoteliales en lesiones cutáneas como la dermatitis liquenoide, reacciones por hipersensibilidad, y dermatitis espongíótica (Yu y col., 1994), así como por los queratinocitos en la psoriasis (Gillitzer y col., 1993). En la fibrosis pulmonar idiopática humana, los fibroblastos pulmonares sintetizan IL-8 en exceso induciendo angiogénesis (Keane y col., 1997), y existe una expresión aumentada de MCP-1 en las células epiteliales, monocitos/macrófagos, y las células endoteliales (Antoniades y col., 1992). Los fibroblastos de los granulomas hepáticos en la infección por *Schistosoma mansoni* están fenotípicamente alterados, expresan de forma constitutiva MCP-1 y MIP-1 α y desarrollan una respuesta exagerada a la exposición a citoquinas como IL-1, IFN- γ , e IL-10 (Lukacs y col., 1994). En humanos, tanto en las hepatopatías crónicas como en la cirrosis, existe una expresión aumentada de MCP-1 en las células epiteliales, células estrelladas, monocitos-macrófagos de los tractos biliares y en los nódulos de regeneración (Marra y col., 1998). En la pancreatitis crónica se ha descrito un aumento en la expresión de MCP-1 en los conductos centroacinares, endotelio, fibroblastos, macrófagos y células T (Saurer y col., 2000). También en la afectación renal intersticial con fibrosis, los fibroblastos expresan MCP-1 e IP-10 (González-Cuadrado y col., 1996). En las placas de arteriosclerosis en humanos y en modelos animales, se ha objetivado una expresión aumentada de MCP-1 (Nelken y col., 1991). En este modelo,

la ausencia genética de CCR2 reduce de forma importante la formación de placas de arteriosclerosis (Boring y col., 1998) En la esclerosis múltiple se ha demostrado un aumento en la expresión de MCP-1 en los astrocitos de las lesiones desmielinizantes activas y en las lesiones crónicas activas (Van der Voorn y col., 1999). Durante los brotes de actividad de esta enfermedad, se ha demostrado en el líquido cefalorraquídeo la presencia de niveles elevados de IP-10, Mig, y RANTES. De forma paralela, se evidencia un aumento en la expresión de CXCR3 (receptor de IP-10 y Mig) en los linfocitos así como de CCR5 (receptor de RANTES) en los linfocitos, microglía y macrófagos de las lesiones desmielinizantes (Sorensen y col., 1999). En la colitis ulcerosa se ha demostrado la presencia de IP-10, IL-8, MCP-1, y MCP-3 en células mononucleares, en estrecha relación con el grado de actividad de la enfermedad (Ugucioni y col., 1999).

Los estudios sobre el papel de las quimioquinas en la inflamación articular se han realizado fundamentalmente en artritis reumatoide. Las α -quimioquinas IL-8, ENA-78 y GRO- α , sintetizadas por los macrófagos y fibroblastos sinoviales, participan en los fenómenos inflamatorios y angiogénicos, y todas muestran actividad equiparable quimiotáctica y activadora sobre neutrófilos, y mitogénica sobre las células endoteliales. MCP-1, MIP-1 α y RANTES son las β -quimioquinas que predominan en la artritis reumatoide, y son quimiotácticas para monocitos y linfocitos T activados, así como para linfocitos B, células NK, basófilos y eosinófilos (Szekanecz y col., 1998). En modelos murinos de artritis, el tratamiento con antagonistas de MCP-1 o RANTES (MetRANTES) inhibe de forma eficaz el desarrollo de la afectación articular (Gong y col., 1997; Plater-Zyberk y col., 1997).

3. La esclerosis sistémica como modelo de enfermedad fibrosante

Las enfermedades fibrosantes constituyen un amplio capítulo de la patología humana cuyo denominador común es la lesión constituida por una acumulación excesiva de proteínas de la MEC en el tejido conectivo de un órgano. Las enfermedades caracterizadas por esta lesión son muy numerosas y, en conjunto, enormemente prevalentes (arteriosclerosis, fibrosis pulmonar, cirrosis hepática etc.). Se trata de un grupo de enfermedades crónicas que pueden afectar a distintos órganos y anular su función. Los estudios clínicos y de laboratorio sugieren que las enfermedades fibrosantes son el resultado del fracaso en el control de un proceso reparador iniciado generalmente por estímulos inflamatorios.

La esclerosis sistémica (ES) es una enfermedad multiorgánica caracterizada por la presencia de lesiones vasculares, alteraciones autoinmunes y una intensa fibrosis de los tejidos afectados. La ES es una enfermedad infrecuente pero es el modelo por excelencia de enfermedad fibrosante, ya que puede afectar prácticamente a todos los órganos y sistemas, y la fibrosis es su característica patológica más prominente (Seibold, 1989). Sus causas son desconocidas aunque comparte algunos factores etiopatogénicos con las enfermedades autoinmunes, entre las que se suele incluir. Estos factores son: 1) su ocasional asociación familiar o individual con otras enfermedades autoinmunes; 2) su relación con alelos de genes del complejo mayor de histocompatibilidad; y 3) la presencia de autoanticuerpos e infiltrados de células T activadas (Silman y col., 1996). No obstante, e independientemente de su inicio como enfermedad inflamatoria autoinmune, la característica central de la ES es una alteración del tejido conectivo que se perpetua una vez desaparecida la inflamación inicial. Esta alteración consiste en la presencia de un número anormalmente elevado de fibroblastos con una síntesis muy activa de proteínas de la MEC que se mantiene incluso *in vitro* durante sucesivas generaciones (Leroy, 1972).

3.1. Alteraciones vasculares

Las alteraciones vasculares ocurren de forma precoz en todos los pacientes con ES. Funcionalmente, la alteración más precoz es una vasoconstricción excesiva, generalmente tras exposición al frío, que clínicamente se manifiesta como fenómeno de Raynaud (Seibold, 1989). Las alteraciones orgánicas incluyen una dilatación y pérdida de capilares que puede observarse por capilaroscopia del lecho ungueal, y alteraciones microscópicas de los mismos. Estas se inician con una acumulación y agregación de los filamentos intermedios de vimentina en el citoplasma de las células endoteliales (Trotta y col., 1984). Posteriormente, las lesiones progresan hasta la destrucción endotelial con cambios secundarios en la membrana basal y lesiones proliferativas (Prescott y col., 1992). Como consecuencia del daño vascular se produce isquemia tisular y sus manifestaciones inmediatas pueden ser graves (crisis renales, necrosis digital o miocárdica). Aunque la lesión vascular precede generalmente a las otras alteraciones, las posibles relaciones causa-efecto entre las alteraciones vasculares, inmunológicas y la fibrosis no se conocen. Existen hipótesis en todos los sentidos. Así, la granzima A, un producto de las células T activadas y que está presente en el suero y la piel de pacientes con ES, podría ser el “factor citotóxico” para el endotelio (Kahaleh y col., 1986). También los monocitos y macrófagos situados subendotelialmente pueden liberar aniones superóxido, citoquinas y otras

sustancias capaces de inducir lesión endotelial y crecimiento de los fibroblastos (Kahaleh y col., 1986). Los anticuerpos anticélula endotelial pueden ser otro factor desencadenante de esta lesión, aunque no son específicos de la ES. La apoptosis de células endoteliales parece ser una lesión precoz en la patogenia de la ES aviar y humana, y ambas comparten la presencia de anticuerpos anticélula endotelial (Sgonc y col., 1996). *In vitro*, estos anticuerpos inducen liberación de IL-1 en las células endoteliales, adhesión leucocitaria, y apoptosis (Carvalho y col., 1996; Bordron y col., 1998).

En sentido contrario, y a favor de una alteración en la respuesta inmunológica inducida por la lesión vascular, está la hipótesis recientemente descrita por Casciola-Rosen (Casciola-Rosen y col., 1997). La hipoxia, en presencia de metales, generaría radicales libres de oxígeno (RLO) capaces de fragmentar específicamente determinados autoantígenos característicos de la ES como los antitopoisomerasa (Scl70), o los antipolimerasas del ARN (RNA pol II, NOR 90 y U1RNP), convirtiéndolos en inmunogénicos (Casciola-Rosen y col., 1997). Curiosamente, la fibrilarina, un autoanticuerpo característico de la ES es resistente a la modificación por los RLO pero es sensible a la exposición al mercurio que puede transformarlo en un inmunógeno (Pollard y col., 1997). Por tanto, los autoanticuerpos de la ES podrían no ser patogénicos sino secundarios a la fragmentación de una proteína por la exposición a RLO o determinados tóxicos. La hipoxia y los RLO son además capaces de generar una respuesta inflamatoria mediante la activación del factor de transcripción NF- κ B en células endoteliales y fibroblastos, promoviendo la transcripción de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión (Shreeniwas y col., 1992; Denton y col., 1998).

En la ES hay una disminución en la respuesta angiogénica de causa desconocida tras la lesión endotelial. Un posible factor implicado en este fenómeno es TGF- β que es un inhibidor del crecimiento endotelial (Baird y col., 1986). También existen pruebas *in vivo* e *in vitro* de activación plaquetaria. Sin embargo, esta activación parece un fenómeno secundario al daño endotelial y su importancia patogénica no se ha determinado.

La causa primaria de la lesión endotelial es aún desconocida, habiéndose postulado causas genéticas, de forma similar al fenómeno de Raynaud idiopático, o adquiridas como la exposición a tóxicos, virus o, como hemos señalado, las alteraciones autoinmunes.

3.2. Alteraciones inmunológicas

La alteración inmunológica mejor conocida en la ES es la presencia en el suero de autoanticuerpos, algunos muy específicos de esta enfermedad como los anticentrómero, Scl-70 o

los antipolimerasas de ARN (Steen y col., 1984; Douvas y col., 1979). Los autoanticuerpos son buenos marcadores de algunos subgrupos clínicos pero, hasta ahora, no se ha demostrado ninguna relación patogénica entre éstos y la fibrosis. También se produce autorreactividad celular frente a numerosos componentes del tejido conectivo como los colágenos, la laminina o los propios fibroblastos, pero su significado patogénico es también desconocido (Huffstutter y col., 1985). La causa de la generación de estos autoanticuerpos tampoco se conoce. Se ha descrito mimetismo molecular y posible inmunogenicidad cruzada de algunos de los autoanticuerpos de la ES con determinados retrovirus (Maul y col., 1989; Douvas y col., 1994). Como hemos señalado, también es posible que los tóxicos junto con la hipoxia y los RLO modifiquen antigénicamente algunas de estas proteínas transformándolas en autoantígenos.

En las fases precoces de la enfermedad existen infiltrados dérmicos de linfocitos T activados (DR+), predominantemente CD4, y de monocitos. Algunos estudios han demostrado cierta selección del repertorio de células T en la piel, lavado broncoalveolar o sangre periférica de pacientes con ES, particularmente del grupo de células con receptor γ/δ . Esto sugiere la influencia de un antígeno en la generación de esta respuesta celular, pero aún no existen candidatos conocidos. Las células T que utilizan la región V δ 1+ son las que se han encontrado expandidas de forma más consistente en los diferentes estudios (White, 1996). El subtipo predominante de células T es el Th2 ya que hay un elevado porcentaje de células CD4+ CD30+ en la piel de la ES capaces de sintetizar y liberar IL-4 pero no IFN- γ (Mavalía y col., 1997). La mayoría de los autores sostienen hipótesis que relacionan las alteraciones inmunológicas con la fibrosis y el daño vascular mediante la acción de mediadores solubles. Así, IL-4, IL-1, y sobre todo TGF- β (Gruschwitz y col., 1990) tienen un efecto “profibrótico”, e IFN- γ “antifibrótico” (Elias y col., 1990). Este último factor se ha encontrado disminuido en el suero o las células mononucleares de pacientes con ES (Kantor y col., 1992). También, como se ha señalado previamente, la activación de las células B y T, los anticuerpos anticélula endotelial, o la secreción de IL-2 pueden dañar directa o indirectamente las células endoteliales. Por ejemplo, la IL-2 puede inducir la activación de células NK o LAK (de *lymphokine activated killer cells*), produciendo lesión endotelial directamente o a través de la granzima A (Caligiuri y col., 1993). Sin embargo, las citoquinas o productos de activación de las células inflamatorias detectados en la ES no son específicos de ésta y aparecen en múltiples enfermedades inflamatorias no acompañados de fibrosis.

Otro tipo celular presente en las lesiones fibróticas de la ES, como en otras muchas enfermedades fibrosantes, son los mastocitos o células cebadas. Su número y degranulación son excesivos en la dermis de pacientes con ES, incluso antes de que aparezca la fibrosis (Seibold y col., 1990). La triptasa es una potente proteasa con capacidad para lesionar el endotelio, y la histamina induce la proliferación y la síntesis de proteínas de la MEC en los fibroblastos, y puede provocar la retracción de las células endoteliales. Su relación con las alteraciones vasculares, inmunológicas y con la fibrosis es mal conocida. Sin embargo, su presencia es una constante en múltiples enfermedades fibrosantes, lo cual sugiere una estrecha conexión de estas células con la fibrosis.

3.3. Alteraciones de los fibroblastos

La alteración más directamente relacionada con la fibrosis es la observada en los fibroblastos, y consiste en una actividad exagerada de síntesis y secreción de proteínas de la MEC (Leroy, 1972). Este aumento no se acompaña de un aumento paralelo de las enzimas que degradan estas proteínas, produciéndose una acumulación excesiva (Takeda y col., 1994). Las causas de esta hiperproducción no se conocen y, la mayoría de las hipótesis plantean que es el efecto de la exposición de los fibroblastos a los factores vasculares o inflamatorios señalados anteriormente, aunque no se ha excluido un defecto primario de éstos.

Los fibroblastos son células mesenquimales características del tejido conectivo de la piel y otros muchos órganos, y tienen como función sintetizar las proteínas que constituyen la MEC. Morfológicamente, los fibroblastos de la ES aparecen como células activas, con ensanchamiento del retículo endoplásmico rugoso, mayor citoplasma, y numerosas vesículas secretoras adheridas a la membrana. Esto se acompaña de una síntesis incrementada de varios componentes de la MEC como colágeno de los tipos I, III, V, VI y VII, fibronectina, decorina y glucosaminoglucanos (Tabla 4). La activación de estos fibroblastos se produce por un aumento transcripcional que se mantiene tras varios pases de los cultivos celulares *in vitro* en ausencia de estímulos externos (Leroy, 1972).

La síntesis de fibras de colágeno es un proceso enormemente complejo, con múltiples modificaciones postranslacionales, intra y extracelulares, hasta llegar a la formación de fibras maduras (Fleischmajer y col., 1990). El elemento de control más importante de todo este proceso, tanto en el desarrollo y reparación normales como en patología, es la transcripción de los genes de procolágeno (Slack y col., 1993). Hasta ahora, en los fibroblastos de la ES, se ha detectado una activación de algunos de estos elementos (*nuclear factor-1*, NF-1; Sp1 o AP-1)

pero no alteraciones intrínsecas en su función, por lo que se ha sugerido que la activación transcripcional se produciría por la actuación de factores de transcripción activados en respuesta a influencias externas, tales como TGF- β u otros mediadores solubles (Kikuchi y col., 1992).

Tanto en la piel normal como en la esclerodérmica, existe una mezcla heterogénea de fibroblastos en cuanto a actividad transcripcional basal de los genes de procolágeno, que se traduce en una síntesis variable de proteína (Kahari y col., 1988). Los experimentos de hibridación *in situ* con sondas de procolágenos tipo I, III, o VI confirman esta heterogeneidad *in vivo* (Kahari y col., 1988; Peltonen y col., 1990). Estos mismos experimentos demuestran que la alteración más importante en la ES respecto a la piel normal es un aumento en el número de fibroblastos con niveles elevados de ARNm de dichas proteínas. Existen dos teorías para explicar este fenómeno desde el punto de vista celular. Una supone el reclutamiento mediante la activación transcripcional de fibroblastos con tasas transcripcionales previamente más bajas. La teoría alternativa supone una expansión en el número de fibroblastos con alta actividad transcripcional de forma constitutiva, mediante su proliferación selectiva (Botstein y col., 1982; Jelaska y col., 1996). Tanto el crecimiento selectivo como la activación transcripcional se han tratado de explicar en relación con las otras alteraciones fisiopatológicas observadas en esta enfermedad. Las diferentes hipótesis sugieren que los mediadores de origen vascular, endotelio-plaquetario, y de las células inflamatorias y mastocitos influirían sobre los fibroblastos, cambiando su programa de crecimiento y/o su regulación transcripcional de forma persistente. También, las relaciones intercelulares o con la MEC a través de receptores de membrana influyen sobre la conducta de los fibroblastos y podrían participar en la fisiopatología de la fibrosis, aunque los estudios sobre este aspecto son más escasos (Eckes y col., 1993).

Las alteraciones descritas en los fibroblastos de la ES son múltiples, así como las pruebas de un posible efecto de diferentes mediadores sobre los mismos (Tabla 4). El factor más prevalente en todos los modelos experimentales o teóricos es TGF- β . Este factor es un potente activador transcripcional de los genes de procolágeno y de otros múltiples genes de la MEC (Roberts y col., 1988; Varga y col., 1987). Este efecto de activación puede ejercerlo a través de regiones NF-1 y Sp-1 de los promotores (Rossi y col., 1988; Inagaki y col., 1994). El factor TGF- β también activa la expresión de enzimas proteolíticas que actúan sobre las proteínas de la MEC, e inhibe la expresión de sus inhibidores TIMP-3, de *tissue inhibitor of metalloproteinase-3*, (Mattila y col., 1998), con un efecto global intensamente profibrótico (Edwards y col., 1987). *In vitro*, TGF- β no tiene efectos proliferativos sobre los fibroblastos pero, *in vivo*, la situación es más compleja, ya que TGF- β puede inducir la producción autocrina de PDGF, que es un

mitógeno para los fibroblastos (Leof y col., 1986; Ishikawa y col., 1990). Un efecto *in vivo* de ambos factores sobre los fibroblastos de la ES ha sido sugerido por datos indirectos de diversos estudios (Gruschwitz y col., 1990; Hitraya y col., 1998; Varga y col., 1987; Yamakage y col., 1992).

Una interpretación global del efecto sobre los fibroblastos del nuevo medio creado en la dermis esclerodérmica por las alteraciones vasculares e inflamatorias y los mediadores solubles es muy difícil. No se conoce qué factor o combinación de factores son responsables del fenotipo observado en los fibroblastos esclerodérmicos. Muchos de los factores propuestos, incluido TGF- β , no son específicos de la ES y están presentes en la piel en otras enfermedades vasculares o inflamatorias no fibrosantes (Gruschwitz y col., 1990). Por otra parte, el cultivo de los fibroblastos en monocapa sobre plástico, se aleja mucho de su ambiente natural *in vivo* en contacto con otras células y con una matriz tridimensional compleja. Este tipo de influencias son fundamentales en la regulación de la proliferación y expresión de proteínas de MEC por los fibroblastos que son el objeto de los estudios (Ivarsson y col., 1993; Eckes y col., 1993).

Tabla 4. Alteraciones observadas en fibroblastos cutáneos de ES.

	Referencias bibliográficas
<i>In vivo</i>	
Retículo endoplásmico rugoso prominente	Bailey y col., 1988
↑ Procolágeno $\alpha 1$ (I), $\alpha 1$ (III), $\alpha 2$ (VI)	Kahari y col., 1988; Peltonen y col., 1990
↑ TGF- β	Gruschwitz y col., 1990
↑ Receptor de PDGF- β	Klareskog y col., 1990
↑ CTGF	Oemar y col., 1997
↑ ICAM	Majewski y col., 1991
<i>In vitro</i>	
↑ Colágenos I, III, V, VII	Leroy, 1972; Fleischmajer y col., 1981
↑ Fibronectina	Eckes y col., 1993; Feghali y col., 1999
↑ Receptor de fibronectina	Feghali y col., 1999
↑ β tubulina	Feghali y col., 1999
↑ Glucosaminoglucanos	Bashey y col., 1984
Acido hialurónico	Bashey y col., 1984
Osteonectina	Vuorio y col., 1991
↑ IL-6	Feghali y col., 1992
↑ IL-1	Kawaguchi y col., 1994
↑ receptor de IL-1	Kawaguchi y col., 1992
↑ TGF- β	Vuorio y col., 1991
↑ c-myc	Feghali y col., 1993
↑ ICAM-1	Abraham y col., 1991
↑ Colagenasa	Takeda y col., 1994
↑ Endotelina-1	Kawaguchi y col., 1994
Diferente respuesta proliferativa al suero fetal	Feghali y col., 1992
PDGF	Leroy y col., 1982
TGF- β	Leroy y col., 1982
Diferente respuesta transcripcional a TGF- β	Kikuchi y col., 1992
Diferente respuesta al receptor de TGF- β	Kawakami y col., 1998
Diferente regulación transcripcional en matrices tridimensionales	Eckes y col., 1993
↑ Hu IGFBP-5 (<i>human insulin-like growth factor binding protein 5</i>)	Feghali y col., 1999
↑ Hu acylCoA colesterol acyltransferasa (<i>human acyl coenzyme A</i>)	Feghali y col., 1999
↑ Fibrosina	Feghali y col., 1999
↑ Proteasa nexina 1	Feghali y col., 1999
↑ Hu ER p58/ ER p60 (<i>human ER protease 58/60</i>)	Feghali y col., 1999

4. Importancia del mecanismo de hipoxia/reoxigenación

La hipoxia y la generación de RLO son factores presentes en la patogenia de una amplia variedad de patologías. Así, las células en hipoxia de determinados tumores sólidos provocan un fracaso terapéutico en la radioterapia convencional y en algunas formas de quimioterapia. Los RLO participan en el inicio de la respuesta inflamatoria y reparadora durante la cicatrización, y en trastornos vasculares e inflamatorios. Gran parte del potencial patogénico de la hipoxia se debe a la generación de RLO por acción de la xantina oxidasa. Durante la isquemia, la adenosina trifosfato se convierte en hipoxantina y xantina, y la xantina dehidrogenasa endotelial en xantina oxidasa. La xantina oxidasa convierte la hipoxantina en xantina y ácido úrico con la liberación de radicales superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (OH).

Los cambios en el estado redox inducidos por la hipoxia y reoxigenación desempeñan un papel fundamental en la activación de moléculas de transcripción intracelulares. Así, se sabe que la activación de factores de transcripción como AP-1 (Abate y col., 1990), NF- κ B (Matthews y col., 1992), c-Myb (Myrset y col., 1993) y p53 (Hainaut y col., 1993) es dependiente de la generación de RLO. Otro factor de transcripción, específicamente inducible por la hipoxia, es HIF-1 (de *hypoxia induced factor-1*). Este factor interviene en la activación de determinados genes como los de la eritropoyetina, transportadores de glucosa, enzimas glucolíticas y del factor de crecimiento derivado del endotelio vascular (VEGF, de *vascular endothelial growth factor*) (Semenza y col., 1999). Aunque se desconoce cual es el mecanismo último por el que se activan estos factores, se ha descrito la implicación de protein-tirosin kinasas (Schieven y col., 1993), protein-kinasas activadas por mitógenos (Schieven y col., 1993) y la movilización de calcio intracelular (Guyton y col., 1996). Uno de los mecanismos precoces de activación inducido por la hipoxia es la fosforilación de la tirosina I κ B α que potencia la unión de NF- κ B al ADN (Koong y col., 1994). Diferentes factores de crecimiento como PDGF, FGF, factor activador del plasminógeno (PAF, de *plasminogen activating factor*), TNF, IL-1, IL-6, y endotelina están implicados en la proliferación y activación celular inducidas por la hipoxia (Dawes y col., 1994; Kuwabara y col., 1995; Arnould y col., 1993; Caplan y col., 1992; Hempel y col., 1996; Roth y col., 1996). Los factores PDGF y PAF intervienen en la actividad quimiotáctica y en la proliferación de los fibroblastos pulmonares de ratas estimulados con los sobrenadantes de los cultivos de células endoteliales sometidas a hipoxia. El tratamiento con anticuerpos

neutralizantes anti-PDGF o anti-endotelina 1 reduce de forma significativa la proliferación de los fibroblastos inducida por la hipoxia (Dawes y col., 1994; Kuwabara y col., 1995). Así pues, la hipoxia induce la proliferación celular y la síntesis *de novo* de IL-6 e IL-8 en los fibroblastos y células musculares lisas vasculares de pulmón a través de PDGF y PAF (Tamm y col., 1998).

La activación de NF- κ B es un ejemplo del potencial proinflamatorio de los RLO ya que muchos genes inducibles por el estrés se expresan a través de dicha activación. De esta manera también se ha descrito una inducción, en presencia de RLO y dependiente de NF- κ B, de la expresión y síntesis de quimioquinas como IL-8 y MCP-1 en procesos inflamatorios (Blake y col., 1994; Xu y col., 1996; Ono y col., 1999). Una característica común a la expresión precoz de estos genes, a través de la activación de NF- κ B, es que no requiere la síntesis *de novo* de proteínas. Conocer pues el mecanismo de la activación de NF- κ B por la hipoxia tiene importantes implicaciones no sólo en la replicación del VIH favorecida en condiciones de baja concentración de oxígeno, sino por la regulación de los genes que contienen puntos de anclaje a NF- κ B, importantes en la respuesta inmune y en la angiogénesis (TNF- α , IL-2, IL-6, VCAM-1).

En la actualidad existe escasa información acerca del papel de las quimioquinas en la ES y, particularmente, en relación con los fibroblastos. En estos pacientes, se han descrito niveles elevados de IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β y MCP-1 en el suero y una elevada síntesis de estas quimioquinas por células mononucleares de sangre periférica (Hasegawa y col., 1999). Por otra parte, en pacientes con ES y alveolitis se han encontrado niveles aumentados de IL-8, MIP-1 α y RANTES en el lavado bronquioalveolar (Bolster y col., 1997). Sin embargo, no se ha estudiado el posible papel de los fibroblastos en la síntesis de estas quimioquinas. Los fibroblastos esclerodérmicos, como se ha descrito previamente, presentan un fenotipo característico (Tabla 4) y responden de forma particular a los estímulos proinflamatorios. Por otra parte, la ES se considera como una enfermedad primariamente vascular en la que el mecanismo de hipoxia/reoxigenación parece ser el factor desencadenante y perpetuador de la respuesta inflamatoria y de la activación de los fibroblastos.

La hipótesis que planteamos en este trabajo es que los fibroblastos, al actuar como células centinela, pueden desencadenar una respuesta inflamatoria sintetizando quimioquinas tras la activación con estímulos de tipo redox. En la ES, los cambios redox provocados por los ciclos repetidos de hipoxia/reoxigenación actuarían como agente proinflamatorio activando los

fibroblastos y, por tanto, induciendo la síntesis de quimioquinas. La exposición crónica a RLO puede ser la causa de la activación de los fibroblastos dérmicos en la ES y de la síntesis de quimioquinas, participando así en las respuestas inflamatoria y fibrótica propias de esta entidad.

Objetivos

Objetivos

El presente trabajo ha tenido como objetivos los enumerados a continuación:

1. Estudiar la capacidad y el patrón de expresión de quimioquinas por los fibroblastos dérmicos adultos sanos.
2. Identificar la posible regulación de la expresión de estas quimioquinas en relación con cambios redox, fundamentalmente a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B.
3. Estudiar el potencial biológico de las quimioquinas, sintetizadas por los fibroblastos sobre la quimiotaxis de células inflamatorias, como sobre la proliferación y síntesis de colágeno en fibroblastos.
4. Identificar posibles diferencias entre los fibroblastos dérmicos sanos y los procedentes de pacientes con ES en el patrón de expresión de quimioquinas, en la respuesta al estímulo redox y en la regulación de dicha expresión.
5. Por último, confirmar la expresión *in vivo* de quimioquinas por los fibroblastos dérmicos en secciones de piel normal y esclerodérmica.

Material y métodos

1. Material

1.1. Células

Los fibroblastos dérmicos se obtuvieron de muestras de piel de individuos sanos tomadas del dorso de manos y antebrazos de los bordes sanos de intervenciones cosméticas y de pacientes diagnosticados de ES. Estos pacientes cumplían los criterios de diagnóstico para ES de acuerdo con el ACR (*American College of Rheumatology*) (Subcommittee for Scleroderma Criteria, 1980). Ambos grupos fueron similares en la edad y el sexo de los individuos. En total se analizaron muestras procedentes de 7 controles sanos y de 8 pacientes con ES. Los explantes se prepararon fragmentando las muestras de piel en placas de cultivo de seis pocillos con fondo plano (Nalge Nunc International, Denmark). Las células crecieron en monocapa, adheridas a la superficie de las placas de cultivo. Los experimentos se realizaron con fibroblastos dérmicos procedentes de cultivos entre los pases 2 y 9.

Las células MonoMac1 son una línea de células monocíticas (DSM ACC252; German Microorganism and Cell Culture Collection, Braunschweig, Germany), con capacidad para migrar en respuesta a la presencia de MCP-1 vía receptor CCR2 tal y como se ha demostrado previamente (Frade y col., 1997).

1.2. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

- α -MCP-1 monoclonal, 1 μ g/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN);
- α -MCP-1 policlonal de cabra (Immugenex Corp., Los Angeles, CA);
- α -p50 policlonal de conejo (cedido por Dr. R.T. Hay);
- α -p65 policlonal de conejo (C-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA);
- α -c-rel policlonal de conejo (cedido por Dr. N. Rice).

1.3. Oligonucleótidos y sondas

Los oligonucleótidos utilizados fueron:

Para NF- κ B (Bio-Synthesis, CA), se empleó el doble consenso NF- κ B, tal y como se encuentra en la región activadora de la transcripción (*enhancer*) del VIH con la siguiente secuencia:

5' AGCT TAC AAG GGA CTT TCC GCT GGG GAC TTT CCA GGG A
ATG TTC CCT GAA AGG CGA CCC CTG AAA GGT CCC TTCGA 3'.

Los oligonucleótidos de ADN utilizados en la detección del complejo AP-1 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) contienen el consenso AP-1, tal y como se encuentra en el gen de la colagenasa humana (Westwick y Brenner, 1995). Su secuencia es:

5' GTAAAGCATGAGTCAGACCCTC
ATTTCGTA CT CAGTCTGTGGAGG 5'

Para el ensayo de protección de la ARNasa se utilizó una ribosonda múltiple comercial que detecta diferentes quimioquinas y receptores de quimioquinas, *RiboQuant[®] Multi-Probe RNase Protection Assay System* (RiboQuant[®], Pharmingen, San Diego, CA). La primera combinación incluía sonda correspondiente a Ltn, RANTES, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, IL-8, I-309, y a dos genes constitutivos de las células (GAPDH, de *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, y L32) como controles internos. La ribosonda para receptores de quimioquinas incluía las sondas correspondientes a STRL33, US28, CCR3, CCR5, CXCR4, CCR8, GPR15, GPR1, V28, CCR2b, y a los genes constitutivos GAPDH y L32.

1.4. Otros reactivos

- Como factor activador de la expresión de quimioquinas se utilizó TNF- α recombinante humano a diferentes concentraciones, 10, 25 y 50 U/ml (Genzyme, Cambridge, MA).
- Como inhibidor de la generación de RLO se utilizó N-acetil-cisteína (NAC) 25 mM (Sigma, St Louis, MO).
- Como inhibidor de la síntesis de proteínas se utilizó cicloheximida (CHX) 10 μ g/ml (Sigma).
- Para el ensayo de proliferación celular en respuesta a MCP-1 se utilizó la proteína rhMCP-1, de *monocyte chemoattractant protein 1 recombinant human E. Coli-derived* (R&D Systems).

- Como marcador de la sonda de ARN en el ensayo de protección de la ARNasa se utilizó [α - 32 P]UTP 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml (Amersham Pharmacia Biotech). Como marcador de proliferación celular, se utilizó [3 H] timidina 1 μ Ci/ml (Amersham Pharmacia Biotech).

2. Métodos

2.1. Cultivos celulares

Los fibroblastos dérmicos crecieron en DMEM (de *Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con antibióticos, penicilina 500 U/ml y estreptomina 500 μ g/ml, L-glutamina 2mM y suero de ternera fetal (FCS, de *fetal calf serum*) al 10%. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de normoxia con una atmósfera de O₂ al 21%, N₂ al 77% y CO₂ al 5%, a 37°C de temperatura. Como control positivo para la expresión de ARNm de quimioquinas, los fibroblastos fueron tratados con TNF- α recombinante humano durante 6 horas a diferentes concentraciones, 10, 25 y 50 U/ml.

La exposición a hipoxia de los fibroblastos en cultivo se realizó en una incubadora para anaerobiosis con una atmósfera de O₂ al 3%, CO₂ al 5% y N₂ al 92%. Al alcanzar los fibroblastos el estado de confluencia, se mantuvieron al menos 24 horas en DMEM con FCS al 0.1% antes de ser expuestos a hipoxia durante 6 horas. Tras la hipoxia, las células fueron reoxigenadas en condiciones de normoxia (21% O₂) durante 1 o 2 horas.

Para analizar el efecto de los RLO en la activación de NF- κ B y la consiguiente expresión génica de quimioquinas, los fibroblastos fueron incubados con NAC 25 mM durante una hora, antes de la exposición a hipoxia y posterior reoxigenación.

Por último, para demostrar que la expresión de quimioquinas era independiente de la síntesis de proteínas, los fibroblastos fueron incubados con CHX 10 μ g/ml durante los períodos de normoxia, hipoxia y reoxigenación.

Las células MonoMac1 crecieron en medio RPMI suplementado con aminoácidos no esenciales 1X, L-glutamina 2mM, piruvato sódico 1X, y FCS al 10%, en condiciones normales con una atmósfera de O₂ al 21%, N₂ al 77%, y CO₂ al 5%, a 37°C de temperatura.

2.2. Extracción de ARN total

La obtención de ARN total para el posterior ensayo de protección de la ARNasa, se realizó de acuerdo con una variación del método de Chomczynski y Sacchi con la solución Ultraspec[®] (*UltraspecTM RNA isolation system*) (Chomczynski y Sacchi, 1987). En este método se emplea como agente desnaturizante una solución de sales de guanidina 14M y urea (Chaosolv). El ARN obtenido está libre de ADN y proteínas.

Para la homogeneización se añadió 1 ml de solución Ultraspec a cada placa de cultivo provocando una lisis directa de la monocapa de fibroblastos.

Para la extracción de ARN se añadieron 0,2 ml de cloroformo, y tras centrifugar las muestras a 12.000 g, durante 15 minutos a 4°C, se recuperó la fase acuosa.

La precipitación de ARN se realizó con un volumen de isopropanol equivalente a la fase acuosa (aproximadamente 600 µl), por centrifugación a 12.000 g durante 10 minutos. El ARN se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 75% y se dejó secar, resuspendiéndolo en agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC).

Por otra parte, la extracción de ARN total para su posterior detección en membrana (*Northern Blot*) se realizó de acuerdo con el protocolo comercial *High Pure RNA Isolation Kit* (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) que emplea como agente desnaturizante clorhidrato de guanidina.

2.3. Ensayo de protección de la ARNasa

El ensayo de protección de la ribonucleasa (RPA, de *ribonuclease protection assay*) se realizó según el esquema recogido en la figura 2. El ensayo se realizó con una sonda múltiple comercial para detectar las siguientes quimioquinas: Ltn, RANTES, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, IL-8, I-309; y por otra parte, para detectar los receptores de quimioquinas STRL33, US28, CCR3, CCR5, CXCR4, CCR8, GPR15, GPR1, V28, y CCR2b. Como controles internos, ambas ribosondas incluían sondas de dos genes constitutivos, GAPDH y L32 (Figura 3). A partir de estas ribosondas se sintetizó una ribosonda “*antisense*” marcada con [³²P] tras la inducción por la T7 polimerasa.

2.3.a. Síntesis de ribosondas

Para la síntesis de las ribosondas se añadió, por orden, 1 µl de ARNsin 40 U/µl, 1 µl de

nucleótidos GACU (GAC: 2,75 mM y U: 61 μ M), 2 μ l de DTT (*1,4 dithiotreitol*) 100 mM, 4 μ l de solución de transcripción 5X, 1 μ l de la sonda RPA, 10 μ l de [α - 32 P]UTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml), y 1 μ l de T7 ARN polimerasa 20 U/ μ l, a temperatura ambiente. La mezcla se incubó durante una hora a 37°C. Esta reacción se bloqueó añadiendo 2 μ l de DNasa 1 U/ μ l libre de RNasa, y se incubó durante 30 minutos a 37°C.

Posteriormente, se añadieron 26 μ l de EDTA (de *ethylenediaminetetraacetic acid*) 20mM, 25 μ l de fenol Tris-saturado pH 8, 25 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (50:1) y 2 μ l de ARNt de levadura 2 mg/ml. Se centrifugó a temperatura ambiente durante 2 minutos, recogiendo la fase acuosa y añadiendo 50 μ l de acetato amónico 4M, y 250 μ l de etanol frío al 100%, dejando esta mezcla a -70°C al menos durante 30 minutos. Tras una centrifugación a 15.000 g, a 4°C durante 15 minutos, se obtuvo el ARN precipitado. Este se lavó con etanol frío al 90% y se resuspendió finalmente en 50 μ l de solución de hibridación. La cantidad de [α - 32 P]UTP incorporado a la ribosonda se midió en un contador de centelleo (Liquid Scintillation Counter, Wallac, Pharmacia).

2.3.b. Hibridación de las muestras de ARN

Tras precipitar cada muestra de ARN (15 μ g de ARN total), se resuspendieron en 8 μ l de solución de hibridación. Se añadió 6×10^5 cpm/ml de ribosonda marcada y una gota de aceite mineral. La hibridación se realizó a 56°C durante 16 horas.

2.3.c. Tratamiento con ARNasa

Antes de añadir la ARNasa, las muestras se mantuvieron a 37°C durante 15 minutos. A cada muestra se le añadieron 125 μ l de solución de ARNasa 1X y 0,3 μ l de ARNasa A+T1 (A: 80 ng/ μ l, T1: 250 U/ μ l) y se incubaron a 30°C durante 45 minutos. Posteriormente, se añadieron 15,6 μ l de solución de proteinasa K 1X, 1,2 μ l de proteinasa K 10 mg/ml, y 1,2 μ l de ARNt de levadura 2 mg/ml y se incubó a 37°C durante 15 minutos. A cada muestra se le añadieron 65 μ l de fenol Tris-saturado pH 8, y 65 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (50:1). Se centrifugó a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se recogió la fase acuosa y se le añadieron 120 μ l de acetato amónico 4M y 650 μ l de etanol frío al 100%. Se dejó precipitando al menos 30 minutos a -70°C, y posteriormente, se centrifugó a 15.000 g,

4°C durante 15 minutos. Tras lavar el ARN precipitado con etanol al 90%, se resuspendió en 10 µl de solución de carga. Las muestras se desnaturalizaron a 90°C durante 3 minutos antes de ser cargadas en el gel.

2.3.d. Electroforesis

La electroforesis se realizó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (acrilamida: bisacrilamida, 19:1) en TBE 10X (Tris 0,89M, ácido bórico 0,89M, EDTA 20mM pH 8,3). Como marcador de peso molecular se utilizó ribosonda diluida en solución de carga (1000-2000 cpm/línea). La electroforesis se desarrolló a 50 wátios a 50°C de forma constante. Los geles fueron secados y autorradiografiados.

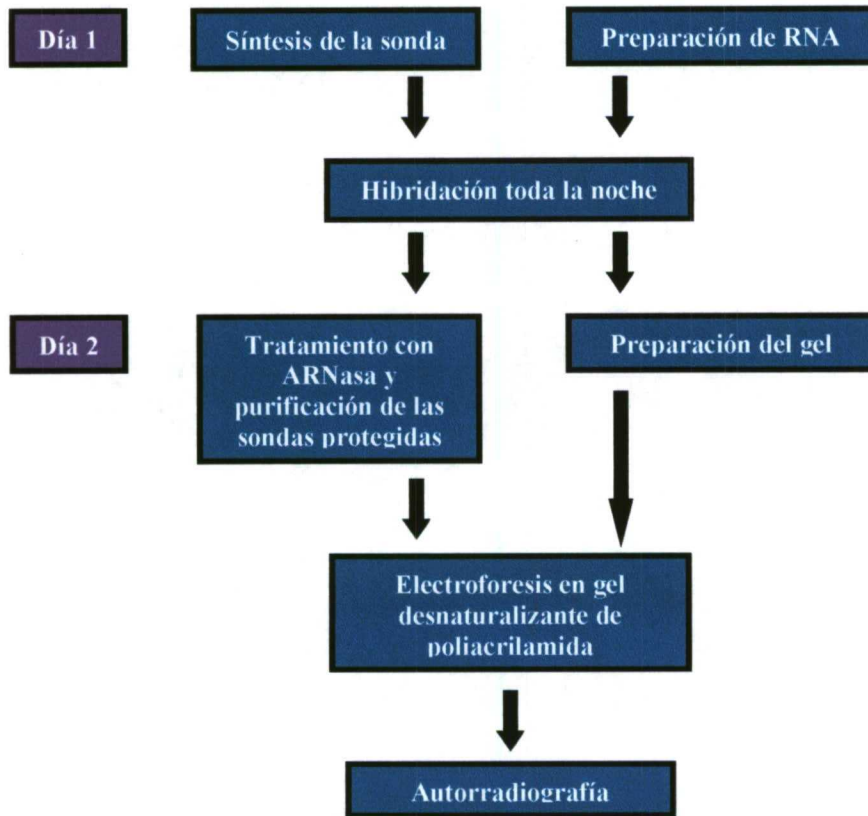


Figura 2. Ensayo de protección de la ARNasa.

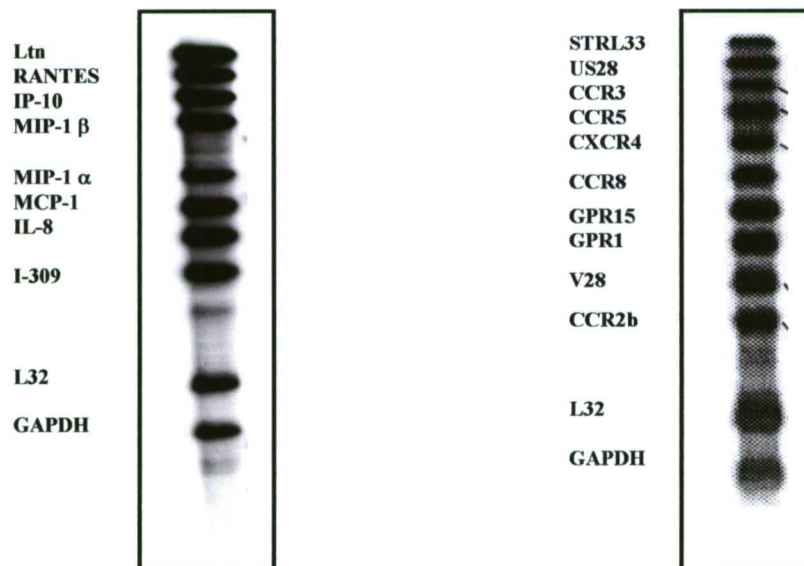


Figura 3. Ribosondas múltiples para quimioquinas y receptores de quimioquinas (“hCK5” y “hCR8”, respectivamente, RiboQuant®, Pharmingen).

2.4. Determinación de proteína MCP-1

La cuantificación de proteína MCP-1 secretada se realizó de acuerdo con un protocolo específico de enzimo-inmunoanálisis (ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems). Como muestras utilizamos los medios sobrenadantes de los cultivos de fibroblastos dérmicos tanto de piel normal como de ES. Este ensayo consistió en una técnica cuantitativa de enzimo-inmunoanálisis tipo “sandwich”. Las microplacas fueron preincubadas con anticuerpo monoclonal específico anti-MCP1. Los controles estándar y las muestras se añadieron a las microplacas, se mantuvieron durante 2 horas a temperatura ambiente, siendo detectada la proteína MCP-1 presente por el anticuerpo. Tras lavar y eliminar las sustancias no ligadas con PBS (de *phosphate buffered saline*), se añadió un anticuerpo policlonal unido a peroxidasa. Después de un lavado que eliminó el reactivo no unido al complejo “anticuerpo – peroxidasa”, se añadió una solución sustrato con tetrametilbenzidina y el cambio de color se cuantificó por espectrofotometría en un lector de microplacas (Anthos htll) a 450 nm. La concentración mínima que se detecta con este ensayo es de 5 pg/ml. El protocolo de este ensayo se ha resumido en la figura 4.

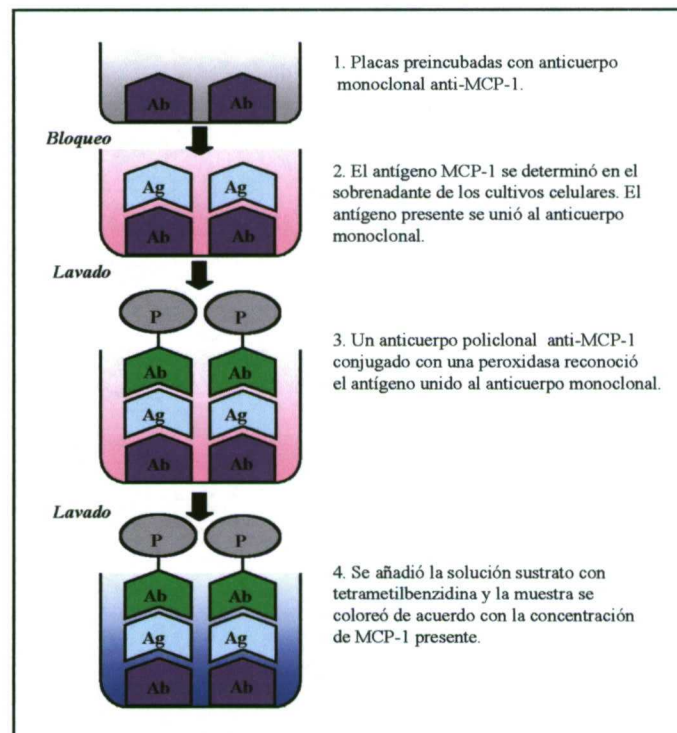


Figura 4. Detección de proteína MCP-1 por ensayo de enzimo-inmunoanálisis.

2.5. Ensayo de quimiotaxis

Para el ensayo de quimiotaxis utilizamos la línea de células monocíticas MonoMac1 cuya capacidad para migrar en respuesta a MCP-1 vía receptor CCR2 es bien conocida. El ensayo se realizó en placas de quimiotaxis Transwell (Corning-Costar Corp., Cambridge, MA) con unos pocillos inferiores de 6,5 mm de diámetro y unos pocillos superpuestos separados por una membrana de poliéster con poros de 5 μm de diámetro. Los sobrenadantes de los cultivos de fibroblastos en normoxia o hipoxia se diluyeron a razón 1:1 con DMEM con FCS al 0,1% (volumen final de 600 μl) y se colocaron en el pocillo inferior de las placas Transwell. Como control negativo se utilizó DMEM con FCS al 0,1%. Las células MonoMac se diluyeron en medio RPMI hasta una concentración final de 5×10^6 cel/ml, y se añadieron alícuotas de 100 μl al pocillo superior. La transmigración se desarrolló durante 2 horas a 37°C. El número de células que migraron a través de la membrana en respuesta a la concentración de MCP-1 se cuantificó por citometría de flujo. El índice de migración se calculó como el cociente entre el número de células migradas hacia los sobrenadantes estudiados y el número de células migradas con el control negativo.

Para confirmar la implicación de la proteína MCP-1 en la migración inducida, se realizó un ensayo de inhibición de quimiotaxis. Para ello, se incubaron los sobrenadantes de los cultivos de fibroblastos durante las dos horas de la transmigración con un anticuerpo monoclonal anti-MCP-1, 1 $\mu\text{g/ml}$, (R&D Systems) o con un control isotipo IgG₁ de ratón (Sigma).

2.6. Ensayo de proliferación celular

El ensayo de proliferación celular se realizó en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Inicialmente, se partió de una concentración celular de 3×10^3 fibroblastos dérmicos por cada pocillo que crecieron en DMEM sin FCS. Cuando los fibroblastos estuvieron subconfluentes se le añadió proteína MCP-1 a las siguientes concentraciones 0, 100, 200 y 400 ng/ml tanto en DMEM sin FCS como con FCS al 10%. Tras 20 horas de incubación, se les añadió 1 $\mu\text{Ci/ml}$ [$6\text{-}^3\text{H}$] timidina que se mantuvo durante 20 horas y se incorporó a las células en proliferación. Finalmente, las células de cada pocillo se fijaron en un filtro y el número de fibroblastos marcados con [$6\text{-}^3\text{H}$] timidina se cuantificó en el contador de centelleo (Pharmacia).

2.7. Detección de NF- κ B y AP-1 por técnica de retardo en gel

La activación de NF- κ B en los fibroblastos expuestos a hipoxia y reoxigenación se analizó midiendo la actividad de unión de los extractos de proteínas nucleares al ADN tal y como se había descrito previamente (Laín de Lera y col., 1999). La extracción de proteínas nucleares se realizó a partir de cultivos celulares en estado de confluencia.

Los fibroblastos se recogieron por centrifugación y se lisaron en 1 ml de solución de lisis (10mM HEPES (de *N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid*) pH 8, 50mM NaCl, 0,5M sacarosa, 1mM EDTA, 0,5mM espermidina, 0,15mM espermina, 0,5% Tritón X-100, 1mM PMSF (de *phenylmethylsulphonyl fluoride*), 0,5 μ g/ml leupeptina, 0,5 μ g/ml pepstatina, 0,2 U/ml aprotinina y 7mM β -mercaptoetanol) durante 5 minutos y, se centrifugaron a 4000 g durante 3 minutos, todo ello a 4°C. El sobrenadante obtenido en este paso era la fracción citosólica. El precipitado nuclear se resuspendió y se lavó en solución de lisis sin Tritón X-100. Posteriormente, se centrifugó a 4000g durante 3 minutos. Tras retirar el sobrenadante, el precipitado nuclear se resuspendió en 100 μ l de un tampón compuesto de 10 mM HEPES pH 8,0, 350mM NaCl, 0,1mM EDTA, 0,5mM espermidina, 0,15 mM espermina, 1mM PMSF, 0,5 μ g/ml leupeptina, 0,5 μ g/ml pepstatina, 0,2 U/ml aprotinina y 7mM β -mercaptoetanol. La obtención de las proteínas se realizó mediante agitación suave durante 30 minutos a 4°C. La fracción nuclear fue recogida después de una centrifugación a 4000 g durante 15 minutos a 4°C. La concentración de proteína se estimó mediante la reacción de Bradford (BioRad, Richmond, CA) (Bradford, 1976).

El ensayo de unión ADN-proteína se realizó en un volumen final de 20 μ l. Para cada ensayo se utilizaron 3 μ g de proteína nuclear, 4 μ g de poly dI-dC (Pharmacia) como inhibidor específico, 3 μ g de albúmina bovina (BSA, de *bovine serum albumin*) (Boehringer-Mannheim), 4 μ l de tampón de unión 5X (37,5mM HEPES pH 8, 175mM NaCl, 5mM Cl₂Mg, 0,25 EDTA pH 8, 2,5mM DTT, y 37,5% glicerol) y 50.000 cpm de sonda marcada con [α^{32} -P] dCTP. El oligonucleótido utilizado (Bio-Synthesis) contiene el doble consenso NF- κ B, tal y como se encuentra en la región activadora de transcripción (*enhancer*) del VIH.

Tras una incubación de 15 minutos a 24° C, las muestras fueron migradas en un gel de poliacrilamida al 5% en TBE 0,5X (25 mM Tris, 25 mM ácido bórico, 0,5 mM EDTA pH 8) durante 90 minutos a 200 V. El gel fue secado en secador de calor (Bio-Rad) y

autorradiografiado.

La especificidad de la reacción se valoró mediante la competición con oligonucleótidos no marcados con anticuerpos específicos frente a las subunidades p50, p65 y c-rel de NF- κ B. En los ensayos de competición se utilizaron oligonucleótidos no marcados en un exceso de concentración de 40 veces superior respecto a la cantidad de sonda marcada, 1 μ l de anticuerpo anti-p50 (cedido por el Dr. R.T. Hay), anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology), o c-Rel (cedido por el Dr. N. Rice). El extracto nuclear fue preincubado con los competidores durante 10 minutos a 24°C, antes de realizar la reacción de unión ADN-proteína.

En el caso de AP-1, se emplearon 3 μ g de extracto nuclear, 1 μ g de poli-dI:dC (Sigma) como competidor inespecífico y 30.000 cpm de sonda marcada en 14 μ l de tampón de reacción (10mM Tris-HCl pH 7,9, 50mM NaCl, 2,5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM DTT, 4% glicerol). Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, los complejos se analizaron mediante migración en gel de poli-acrilamida al 5% en TBE 0,25X, durante 90 minutos a 200V y temperatura ambiente. El gel fue secado en un secador de calor (Bio-Rad), y analizado por autorradiografía.

2.8. Detección de ARN de colágeno en membrana (*Northern Blot*)

En primer lugar, se realizó una electroforesis desnaturalizante de 5 μ g de ARN total de cada muestra, en un gel de agarosa 1,2% con formaldehído al 40%. Una vez realizada la electroforesis, se trató el gel con NaOH 50mM y con solución SSC 20X (175,3 g de NaCl, 88,2 g de citrato sódico en H₂O bidestilada, pH 7).

La transferencia a una membrana de nylon se realizó en solución SSC 20X durante 12-16 horas y, posteriormente, tras un lavado de la membrana en SSC 2X, se fijó con rayos ultravioleta.

La prehibridación se realizó durante 1,5 horas a 65°C en 5 ml de solución Church (BSA 1%, EDTA 1mM, NaHPO₄ 0,5M pH 7,2, Na-dodecyl-SO₄ 7%) con 50 μ l de espermatozoos de salmón previamente hervido.

La hibridación se realizó a 65°C durante 12-16 horas, en solución Church, tras haberse añadido la sonda de colágeno marcada con α P³² (10⁶ cpm/ml de líquido de hibridación).

Por último, se realizaron dos lavados en SSC 2X y SDS (de *sodium dodecyl sulfate*) 0,1%. El resultado se analizó por autorradiografía.

2.9. Inmunohistoquímica

Para la detección *in vivo* de RNA de MCP-1, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en muestras de piel sana y de pacientes con ES. Las muestras fijadas en formalina, e incluidas en parafina se cortaron con un microtomo ordinario en secciones de 4 μm .

La detección de MCP-1 se realizó de forma similar a lo descrito previamente (Hernández-Presa y col., 1998). Brevemente, la recuperación del antígeno se realizó mediante calentamiento en un microondas (3x5 min a 750 W en EDTA 1mM, pH 8), previo a la tinción con anti-MCP-1. La actividad peroxidasa endógena fue bloqueada tras la incubación con 3% H_2O_2 :metanol (1:1) durante 10 minutos. La unión inespecífica del anticuerpo se eliminó incubando el tejido durante 1 hora en una solución supresora (suero de caballo al 6%, BSA al 4% en PBS, pH 7). Se añadieron 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo policlonal de cabra anti-MCP-1 humano (Immugenex Corp.) en PBS con suero de caballo al 1% y BSA al 4% durante toda la noche. Como anticuerpo secundario se empleó un suero de caballo biotilado anti-IgG de cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA), durante 30-60 minutos. Las secciones rehidratadas en alcoholes seriados y PBS fueron tratadas con H_2O_2 1,2% en metanol absoluto durante 30 minutos. La tinción se realizó de acuerdo con el protocolo estándar avidina-biotina-peroxidasa *ABC standard* (Vector). El cromógeno empleado fue la diaminobenzidina.

La contratinción se realizó con hematoxilina de Harris (Vector).

Finalmente, todas las preparaciones fueron deshidratadas en alcoholes seriados, aclaradas en xileno y montadas de forma permanente.

2.10. Análisis estadístico

La comparación estadística de los niveles de proteína MCP-1 en condiciones basales y tras la exposición a hipoxia y/o reoxigenación y de los índices de migración en muestras, sin tratamiento o tratadas con anticuerpo anti-MCP-1 y/o IgG_1 se realizó mediante comparación de medias por el test de la *t* de Student para muestras pareadas. La comparación de los mismos parámetros entre líneas de fibroblastos sanos y de ES, se realizó mediante comparación de medias por el test de la *t* de Student para muestras independientes. La correlación entre la concentración de MCP-1 y el índice de migración se evaluó mediante el test de Pearson.

Resultados

1. Expresión de MCP-1 e IL-8 en fibroblastos dérmicos

1.1. Detección de ARNm de quimioquinas en fibroblastos dérmicos

Inicialmente, se estudió el patrón de expresión de ARNm de diferentes quimioquinas en cultivos de fibroblastos dérmicos, por el método de protección de la ARNasa, en las condiciones basal y tras la exposición a TNF- α humano, que ha demostrado ser un potente inductor de la expresión génica de quimioquinas en diferentes tipos celulares, incluidos los fibroblastos (Ebnet y col., 1997). Las células se mantuvieron al menos 24 horas con FCS al 0.1% para evitar la posible influencia de los factores de crecimiento presentes en el suero sobre la expresión de las quimioquinas. En total se analizaron 5 líneas sanas y 5 líneas de pacientes con ES.

En la mayoría de las líneas de fibroblastos procedentes de los controles sanos se detectó expresión constitutiva de ARNm de MCP-1 e IL-8, y no del resto de las quimioquinas incluidas en la sonda múltiple (Figura 5A). El ARNm más abundante correspondió a MCP-1.

La exposición de estos fibroblastos a TNF- α , a dosis de 10, 25, y 50 U/ml, indujo un aumento dosis dependiente en la expresión de ARNm de RANTES, IP-10, MCP-1, e IL-8. Por el contrario, el tratamiento con TNF- α no indujo la expresión de Ltn, MIP-1 α , MIP-1 β , e I-309 (Figura 5A).

La exposición de los fibroblastos dérmicos sanos a hipoxia durante 6 horas indujo un aumento en la expresión de ARNm de MCP-1 y, en menor grado, de IL-8. La respuesta máxima en la expresión de ARNm se obtuvo tras la hipoxia. Después de una hora de reoxigenación, la expresión de MCP-1 e IL-8 no fue mayor a la observada en condiciones de hipoxia. Tras dos horas de reoxigenación, los niveles de MCP-1 e IL-8 retornaron a los valores basales (Figura 5B).

Para analizar si la inducción en la expresión de quimioquinas durante la fase de hipoxia era dependiente de la generación de RLO, se realizaron ensayos paralelos tratando los cultivos celulares con NAC, un inhibidor de la síntesis de RLO. La preincubación con NAC 25mM redujo la expresión de ARNm de MCP-1 e IL-8 en los fibroblastos sometidos a hipoxia. Por el contrario, no se observaron diferencias en la expresión basal o constitutiva de estas quimioquinas antes y después del tratamiento con NAC (Figura 5C).

Para analizar si la inducción en la expresión de MCP-1 e IL-8 se produjo por activación transcripcional directa se realizaron estudios paralelos incubando los cultivos de fibroblastos sanos con 10 μ g/ml de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, durante los

períodos de normoxia e hipoxia. El tratamiento con cicloheximida provocó una superinducción en la expresión de ARNm de MCP-1 e IL-8 en los fibroblastos expuestos a hipoxia (Figura 5C).

Los fibroblastos dérmicos procedentes de pacientes con ES, estudiados en paralelo con los sanos, mostraron una mayor expresión constitutiva de MCP-1. Sin embargo no se observó mayor expresión en IL-8 ni en el resto de las quimioquinas incluidas en la ribosonda. La comparación de los niveles de ARNm de MCP-1 entre fibroblastos sanos y de ES realizado por densitometría reveló una expresión 2 a 9 veces mayor en los últimos corrigiendo las diferencias en la carga de ARN en función de la intensidad de GAPDH. Los fibroblastos procedentes de piel esclerodérmica no respondieron a la hipoxia y no observamos cambios en la expresión de MCP-1 ni de las otras quimioquinas tras la exposición a hipoxia y reoxigenación (Figura 5A).

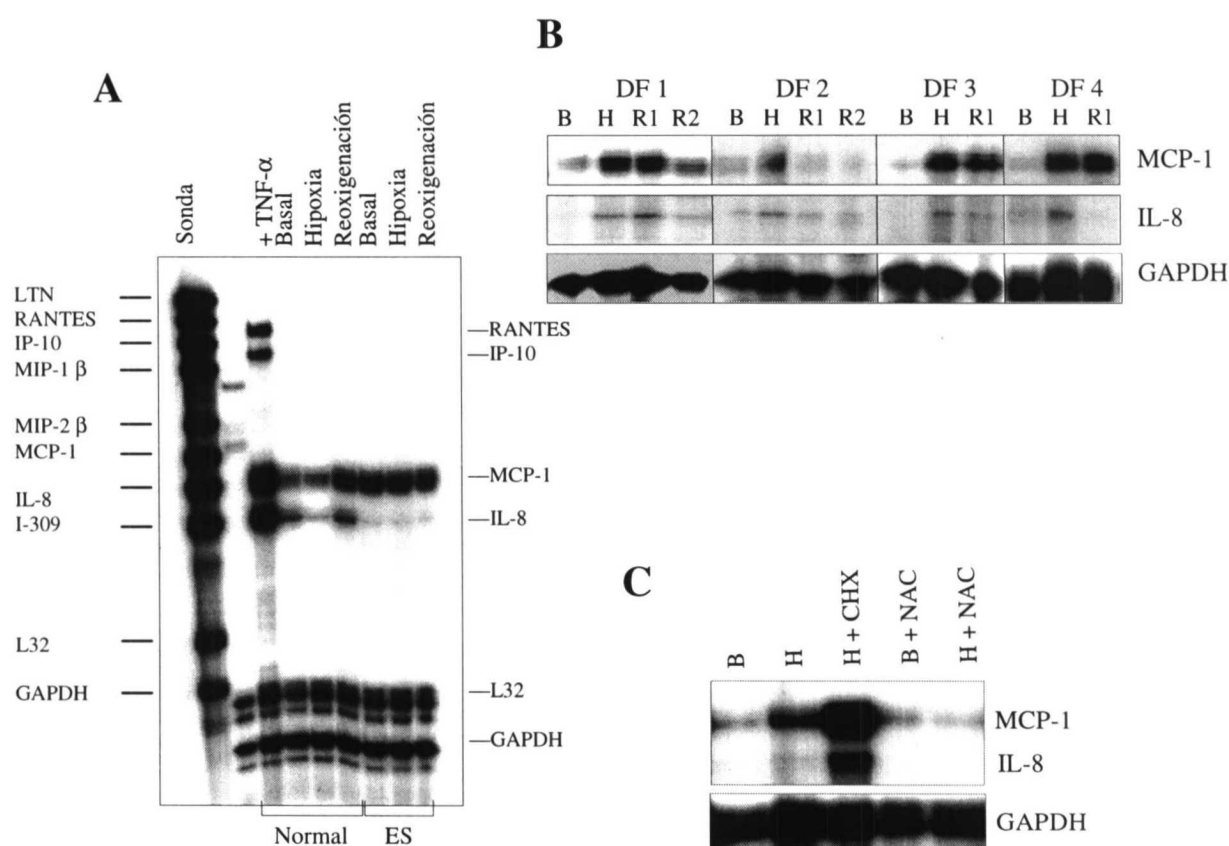


Figura 5. Expresión de ARNm de diferentes quimioquinas por los fibroblastos dérmicos. (A) Diferencias en la expresión de MCP-1 e IL-8 entre los fibroblastos dérmicos de controles sanos y de pacientes con ES. Control positivo de expresión de quimioquinas tras el tratamiento con TNF- α 50 U/ml. (B) Expresión de quimioquinas en fibroblastos de piel sana en condiciones basal (B), tras 6 horas de hipoxia (H) y tras una hora de reoxigenación (R). (C) Expresión de quimioquinas en fibroblastos de piel sana en condiciones basal (B) y tras 6 horas de hipoxia (H) sin tratamiento, incubados con cicloheximida 10 μ g/ml (CHX), y tras el tratamiento con NAC 25 mM.

1.2. Secreción de proteína MCP-1 por fibroblastos dérmicos

Para confirmar que el aumento de la expresión de MCP-1 se acompaña de un aumento en la secreción de proteína MCP-1 por los fibroblastos dérmicos, se cuantificó esta proteína en el sobrenadante de los cultivos celulares. En total se analizaron 7 líneas procedentes de piel sana y 7 de ES, mediante un ensayo específico de enzimo-inmunoanálisis. Los resultados corresponden a 3 experimentos independientes realizados con cada línea celular.

Las líneas celulares fueron heterogéneas en los niveles de MCP-1, tanto en condiciones basales como en hipoxia. Se observó una tendencia hacia una mayor inducción de MCP-1 en aquellas líneas con menor producción basal. En las líneas celulares sanas, el nivel de proteína MCP-1 secretada aumentó entre 1,1 y 4,2 veces tras la exposición a hipoxia. La concentración media de MCP-1 aumentó de forma significativa en las células en hipoxia en comparación con los fibroblastos en normoxia ($p=0,006$). Por el contrario, la reoxigenación no aumentó significativamente la secreción de MCP-1 ($p=0,753$). El efecto de la hipoxia y la generación de RLO se demostró al incubar previamente los cultivos de fibroblastos sanos durante una hora con NAC. La incubación con NAC redujo en un 46% ($p=0,005$) la concentración media de MCP-1 tras la exposición a hipoxia pero no modificó la producción basal en normoxia. La comparación de los valores medios de proteína MCP-1 secretada por una misma línea en diferentes condiciones se realizó por el test de la t de Student para muestras pareadas. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 5 y en las figuras 6 y 7.

Tabla 5. Niveles en pg/ml de proteína MCP-1 secretada por los fibroblastos dérmicos procedentes de 6 controles sanos (N) en condiciones basales (B), tras seis horas de hipoxia (H), y tras una hora de reoxigenación (R) con o sin tratamiento con NAC.

	B	B+NAC	H	H+NAC	R	R+NAC
N 1	187,14	247,60	791,55	443,72	403,71	226,18
N 2	330,66	330,66	793,37	540,96	445,10	294,81
N 3	902,77	613,13	1238,15	965,13	641,68	496,90
N 4	330,66	262,12	923,27	641,86	481,91	345,42
N 5	177,10	105,25	420,64	180,41	249,72	96,74
N 6	1102,48	847,27	1177,54	1174,77	569,52	312,14
Media	505,14	401,01	890,75	657,81	465,27	295,37
DS*	396,12	275,46	298,10	360,37	136,33	132,39

*DS, desviación estándar.

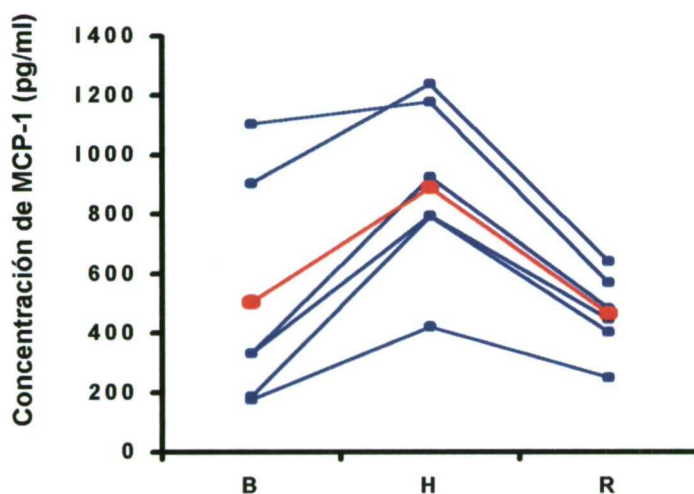


Figura 6. Niveles de proteína MCP-1 (pg/ml) secretada por los fibroblastos dérmicos procedentes de 6 controles sanos en condiciones basales (B), tras seis horas de hipoxia (H), y una hora de reoxigenación (R). La línea roja representa el valor medio de la proteína MCP-1 secretada.

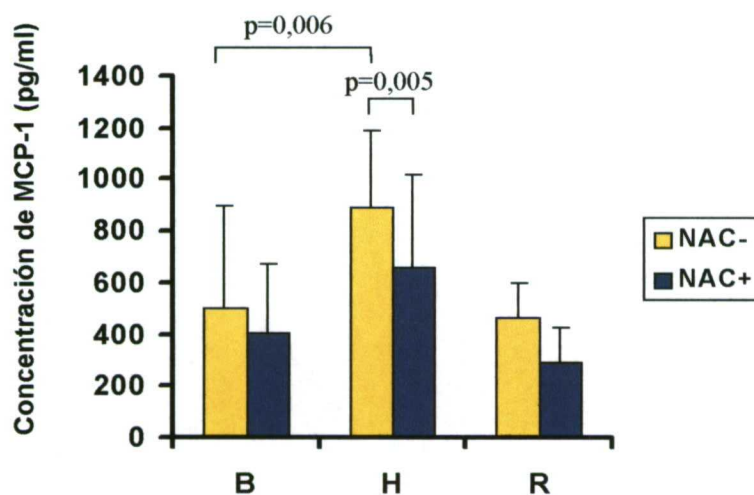


Figura 7. Niveles medios de proteína MCP-1 secretada por los fibroblastos dérmicos procedentes de 6 controles sanos en condiciones basales (B), tras seis horas de hipoxia (H), y una hora de reoxigenación (R), con o sin tratamiento con NAC. Las barras de error representan la desviación estándar de los valores medios de proteína MCP-1.

Posteriormente, se analizaron las diferencias en la secreción de proteína MCP-1 entre los fibroblastos procedentes de piel sana y de esclerodermia. Se midió la concentración de MCP-1 en los sobrenadantes de los cultivos celulares de 7 líneas sanas y de 7 procedentes de pacientes con ES. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 6. La cantidad basal media de MCP-1 secretada fue 3,4 veces superior en las líneas de esclerodermia comparado con los controles sanos ($p=0,04$) (Figura 8). Cuando comparamos la respuesta a la hipoxia entre fibroblastos sanos y de pacientes con ES encontramos que, en los primeros, la hipoxia indujo un aumento estadísticamente significativo en la secreción de MCP-1 ($p=0,002$), pero no así la reoxigenación ($p=0,818$). En los fibroblastos esclerodérmicos la hipoxia y la reoxigenación indujeron cambios significativos en la secreción de MCP-1 ($p=0,018$ y $p=0,003$, respectivamente). Sin embargo, cuando se comparó el incremento medio en la concentración de MCP-1 secretada, encontramos que éste fue significativamente menor en los fibroblastos esclerodérmicos con respecto a los sanos ($1,23 \pm 0,25$ y $2,33 \pm 1,03$, respectivamente, $p=0,018$). El análisis comparativo de los valores medios de proteína MCP-1 entre fibroblastos sanos y de ES se realizó mediante el test de la t de Student para muestras independientes.

Tabla 6. Niveles en pg/ml de proteína MCP-1 secretada por los fibroblastos dérmicos procedentes de 6 controles sanos (N) y de 7 pacientes con ES (ES) en condiciones basales (B), hipoxia (H), y reoxigenación (R). La columna H/B recoge el incremento en la secreción de MCP-1 inducido por la hipoxia.

	B	H	H/B	R		B	H	H/B	R
N 1	187,14	791,55	4,23	403,71	ES 1	368,17	312,08	0,85	580,49
N 2	330,66	793,37	2,4	445,10	ES 2	1785,28	2337,46	1,31	2175,84
N 3	519,45	1080,05	2,08	586,70	ES 3	330	425,9	1,29	457,96
N 4	902,77	1238,15	1,37	641,68	ES 4	665,47	1110,16	1,67	1142,38
N 5	330,66	923,27	2,79	481,91	ES 5	1587,34	1964,94	1,24	2057,51
N 6	177,10	420,64	2,38	249,72	ES 6	1500,48	1688,13	1,13	1850,67
N 7	1102,48	1177,54	1,07	569,52	ES 7	1840,30	2046,76	1,11	1894,71
Media	507,18	917,80	2,33	482,62	Media	1153,86	1412,20	1,23	1451,37
DS*	361,12	281,38	1,03	132,64	DS*	672,37	807,74	0,25	717,52

* DS, desviación estándar

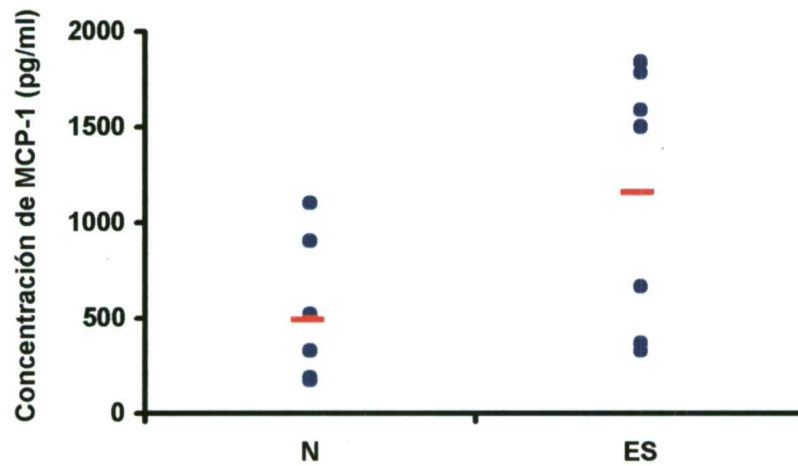


Figura 8. Niveles de secreción de la proteína MCP-1 (pg/ml) procedente de 7 líneas de fibroblastos de piel normal (N) y 7 de esclerodermia (ES). La línea roja representa la concentración media. La concentración media de proteína MCP-1 fue 3,4 veces superior en los fibroblastos de ES ($p=0,04$).

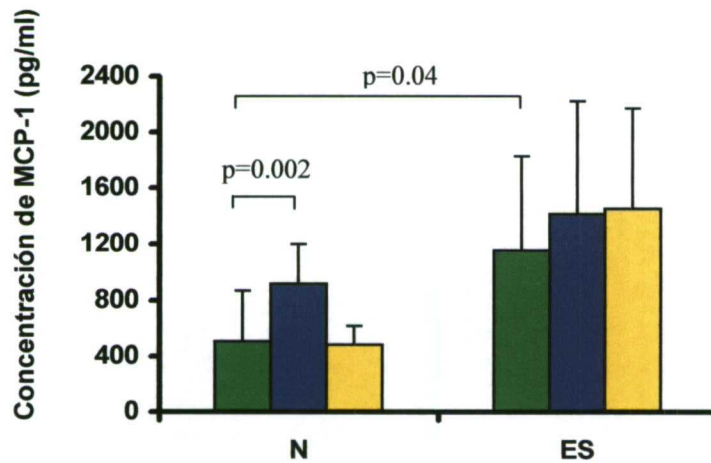


Figura 9. Niveles medios de proteína MCP-1 secretada por fibroblastos dérmicos sanos (N) y de ES en condiciones basal (verde), hipoxia (azul), y reoxigenación (amarillo). En condiciones basales, los fibroblastos de ES secretaron 3,4 veces más proteína que los normales ($p=0,04$). La hipoxia indujo un aumento en la secreción de MCP-1 en los fibroblastos de piel sana ($p=0,002$). La hipoxia y la reoxigenación no indujeron cambios significativos en la secreción de MCP-1 en los fibroblastos de ES. Las barras de error representan la desviación estándar de los niveles medios de proteína MCP-1 secretada.

2. Activación de NF- κ B y AP-1 en la inducción de la expresión de MCP-1 en fibroblastos dérmicos

En la región promotora de MCP-1 se han descrito regiones de unión para varios factores de transcripción como Sp1, NF- κ B, y AP-1 (Kadonaga y col., 1987; Shyy y col., 1993; Ueda y col., 1994; Martín y col., 1997).

En primer lugar, se analizaron los extractos nucleares procedentes de fibroblastos sanos en condiciones basales, tras 6 horas de hipoxia y tras una hora de reoxigenación. Las señales de amplificación para NF- κ B fueron más intensas en los fibroblastos reoxigenados que en aquellos expuestos únicamente a hipoxia y correspondieron en su mayoría a complejos p65/p50 (Figura 10A). Para confirmar la identidad de los complejos de NF- κ B activado, se realizaron ensayos de competición con anticuerpos frente a p50, p65, y cRel (Figura 10B). Resultados similares se obtuvieron para AP-1 (Figura 10C).

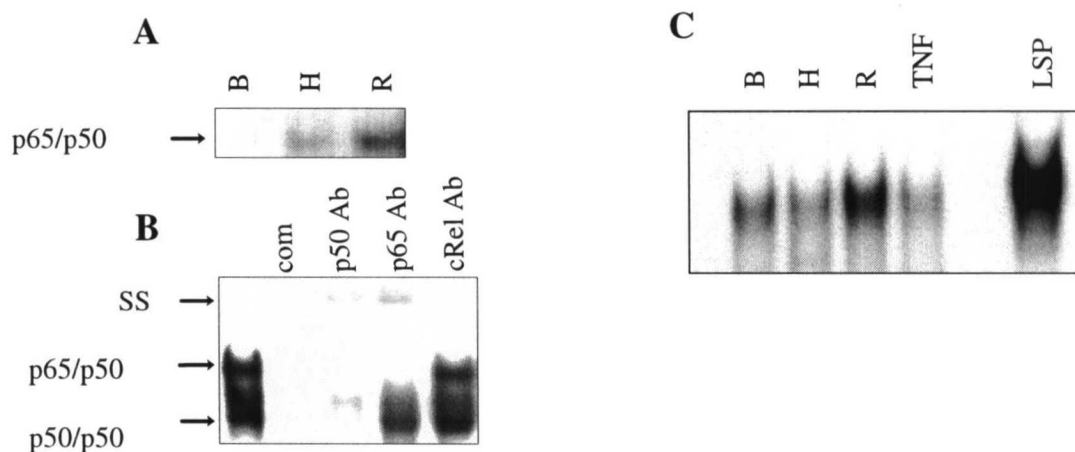


Figura 10. Análisis de la activación de NF- κ B y AP-1 en extractos proteicos nucleares de fibroblastos expuestos a hipoxia y reoxigenación. (A) Complejos p50/p65 en los extractos proteicos nucleares de los fibroblastos en condiciones basales (B), tras 6 horas de hipoxia (H), y tras una hora de reoxigenación (R). (B) Identificación de los complejos NF- κ B en los extractos proteicos nucleares de fibroblastos expuestos a hipoxia por ensayo de competición con oligonucleótidos no marcados (com) y anticuerpos anti-p50, anti-p65 y anti-c-rel. Las autorradiografías se expusieron más tiempo en (B) para detectar mejor todos los complejos. SS: complejos migrados. (C) Identificación de AP-1 en los extractos proteicos nucleares de fibroblastos en condiciones basales (B), tras 6 horas de hipoxia (H), tras una hora de reoxigenación (R) y tras el tratamiento con TNF- α 50 U/ml. Se incluyó un control positivo de linfocitos de sangre periférica (LSP) tratados con éster de forbol.

Por último, se estudió si la activación de NF- κ B o de AP-1 inducida por el mecanismo de hipoxia-reoxigenación era responsable de las diferencias observadas en la expresión basal de MCP-1 y tras la hipoxia entre los fibroblastos dérmicos de los controles sanos y de los pacientes con ES. Se comparó la activación basal de NF- κ B y de AP-1 en los extractos nucleares de 7 líneas celulares sanas y 6 líneas de pacientes con ES mediante geles de retardo. Los niveles constitutivos de activación de NF- κ B y de AP-1 fueron variables en las diferentes líneas tanto sanas como de ES. La abundancia relativa de los complejos p50/p50 y p50/p65 fue asimismo variable. Sin embargo, no encontramos ninguna diferencia cuantitativa ni cualitativa entre fibroblastos normales y esclerodérmicos. Tampoco se encontró ninguna relación entre la activación de NF- κ B y de AP-1 y la cantidad de proteína MCP-1 (Figura 11).

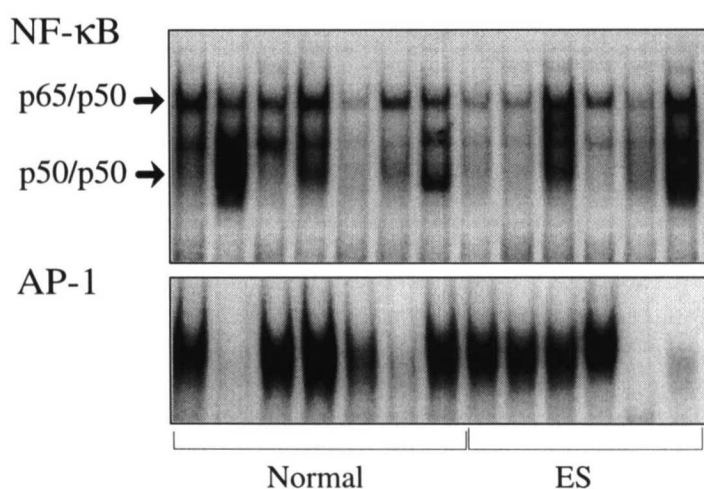


Figura 11. Niveles constitutivos de NF- κ B y de AP-1 en fibroblastos normales y de esclerodermia (ES). Se obtuvieron los extractos proteicos nucleares de 7 líneas normales y 6 de ES y se analizaron por EMSA con oligonucleótido de doble cadena, marcado con [α 32-P], correspondiente a NF- κ B y AP-1. La posición de los dos grandes complejos NF- κ B se identificó por ensayo de migración con anticuerpos específicos anti-p50, p65 y c-rel.

3. Actividad quimiotáctica de MCP-1 sobre células mononucleares MonoMac1

Para analizar la posible relevancia biológica de la secreción de MCP-1 por los fibroblastos dérmicos, se estudió la respuesta quimiotáctica de células monocíticas MonoMac1 a los sobrenadantes de los cultivos celulares en un sistema de trans migración a través de

membranas Transwell. Inicialmente se analizó el efecto quimiotáctico de los sobrenadantes procedentes de los cultivos de fibroblastos sanos en condiciones basales y en hipoxia. Todos los sobrenadantes de los cultivos indujeron efecto quimiotáctico sobre las células MonoMac1. Sin embargo, el índice medio de migración aumentó de forma significativa en las células expuestas a hipoxia con respecto a las condiciones de normoxia ($p=0,015$). Para confirmar que la actividad quimiotáctica observada era dependiente de la presencia de MCP-1, se realizaron de forma paralela ensayos de inhibición de la quimiotaxis tratando los sobrenadantes de los cultivos celulares con un anticuerpo monoclonal neutralizante anti-MCP-1 $1 \mu\text{g/ml}$ o con IgG₁, isotipo monoclonal de ratón, durante las dos horas del período de transmigración. La incubación con el anticuerpo neutralizante anti-MCP-1 redujo el índice de migración una media de 65% en las líneas sanas, tanto en normoxia ($p=0,004$) como en hipoxia ($p=0,004$). El tratamiento con IgG₁ no indujo cambios significativos en los índices de migración. La comparación entre los índices de migración obtenidos por una misma línea en condiciones de normoxia o hipoxia y tras el tratamiento con anti-MCP-1 o IgG₁ se realizó mediante el test de la t de Student para muestras pareadas. Los resultados del ensayo de la quimiotaxis en líneas de fibroblastos normales se han recogido en la tabla 7 y en la figura 12.

Cuando se realizó el análisis comparativo entre las células sanas y las de ES, el índice medio de migración aumentó 2,1 veces en éstas con respecto a las normales. El análisis comparativo se realizó con sobrenadantes de cultivos celulares en situación basal, tanto de fibroblastos sanos como de ES. Los resultados del ensayo comparativo de la quimiotaxis entre líneas de fibroblastos normales y de ES se han recogido en la tabla 8 y en la figura 13.

Por último, se analizó la correlación entre los índices de migración y la concentración de MCP-1 en los sobrenadantes. El análisis de todas las muestras reveló una buena correlación (índice de correlación de Pearson: 0,612, $p=0,02$). El análisis por separado de líneas sanas y de ES reveló unos resultados similares (IC Pearson: 0,7, $p=0,01$, y 0,94, $p=0,001$, respectivamente) (Figura 14).

Tabla 7. Índices de migración de células MonoMac1 obtenidos con los sobrenadantes de los cultivos de 7 líneas sanas en condiciones basales (B), hipoxia (H), con o sin tratamiento con anticuerpo anti-MCP-1 (α -MCP-1) o IgG₁ isotipo (IgG₁). El índice de migración se definió como el cociente entre el número de células migradas hacia el sobrenadante estudiado y el número de células migradas hacia el control negativo.

	B	B+ α MCP-1	B+ IgG ₁	H	H+ α MCP-1	H+ IgG ₁
N 1	168,5	51,4	-	287,3	62,7	260,2
N 2	253,3	87,9	173,8	457,4	147,2	383,4
N 3	217,8	89,7	170,9	394,1	140,3	363,9
N 4	309,2	-	-	630,4	-	-
N 5	163,8	-	-	306,3	-	-
N 6	92,5	-	-	60,3	-	-
N 7	227,7	-	-	293,8	-	-
Media	204,7	-	-	347,1	-	-
DS*	70,2	-	-	175,6	-	-

*DS, desviación estándar

Tabla 8. Índices de migración de células MonoMac1 obtenidos con los sobrenadantes de los cultivos de 6 líneas normales (N) y 7 líneas de ES en condiciones basales (B).

	B	B	
N 1	43,45	ES 1	45,8
N 2	59,05	ES 2	218,9
N 3	116,05	ES 3	17,45
N 4	32,25	ES 4	103,75
N 5	15,75	ES 5	199,05
N 6	222,3	ES 6	264,45
		ES 7	329,1
Media	81,48	Media	168,36
*DS	77,1	*DS	115,86

*DS, desviación estándar

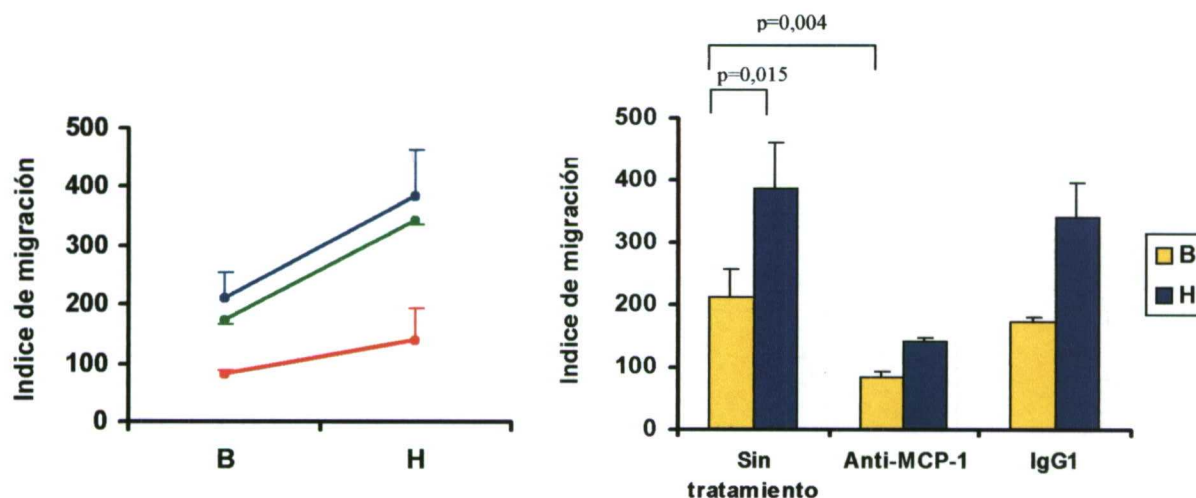


Figura 12. Índices medios de migración de células MonoMac1 hacia los sobrenadantes de los cultivos celulares de 7 líneas de fibroblastos normales en condiciones basales (B) y tras 6 horas de hipoxia (H), sin tratamiento (azul) o tras el tratamiento con anti-MCP-1 (rojo) o IgG₁ isotipo de ratón (verde). Las barras de error representan la desviación estándar.

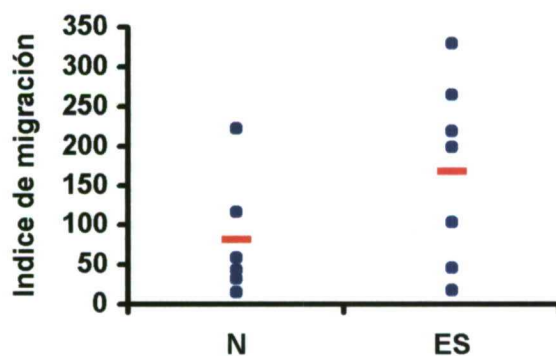


Figura 13. Análisis comparativo de los índices de migración obtenidos con los sobrenadantes de los cultivos de fibroblastos dérmicos normales (N) y de ES (ES). El índice medio de migración (rojo) fue 2,1 veces superior en ES respecto a las sanas.

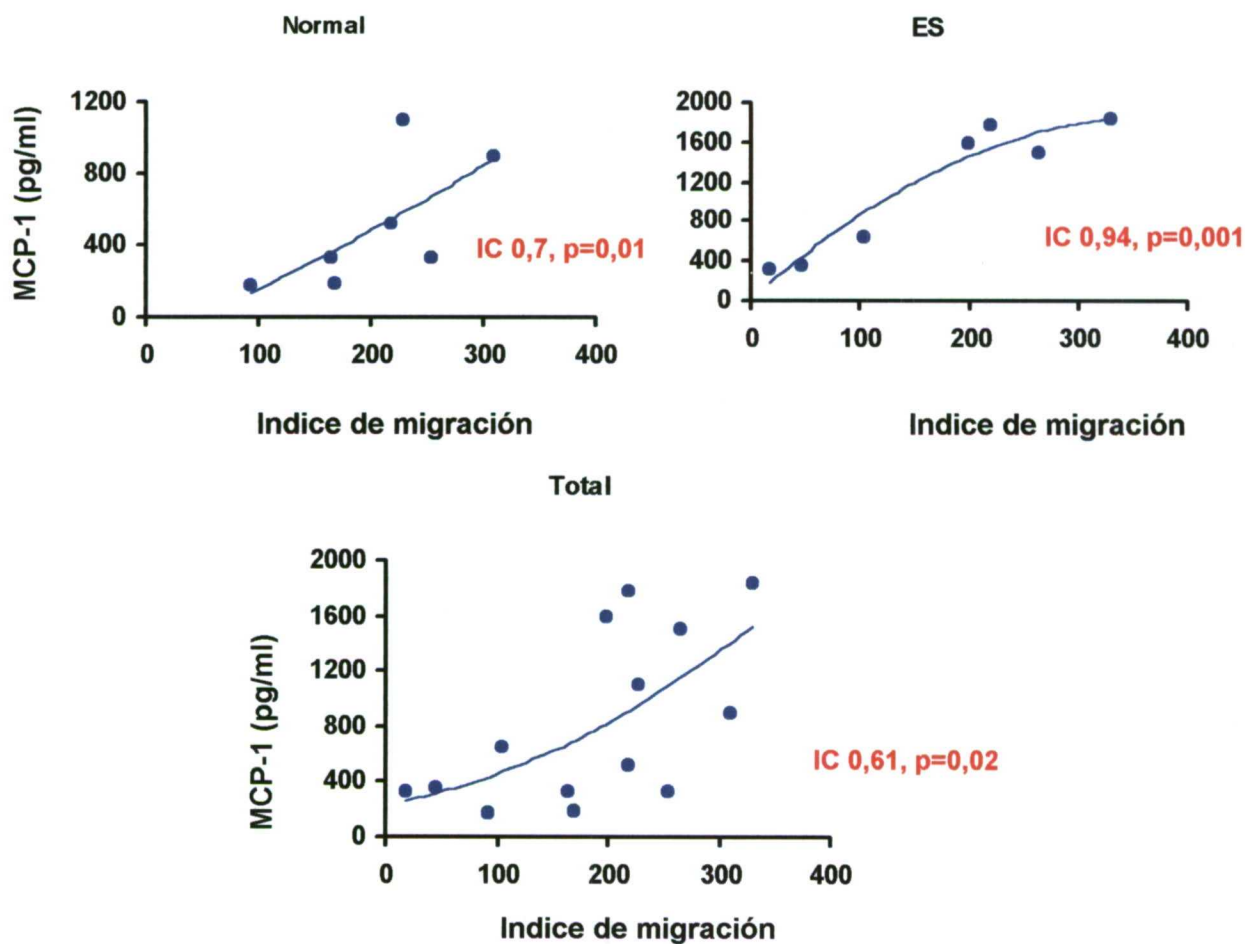


Figura 14. Análisis de correlación entre la concentración de proteína MCP-1, en los sobrenadantes de los cultivos celulares, y el índice de migración de células MonoMac1. El índice de correlación (IC) se calculó mediante el test de Pearson.

4. Efecto autocrino de MCP-1 en la expresión de ARNm de procolágeno- α 1 (I) en fibroblastos dérmicos

Previamente, se había demostrado que la exposición de fibroblastos pulmonares murinos a MCP-1 puede inducir la expresión del gen del procolágeno- α 1 (I) en estas células (Gharaee-Kermani y col., 1996). Como resultado del análisis mediante ensayo de protección de la ARNasa, nuestros datos confirmaron que los fibroblastos dérmicos expresan los receptores CXCR4 y CCR2 mientras que no se detectó expresión de ARNm de otros receptores. De acuerdo con esto, analizamos el posible efecto autocrino de MCP-1 en el control de la expresión de procolágeno. Los niveles de ARNm de procolágeno- α 1 (I) se analizaron en membrana (*Northern Blot*) en 4 líneas de fibroblastos sanos y 4 procedentes de lesiones esclerodérmicas en condiciones basal y tras el tratamiento con 5 μ g/ml de anticuerpo monoclonal neutralizante anti-MCP-1 o con control isotipo IgG₁ de ratón. La neutralización de MCP-1 con el anticuerpo monoclonal anti-MCP-1, a dosis 5 veces superior a la necesaria para inhibir la actividad quimiotáctica, provocó una disminución en la expresión de ARNm de procolágeno- α 1 (I) en sólo 2 de las líneas, una de piel sana y otra de ES. Estos resultados no se relacionaron con los niveles de expresión de MCP-1 ni de procolágeno. Por el contrario, el tratamiento con el control isotipo IgG₁ no modificó los niveles de expresión de ARNm de procolágeno- α 1 (I).

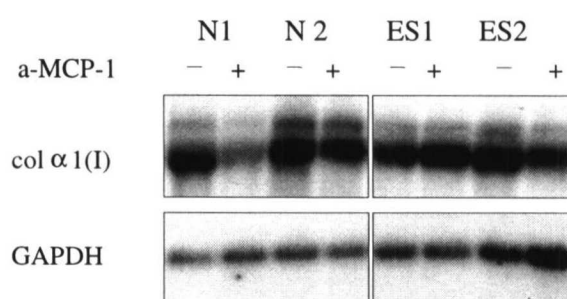


Figura 15. Efecto del anticuerpo neutralizante anti-MCP-1 sobre la expresión de ARNm de procolágeno α 1(I) en los fibroblastos dérmicos cultivados. El ARNm total se obtuvo tanto de líneas normales como de ES, bien sin tratar (-) o tras el tratamiento (+) con anticuerpo monoclonal neutralizante anti-MCP-1 5 μ g/ml (a-MCP-1) durante 48 horas. El ARNm se analizó por Northern Blot. La figura muestra dos líneas representativas, una de cada grupo. La misma membrana se hibridó con sondas correspondientes a procolágeno α 1(I) y GAPDH como control de carga.

5. Efecto de MCP-1 sobre la proliferación celular en fibroblastos

El ensayo de proliferación celular se realizó por quintuplicado sobre fibroblastos dérmicos sanos subconfluentes tratados con [6-³H] timidina. Se analizó el efecto de MCP-1 a diferentes concentraciones 100, 200 y 400 ng/ml en presencia y ausencia de FCS en el medio DMEM de cultivo celular. Tanto en ausencia como en presencia de FCS, se observó un efecto inductor de proliferación celular de MCP-1 con las concentraciones de 200 y 400 ng/ml. Los resultados se recogen en las tabla 9 y figura 16.

Tabla 9. Proliferación celular en fibroblastos dérmicos sanos inducida por MCP-1. Los resultados están expresados en c.p.m. en cinco experimentos independientes.

	FCS 0%	FCS 0% 100 ng/ml MCP-1	FCS 0% 200 ng/ml MCP-1	FCS 0% 400 ng/ml MCP-1	FCS 10%	FCS 10% 100 ng/ml MCP-1	FCS 10% 200 ng/ml MCP-1	FCS 10% 400 ng/ml MCP-1
N1	2745,75	4683,49	6110,77	5680,55	7793,96	2972,90	6123,82	18032,69
N2	4964,50	4783,53	6155,67	6236,63	5735,77	12023,09	14045,92	12923,31
N3	4528,29	4402,17	5211,49	6124,76	9230,76	9260,64	7899,26	23306,33
N4	3424,65	6568,10	7033,63	6654,99	12723,38	17280,57	17489,94	11750,29
N5	5611,38	6201,02	7426,38	5594,44	13257,10	15087,09	20916,05	12166,18
Media	4254,91	5327,66	6387,59	6058,27	9748,19	11324,86	13295,00	15635,76
DS*	1160,30	983,49	867,48	433,05	3215,22	5570,65	6260,62	4976,83

* desviación estándar

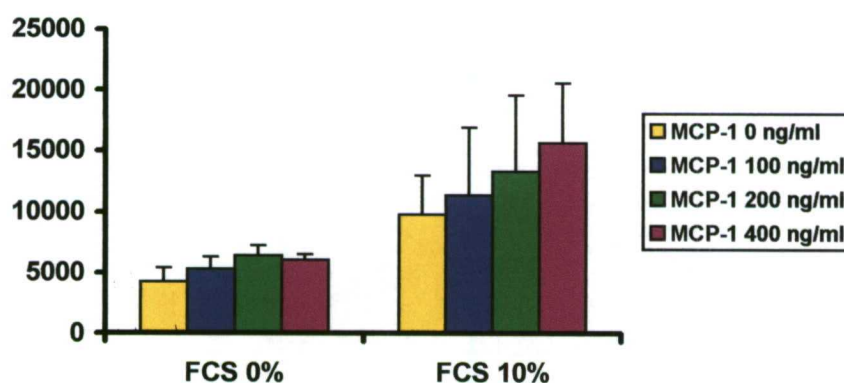


Figura 16. Efecto de MCP-1 sobre la proliferación celular en fibroblastos dérmicos sanos en ausencia (FCS 0%) o presencia de FCS (FCS 10%). El experimento se realizó por quintuplicado analizando el efecto de dosis crecientes de MCP-1. Las barras de error representan la desviación estándar.

6. Expresión de MCP-1 en la piel de esclerosis sistémica

Por último, se estudió el patrón de expresión *in vivo* de MCP-1 en piel normal y de pacientes con ES por inmunohistoquímica. En la piel procedente de los controles sanos no se detectó MCP-1 por inmunotinción. Por el contrario, en los cortes tisulares procedentes de ES se evidenció una marcada expresión de MCP-1 en los queratinocitos, particularmente en las capas epidérmicas más bajas, en algunas células mononucleares aisladas, y en los fibroblastos. Los fibroblastos no se tiñeron de forma uniforme y, así, se encontraron fibroblastos con abundante tinción para MCP-1 en la dermis de la mayoría de los cortes procedentes de ES, sobre todo en las áreas próximas a los vasos o a los infiltrados mononucleares (Figura 17).

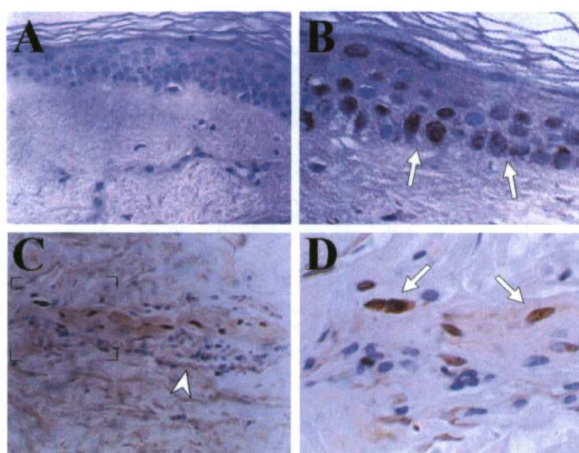


Figura 17. Expresión de MCP-1 por inmunohistoquímica en cortes tisulares de piel de controles sanos y de pacientes con ES. (A) En la piel normal no se detectó MCP-1 por inmunotinción. En las muestras de ES, se detectó MCP-1 en los queratinocitos, particularmente en las capas epidérmicas inferiores (flechas) (B), células mononucleares aisladas, y fibroblastos cercanos a los infiltrados mononucleares perivascular (puntas de flecha) (C). Los fibroblastos encuadrados en C se muestran a mayor aumento en D.

Discusión

1. Expresión de MCP-1 e IL-8 en fibroblastos dérmicos

Nuestros resultados, de forma global, apoyan la hipótesis de que los fibroblastos dérmicos normales pueden ejercer una importante función en el control de la respuesta inflamatoria derivada de la presencia de cambios vasculares, a través de la síntesis de algunas quimioquinas como IL-8 y MCP-1.

En primer lugar, estas células *in vitro* muestran un perfil característico de expresión de quimioquinas, y únicamente expresan de forma constitutiva IL-8 y MCP-1. Estudios previos han demostrado que diferentes estímulos, entre los que se incluyen los productos bacterianos como LPS o la lipoproteína A de la *Borrelia burgdorferi*, citoquinas proinflamatorias como IL-1 y TNF- α , y factores de crecimiento, son capaces de inducir la expresión de quimioquinas en los fibroblastos (Larsen y col., 1989; Van Damme y col., 1994; Agarwal y col., 1995; Ebnet y col., 1997). Algunos de estos estímulos no están presentes en el tejido conectivo antes de que se produzca la infiltración leucocitaria. Un factor común en las lesiones con un componente vascular e inflamatorio, tales como la cicatrización de heridas, las enfermedades cardiovasculares o las conectivopatías, es la presencia de un entorno hipóxico seguido de la generación de RLO. En modelos animales de enfermedades como la arteriosclerosis o la isquemia miocárdica en las que el mecanismo de hipoxia/reoxigenación es un factor patogénico decisivo, se ha demostrado la presencia de MCP-1 y su intervención en el desarrollo de la placa de ateroma y de la lesión inflamatoria en la fase de reoxigenación (Ono y col., 1999; Boring y col., 1998). En este trabajo, se confirma la respuesta de los fibroblastos dérmicos sanos a la hipoxia, y en menor grado a la reoxigenación, aumentando la expresión de MCP-1. Aunque los niveles de proteína MCP-1 alcanzados en respuesta a la hipoxia son modestos en comparación con los observados en respuesta a TNF- α u otros estímulos, estos niveles son biológicamente relevantes puesto que son capaces de mediar respuestas quimiotácticas en células mononucleares.

2. Activación de NF- κ B y AP-1 en la inducción de la expresión de MCP-1 en fibroblastos dérmicos

NF- κ B es un factor de transcripción que regula la expresión génica de numerosos factores proinflamatorios incluyendo las quimioquinas (Ebnet y col., 1997; Roebuck y col., 1999; Marumo y col., 1997; Duque y col., 1997). El estrés oxidativo y los cambios redox son una

importante vía de activación de NF- κ B como respuesta a variados estímulos (Schreck y col., 1991 y 1992). La hipoxia induce de forma precoz un aumento de la fosforilación de la tirosina I κ B α que se sigue de la activación de NF- κ B (Koong y col., 1994). En los fibroblastos dérmicos normales hemos encontrado que la hipoxia induce la expresión de las quimioquinas MCP-1 e IL-8, al menos parcialmente, a través de la activación del complejo p65/p50 de NF- κ B. La expresión de MCP-1 e IL-8 es máxima durante la fase de hipoxia y se reduce significativamente tras el tratamiento con NAC que es un inhibidor de la síntesis de RLO. Sin embargo, durante la fase de reoxigenación, cuando se genera la mayor cantidad de RLO y la máxima activación de NF- κ B, no se produce un aumento proporcionado de la expresión de estas quimioquinas. Este fenómeno ha sido descrito previamente por otros autores que han observado una mayor expresión de genes proinflamatorios dependiente de NF- κ B durante la fase de hipoxia (Muraoka y col., 1997; Ji y col., 1998; Gozal y col., 1998; Kacimi y col., 1998). Así, en la isquemia miocárdica, aunque no se ha identificado de que tipo celular procede MCP-1, se ha observado una mayor cantidad de ARNm correspondiente a MCP-1 durante la hipoxia y un descenso tras la reperusión (Ono y col., 1999). Existen dos posibles explicaciones para este fenómeno. En primer lugar, durante la hipoxia se pueden generar pequeñas cantidades de RLO (Park y col., 1991; Khan y col., 1995; Muraoka y col., 1997) capaces de activar NF- κ B, induciendo así la expresión de quimioquinas. La presencia posterior de factores inhibidores de la activación transcripcional inducida por NF- κ B podría explicar estos hallazgos. Esta hipótesis es consistente con los resultados que observamos tras el tratamiento con CHX, un inhibidor de la síntesis de proteínas, que provoca una superinducción de ARNm de MCP-1 e IL-8. Por otra parte, la expresión de MCP-1 es dependiente de otros factores de transcripción como AP-1 (Martín y col., 1997). Este factor de transcripción regula la expresión de numerosos genes de “respuesta-inmediata”, inducidos rápidamente tras la estimulación celular, y también es activado por estímulos redox (Bandyopadhyay y col., 1995). Sin embargo, nuestros resultados tampoco demuestran una clara relación temporal entre la activación de AP-1, máxima durante la fase de reoxigenación, y el aumento de ARNm de MCP-1. Por último, la expresión de MCP-1 puede ser dependiente de la interacción de otros múltiples factores de transcripción. En humanos, la región promotora del gen de MCP-1 contiene zonas de anclaje para diferentes factores de transcripción (Shyy y col., 1993, Ueda y col., 1994). La implicación de estos factores de transcripción en la activación del gen de

MCP-1 parece específica de cada estímulo y tipo celular. La actividad transcripcional basal depende del par de bases GC en posición -63 pares de bases, que es un punto de unión para Sp1 (Kadonaga y col., 1987). En células derivadas de glioblastomas, fibrosarcomas y leiomiomas, se ha objetivado la participación de NF- κ B en la regulación e inducción del gen de MCP-1 a través de una región situada a -2.7 kb desde el punto de inicio de la transcripción (Ueda y col., 1994). En células endoteliales humanas estimuladas con IL-1 y/o TNF- α , la inducción de este gen se produce a dos niveles, uno que contiene una región "NF- κ B-like" (p50/p65), y otro que es un punto de unión a AP-1, situados a -90 y -68 pares de bases desde el punto de inicio de la transcripción, respectivamente. Estas dos regiones actúan de forma sinérgica en la inducción de MCP-1 por IL-1 (Martín y col., 1997). Por tanto, parece que el control transcripcional de MCP-1 es complejo y aunque NF- κ B parece implicado en la respuesta a la hipoxia, es posible que existan otros factores no identificados en el presente estudio.

3. Regulación anómala de la expresión de MCP-1 en los fibroblastos dérmicos en la Esclerosis Sistémica

La ES es una enfermedad caracterizada por alteraciones vasculares muy prominentes desde las fases iniciales, que preceden a la infiltración por células inflamatorias y a la fibrosis. En numerosos estudios clínicos y patológicos se considera la lesión vascular como el factor patogénico primario de la ES. En la ES se establece un ambiente de hipoxia crónica con generación de RLO y, tanto la isquemia como los RLO se han implicado en la respuesta inflamatoria aunque sin identificarse los mecanismos subyacentes (Wigley y col., 1996). Los fibroblastos y células endoteliales son las dianas celulares potencialmente implicadas en estas respuestas (Kahaleh y col., 1979). Por otra parte, los RLO han sido implicados en la respuesta autoinmune observada en la ES. La topoisomerasa-1 o la fibrilarina, antígenos propios de la ES, son sensibles a procesos de oxidación dependiente de la presencia de metales y RLO sufriendo fragmentación o modificación de sus propiedades antigénicas. Esta transformación puede desencadenar en la ES una respuesta autoinmune frente a estos antígenos (Casciola-Rosen y col., 1997).

Los resultados del presente estudio sugieren un nexo entre las quimioquinas, fundamentalmente MCP-1 y las alteraciones vasculares en la patogenia de la ES. A diferencia de lo observado en los

fibroblastos dérmicos normales, los de la ES responden en menor proporción a la hipoxia/reoxigenación y presentan una elevada expresión constitutiva de MCP-1 capaz de inducir quimiotaxis de células mononucleares *in vitro*. La ausencia de respuesta podría explicarse por una preactivación constitutiva de la expresión de MCP-1 o por un acondicionamiento previo de esta respuesta tras la exposición mantenida a ciclos repetidos de hipoxia/reoxigenación *in vivo*, de acuerdo con lo que observamos en fibroblastos normales. Las causas de esta activación de la expresión de MCP-1 no son aclaradas por el presente estudio. Cuando comparamos los niveles constitutivos de activación de NF- κ B o de AP-1 entre líneas normales y de ES no encontramos diferencias, y aunque existe una marcada variabilidad individual, no existe correlación con los niveles de expresión constitutiva de MCP-1 en los fibroblastos esclerodérmicos.

Un fenómeno similar se ha observado en un modelo animal de fibrosis pulmonar tras la infección por *Schistosoma mansoni* con formación de granulomas dependientes de una respuesta inflamatoria Th2 (Lukacs y col., 1994; Hogaboam y col., 1999). En este modelo, los fibroblastos de los granulomas tipo Th2 producen dos veces más MCP-1 que los sanos o de controles de granulomas tipo Th1, y la síntesis de MCP-1 no responde a la estimulación con IL-4 como en fibroblastos normales. En este y otros modelos, se establece una relación entre la expresión de MCP-1, la presencia de citoquinas Th2 y el desarrollo de fibrosis. En primer lugar, los linfocitos T expresan CCR2, receptor de MCP-1, y MCP-1 ejerce *in vitro* una potente atracción sobre las células T de memoria (Schneider y col., 1999; Carr y col., 1994). En segundo lugar, la expresión de MCP-1 se asocia con el desarrollo de respuestas polarizadas Th2 (Chensue y col., 1995) y activa la secreción de IL-4 por las células T (Karpus y col., 1997). Por otra parte, se ha demostrado recientemente que el sistema MCP-1/ CCR2 desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta Th2 frente a la *Leishmania* utilizando ratones genéticamente deficientes en MCP-1 o CCR2 (Gu y col., 2000; Sato y col., 1999). Es interesante señalar que en la piel esclerodérmica se encuentran infiltrados de células inflamatorias con predominio de linfocitos CD30 positivo con elevada producción de IL-4 y escasa de IFN- γ , que sugieren un perfil Th2 (Mavilia y col., 1997). Por tanto, la capacidad de los fibroblastos esclerodérmicos para secretar MCP-1 en cantidad suficiente para provocar quimiotaxis de células mononucleares apunta a su participación en la infiltración de linfocitos y su polarización Th2.

4. Efectos de MCP-1 en la inflamación crónica y en el desarrollo de fibrosis

La quimioquina MCP-1 pertenece a la familia CC o β -quimioquinas. Esta proteína se purificó y clonó por primera vez en una línea celular mielomonocítica humana y en células mononucleares estimuladas por mitógenos (Yoshimura y col., 1989). El gen *MCP-1* se describió como un análogo del gen *JE*, un factor de crecimiento derivado de plaquetas e inducido por citoquinas en fibroblastos murinos. La proteína *JE/MCP-1* actúa de forma selectiva sobre monocitos aunque también puede atraer linfocitos T, basófilos y eosinófilos y, en determinadas situaciones de inflamación crónica, puede reclutar neutrófilos (Rollins y col., 1989). Esta quimioquina consta de 76 aminoácidos, su peso molecular es de 8.7 kD, y contiene 4 residuos de cisteína en las posiciones 11, 12, 36, y 52 unidos por puentes disulfuro. Los 10 aminoácidos que preceden al primer residuo de cisteína determinan la actividad de esta quimioquina, en particular, el grupo piroglutamato-prolina (Schwarz y col., 1996; Barroga y col., 1995). Aunque algunos tipos celulares producen MCP-1 de forma constitutiva, en la mayoría de las células esta quimioquina es inducible por citoquinas proinflamatorias o agentes infecciosos, como ocurre en los fibroblastos (Strieter y col., 1989), células musculares lisas (Yu y col., 1992), células endoteliales (Strieter y col., 1989), queratinocitos (Barker y col., 1991), melanocitos (Zachariae y col., 1991), condrocitos (Villiger y col., 1992), osteoblastos (Williams y col., 1992), células mesoteliales (Jonjic y col., 1992), células mesangiales (Brown y col., 1992), y leucocitos mononucleares (Yoshimura y col., 1989).

La expresión elevada de MCP-1 se ha descrito en muchas otras entidades que cursan con fibrosis como la arteriosclerosis, la cirrosis hepática, la fibrosis pulmonar, o la glomerulonefritis (Afford y col., 1998; Lukacs y col., 1994; Antoniadis y col., 1992; Lloyd y col., 1997; Schneider y col., 1999; Nelken y col., 1991; Duque y col., 1997; Ruiz-Ortega y col., 1998). En estas lesiones, diferentes células como los leucocitos mononucleares, los fibroblastos, las células endoteliales, las células musculares lisas, y las células epiteliales secretan MCP-1.

Además de sus efectos quimiotácticos y su participación en las respuestas Th2, MCP-1 puede tener efectos profibróticos directos. Gharaee-Kermani y col. han descrito que el tratamiento *in vitro* de fibroblastos pulmonares con MCP-1 estimula la síntesis de procolágeno a través de un aumento en la expresión del gen de TGF- β (Gharaee-Kermani y col., 1996). Otros datos refuerzan la implicación directa de MCP-1 en la fibrosis en un modelo animal de

glomerulonefritis en el que la neutralización de MCP-1 reduce significativamente la síntesis de TGF- β , colágeno tipo IV y el desarrollo de semilunas (Lloyd y col., 1997; Schneider y col., 1999).

De acuerdo con nuestros resultados, es posible un efecto autocrino de MCP-1 sobre los fibroblastos dérmicos en la ES puesto que expresan el receptor CCR2. Los presentes datos en fibroblastos esclerodérmicos *in vitro* sugieren que, en algunas líneas de fibroblastos dérmicos, la inhibición autocrina de MCP-1 disminuye la expresión de procolágeno- α 1(I). No obstante este efecto no fue uniforme en todas las líneas. Los cultivos de fibroblastos son una mezcla muy heterogénea de clones fenotípicamente distintos con alta variabilidad en la expresión de procolágeno y esto puede explicar, en parte, el efecto discordante de MCP-1 (Falanga y col., 1995; Jelaska y col., 1996). Un aspecto a tener en cuenta es que la concentración de MCP-1 que hemos encontrado en los sobrenadantes de los cultivos celulares es muy inferior a la concentración de MCP-1 descrita en los trabajos referidos, capaz de estimular la expresión de TGF- β y, por tanto, la síntesis de colágeno. Sin embargo, un dato a tener en cuenta de acuerdo con los resultados inmunohistoquímicos es que también los queratinocitos y células mononucleares contribuyen a la síntesis de MCP-1 en las lesiones esclerodérmicas, de forma que las concentraciones alcanzadas *in vivo* podrían ser más elevadas que las que observamos en fibroblastos en cultivo. Nuestros resultados también apoyan un posible efecto profibrótico de MCP-1, a través de un efecto proliferativo sobre los fibroblastos dérmicos en cultivo.

Además del efecto directo de MCP-1 sobre los fibroblastos, esta quimioquina puede participar en el desarrollo de fibrosis por su efecto sobre otras células residentes del tejido conectivo como las células cebadas. En la piel de la ES se produce una infiltración y degranulación de las células cebadas (Seibold y col., 1990; Irani y col., 1992). Las células cebadas pueden secretar múltiples mediadores con capacidad de activar la síntesis de colágeno como IL-4, TGF- β o TNF- α (Henkel y col., 1992; Moller y col., 1998; Kanbe y col., 1999). Por otra parte, MCP-1 es a su vez un potente inductor de la degranulación de las células cebadas aumentando así la secreción de IL-4 (Campbell y col., 1999). En un modelo animal de inflamación de la vía aérea por asma, se ha demostrado que las células cebadas son capaces de estimular a los fibroblastos y de inducir la síntesis de colágeno al secretar MCP-1 y, este efecto está mediado por el TGF- β y el TNF- α liberados por los mastocitos (Gordon JR, 2000).

Por tanto, MCP-1 parece ser una quimioquina con múltiples posibles funciones en la patogenia de las enfermedades inflamatorias fibrosantes y en la ES. Además de sus efectos quimioatrayentes y moduladores de respuestas Th2, parece participar directamente en la fibrogénesis. La manipulación del sistema MCP-1/CCR2 en modelos animales ha demostrado efectos terapéuticos en la placa arteriosclerótica (Boring Y col., 1998) o en la glomeruloesclerosis (Schneider y col., 1999). Por tanto, el desarrollo de inhibidores de este sistema abre una nueva vía terapéutica en la ES, una enfermedad para la que actualmente no existen alternativas eficaces.

Conclusiones

Conclusiones

1. Los fibroblastos dérmicos pueden participar en la respuesta inflamatoria como células centinela con capacidad para reclutar leucocitos mediante la síntesis específica de las quimioquinas MCP-1 e IL-8.
2. Los fibroblastos dérmicos normales expuestos *in vitro* a la hipoxia responden con un aumento en la expresión y secreción de MCP-1 que es, en parte, dependiente de la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1.
3. La proteína MCP-1 secretada por los fibroblastos dérmicos normales ejerce *in vitro* un efecto quimiotáctico sobre células mononucleares.
4. Los fibroblastos dérmicos en la ES presentan *in vitro* una elevada expresión constitutiva de MCP-1 e IL-8 y una menor respuesta a la hipoxia y/o reoxigenación. Estas alteraciones no se deben a diferencias en la activación basal de los factores NF- κ B y AP-1.
5. El análisis de secciones de piel esclerodérmica confirma una elevada expresión de MCP-1 por los fibroblastos, y también en otros tipos celulares como queratinocitos y células mononucleares.
6. La producción anormal de MCP-1 por los fibroblastos esclerodérmicos puede participar en la patogenia de la ES a través de su acción sobre células mononucleares y como un factor profibrótico con capacidad para inducir la expresión de procolágeno α 1(I) y la proliferación de fibroblastos.
7. La participación de MCP-1 en la patogenia de la ES apoya el ensayo de inhibidores de este factor o su receptor CCR2 como opción terapéutica.

Referencias

- Abate C**, Patel L, Rauscher FJ III, Curran T: Redox regulation of Fos and Jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 1990; 249: 1157-1161.
- Abi-Younes S**, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD: The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 2000; 96: 50-57.
- Abraham D**, Lupoli S, McWhirter A, Plater-Zyberk C, Piela TH, Korn JH, Olsen I, Black C: Expression and function of surface antigens on scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 1164-1172.
- Adema GJ**, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S, Foster J, Xu Y, Nooyen P, McClanahan T, Bacon KB, Figdor CG: A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 1997; 387: 713-717.
- Agarwal S**, Baran C, Piesco NP, Quintero JC, Langkamp HH, Johns LP, Chandra CS: Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin-1 beta. *J Periodontal Res* 1995; 30: 382-389.
- Alcami A**, Smith GL: Cytokine receptors encoded by poxviruses: a lesson in cytokine biology. *Immunol Today* 1995; 16: 474-478.
- Antoniades HN**, Neville-Golden J, Galanopoulos T, Kradin RL, Valente AJ, Graves DT: Expression of monocyte chemoattractant protein 1 mRNA in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 5371-5375.
- Arenzana-Seisdedos F**, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay RT, Virelizier JL, Dargemont C: Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* 1997; 110 :369-378.
- Arnould T**, Michiels C, Remacle J: Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia: involvement of PAF, CD18/CD11b, and ICAM-1. *Am J Physiol* 1993; 264: C1102-10.
- Baeuerle PA**, Henkel T: Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-179.
- Baggiolini M**, Dewald B, Moser B: Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 675-705.
- Baggiolini M**: Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392: 565-568.
- Bailey AJ**, Black CM: The role of connective tissue in the pathogenesis of scleroderma. En *Systemic Sclerosis: Scleroderma*. Editores M.I.V. Jayson y C.M. Black. New York, John Wiley & Sons. 1988; 75-105.
- Baird A**, Durkin T: Inhibition of endothelial cell proliferation by type beta-transforming growth factor: interactions with acidic and basic fibroblast growth factors. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 138: 476-482.
- Bandyopadhyay RS**, Phelan M, Faller DV: Hypoxia induces AP-1 regulated genes and AP-1 transcription factor binding in human endothelial and other cell types. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1264: 72-78.
- Barker JN**, Jones ML, Swenson CL, Sarma V, Mitra RS, Ward PA, Johnson KJ, Fantone JC, Dixit VM, Nickoloff BJ: Monocyte chemotaxis and activating factor production by keratinocytes in response to IFN-gamma. *J Immunol* 1991; 146: 1192-1197.
- Barroga CF**, Stevenson JK, Schwarz EM, Verma IM: Constitutive phosphorylation of I kappa B alpha by casein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 7637-7641.
- Bashey RI**, Millan A, Jimenez SA: Increased biosynthesis of glycosaminoglycans by scleroderma fibroblasts in culture. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 1040-1045.

- Bazan JF**, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ: A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997; 385: 640-644.
- Blake DR**, Winyard PG, Marok R: The contribution of hypoxia-reperfusion injury to inflammatory synovitis: the influence of reactive oxygen intermediates on the transcriptional control of inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 723: 308-17.
- Bolster MB**, Ludwicka A, Sutherland SE, Strange C, Silver RM: Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 743-751.
- Bordron A**, Dueymes M, Levy Y, Jamin C, Leroy JP, Piette JC, Shoenfeld Y, Youinou PY: The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 1998; 101: 2029-2035.
- Boring L**, Gosling J, Cleary M, Charo IF: Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998; 394: 894-897.
- Botstein GR**, Sherer GK, Leroy EC: Fibroblast selection in scleroderma. An alternative model of fibrosis. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 189-195.
- Bours V**, Villalobos J, Burd PR, Kelly K, Siebenlist U: Cloning of a mitogen-inducible gene encoding a kappa B DNA-binding protein with homology to the rel oncogene and to cell-cycle motifs. *Nature* 1990; 348: 76-80.
- Bradford MM**: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Brown AM**, Linhoff MW, Stein B, Wright KL, Baldwin AS, Jr., Basta PV, Ting JP: Function of NF-kappa B/Rel binding sites in the major histocompatibility complex class II invariant chain promoter is dependent on cell-specific binding of different NF-kappa B/Rel subunits. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 2926-2935.
- Brown Z**, Strieter RM, Neild GH, Thompson RC, Kunkel SL, Westwick J: IL-1 receptor antagonist inhibits monocyte chemotactic peptide 1 generation by human mesangial cells. *Kidney Int* 1992; 42: 95-101.
- Burkly L**, Hession C, Ogata L, Reilly C, Marconi LA, Olson D, Tizard R, Cate R, Lo D: Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 1995; 373: 531-536.
- Caligiuri MA**, Murray C, Robertson MJ, Wang E, Cochran K, Cameron C, Schow P, Ross ME, Klumpp TR, Soiffer RJ, et al: Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2. *J Clin Invest* 1993; 91: 123-132.
- Caplan MS**, Adler L, Kelly A, Hsueh W: Hypoxia increases stimulus-induced PAF production and release from human umbilical vein endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1128: 205-210.
- Carvalho D**, Savage CO, Black CM, Pearson JD: IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J Clin Invest* 1996; 97: 111-119.
- Casciola-Rosen L**, Wigley F, Rosen A: Scleroderma autoantigens are uniquely fragmented by metal-catalyzed oxidation reactions: implications for pathogenesis. *J Exp Med* 1997; 185: 71-79.
- Chakravorty D**, Kumar KS: Interaction of lipopolysaccharide with human small intestinal lamina propria fibroblasts favors neutrophil migration and peripheral blood mononuclear cell adhesion by the production of proinflammatory mediators and adhesion molecules. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1453 :261-272.

- Choe H**, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, MacKay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J: The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996; 85: 1135-1148.
- Chollet-Martin S**, Montravers P, Gibert C, Elbim C, Desmots JM, Fagon JY, Gougerot-Pocidalo MA: High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome. *Infect Immun* 1993; 61: 4553-4559.
- Chomczynski P**, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
- Clark-Lewis I**, Kim KS, Rajarathnam K, Gong JH, Dewald B, Moser B, Baggiolini M, Sykes BD: Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukoc Biol* 1995; 57: 703-711.
- Clark-Lewis I**, Schumacher C, Baggiolini M, Moser B: Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH₂-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. *J Biol Chem* 1991; 266: 23128-23134.
- Crofford LJ**, Wilder RL, Ristimaki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, Hla T: Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest* 1994; 93: 1095-1101.
- Dawes KE**, Peacock AJ, Gray AJ, Bishop JE, Laurent GJ: Characterization of fibroblast mitogens and chemoattractants produced by endothelial cells exposed to hypoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10: 552-559.
- Denton CP**, Shi-Wen X, Sutton A, Abraham DJ, Black CM, Pearson JD: Scleroderma fibroblasts promote migration of mononuclear leucocytes across endothelial cell monolayers. *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 293-300.
- Deuel TF**, Kawahara RS, Mustoe TA, Pierce AF: Growth factors and wound healing: platelet-derived growth factor as a model cytokine. *Annu Rev Med* 1991; 42: 567-584.
- Douvas A**, Takehana Y: Cross-reactivity between autoimmune anti-U1 snRNP antibodies and neutralizing epitopes of HIV-1 gp120/41. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 253-262.
- Douvas AS**, Achten M, Tan EM: Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma. *J Biol Chem* 1979; 254: 10514-10522.
- Dragic T**, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA: HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC- CKR-5. *Nature* 1996; 381: 667-673.
- Duncan MR**, Berman B: Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 686-692.
- Duque N**, Gomez-Guerrero C, Egido J: Interaction of IgA with Fc alpha receptors of human mesangial cells activates transcription factor nuclear factor-kappa B and induces expression and synthesis of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8, and IFN-inducible protein 10. *J Immunol* 1997; 159: 3474-3482.
- Ebnet K**, Brown KD, Siebenlist UK, Simon MM, Shaw S: *Borrelia burgdorferi* activates nuclear factor-kappa B and is a potent inducer of chemokine and adhesion molecule gene expression in endothelial cells and fibroblasts. *J Immunol* 1997; 158: 3285-3292.

- Eckes B**, Mauch C, Huppe G, Krieg T: Downregulation of collagen synthesis in fibroblasts within three-dimensional collagen lattices involves transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *FEBS Lett* 1993; 318: 129-133.
- Edwards DR**, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJ, Angel P, Heath JK: Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 1987; 6: 1899-1904.
- Elias JA**, Freundlich B, Kern JA, Rosenbloom J: Cytokine networks in the regulation of inflammation and fibrosis in the lung. *Chest* 1990; 97: 1439-1445.
- Feghali CA**, Bost KL, Boulware DW, Levy LS: Mechanisms of pathogenesis in scleroderma. I. Overproduction of interleukin 6 by fibroblasts cultured from affected skin sites of patients with scleroderma. *J Rheumatol* 1992; 19: 1207-1211.
- Feghali CA**, Boulware DW, Ferriss JA, Levy LS: Expression of c-myc, c-myb, and c-sis in fibroblasts from affected and unaffected skin of patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity* 1993; 16: 167-171.
- Feghali CA**, Wright TM: Identification of multiple, differentially expressed messenger RNAs in dermal fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1451-1457.
- Feng Y**, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996; 272: 872-877.
- Fleischmajer R**, Perlish JS, Burgeson RE, Shaikh-Bahai F, Timpl R: Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 580: 161-175.
- Fleischmajer R**, Perlish JS, Krieg T, Timpl R: Variability in collagen and fibronectin synthesis by scleroderma fibroblasts in primary culture. *J Invest Dermatol* 1981; 76: 400-403.
- Frade JMR**, Llorente M, Mellado M, Alcami J, Gutierrez-Ramos JC, Zaballos A, Real G, Martinez-A C: The amino-terminal domain of the CCR2 chemokine receptor acts as coreceptor for HIV-1 infection. *J Clin Invest* 1997; 100: 497-502.
- Fries KM**, Sempowski GD, Gaspari AA, Blieden T, Looney RJ, Phipps RP: CD40 expression by human fibroblasts. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 77: 42-51.
- Fujita T**, Nolan GP, Ghosh S, Baltimore D: Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF-kappa B. *Genes Dev* 1992; 6: 775-787.
- Gao JL**, Kuhns DB, Tiffany HL, McDermott D, Li X, Francke U, Murphy PM: Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein 1 alpha/RANTES receptor. *J Exp Med* 1993; 177: 1421-1427.
- Gharaee-Kermani M**, Denholm EM, Phan SH: Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem* 1996; 271: 17779-17784.
- Ghosh S**, May MJ, Kopp EB: NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225-260.
- Gillitzer R**, Wolff K, Tong D, Muller C, Yoshimura T, Hartmann AA, Stingl G, Berger R: MCP-1 mRNA expression in basal keratinocytes of psoriatic lesions. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 127-131.

- Godiska R**, Chantry D, Raport CJ, Sozzani S, Allavena P, Leviten D, Mantovani A, Gray PW: Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med* 1997; 185: 1595-1604.
- Gong JH**, Ratkay LG, Waterfield JD, Clark-Lewis I: An antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) inhibits arthritis in the MRL-lpr mouse model. *J Exp Med* 1997; 186 :131-137.
- Gonzalez-Cuadrado S**, Bustos C, Ruiz-Ortega M, Ortiz A, Guijarro C, Plaza JJ, Egido J: Expression of leucocyte chemoattractants by interstitial renal fibroblasts: up-regulation by drugs associated with interstitial fibrosis. *Clin Exp Immunol* 1996; 106: 518-522.
- Gospodarowicz D**: Biological activities of fibroblast growth factors. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 638: 1-8.
- Gruschwitz M**, Muller PU, Sepp N, Hofer E, Fontana A, Wick G: Transcription and expression of transforming growth factor type beta in the skin of progressive systemic sclerosis: a mediator of fibrosis? *J Invest Dermatol* 1990; 94: 197-203.
- Guyton KZ**, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ: Activation of mitogen activated protein kinase: role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 1996; 271: 7138-7142.
- Hainaut P**, Milner J: Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding in vitro. *Cancer Res* 1993; 53: 4469-4473.
- Hasegawa M**, Sato S, Takehara K: Augmented production of chemokines (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 159-165.
- Hempel SL**, Monick MM, Hunninghake GW: Effect of hypoxia on release of IL-1 and TNF by human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14: 170-176.
- Henkel G**, Weiss DL, McCoy R, Deloughery T, Tara D, Brown MA: A Dnase I-hypersensitive site in the second intron of the murine IL-4 gene defines a mast cell-specific enhancer. *J Immunol* 1992; 149: 3239-3246.
- Hernandez-Presa MA**, Bustos C, Ortega M, Tunon J, Ortega L, Egido J: ACE inhibitor quinapril reduces the arterial expression of NF-kappaB- dependent proinflammatory factors but not of collagen I in a rabbit model of atherosclerosis. *Am J Pathol* 1998; 153: 1825-1837.
- Hitraya EG**, Varga J, Artlett CM, Jimenez SA: Identification of elements in the promoter region of the alpha1(I) procollagen gene involved in its up-regulated expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 2048-2058.
- Hogaboam CM**, Bone-Larson CL, Lipinski S, Lukacs NW, Chensue SW, Strieter RM, Kunkel SL: Differential monocyte chemoattractant protein-1 and chemokine receptor 2 expression by murine lung fibroblasts derived from Th1- and Th2-type pulmonary granuloma models. *J Immunol* 1999; 163: 2193-2201.
- Horuk R**, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ, Miller LH: A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* 1993; 261: 1182-1184.
- Huffstutter JE**, DeLustro FA, Leroy EC: Cellular immunity to collagen and laminin in scleroderma. *Arthritis Rheum* 1985; 28: 775-780.
- Huleihel M**, Douvdevani A, Segal S, Apte RN: Regulation of interleukin 1 generation in immune-activated fibroblasts. *Eur J Immunol* 1990; 20: 731-738.

- Inagaki Y**, Truter S, Ramirez F: Transforming growth factor-beta stimulates alpha 2(I) collagen gene expression through a cis-acting element that contains an Sp1-binding site. *J Biol Chem* 1994; 269: 14828-14834.
- Ishikawa O**, Leroy EC, Trojanowska M: Mitogenic effect of transforming growth factor beta 1 on human fibroblasts involves the induction of platelet-derived growth factor alpha receptors. *J Cell Physiol* 1990; 145: 181-186.
- Ivarsson M**, McWhirter A, Black CM, Rubin K: Impaired regulation of collagen pro-alpha 1(I) mRNA and change in pattern of collagen-binding integrins on scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 216-221.
- Jelaska A**, Arakawa M, Broketa G, Korn JH: Heterogeneity of collagen synthesis in normal and systemic sclerosis skin fibroblasts. Increased proportion of high collagen-producing cells in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1338-1346.
- Jobin C**, Holt L, Bradham CA, Streetz K, Brenner DA, Sartor RB: TNF receptor-associated factor-2 is involved in both IL-1 beta and TNF- alpha signaling cascades leading to NF-kappa B activation and IL-8 expression in human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1999; 162: 4447-4454.
- Jonjic N**, Peri G, Bernasconi S, Sciacca FL, Colotta F, Pelicci P, Lanfranccone L, Mantovani A: Expression of adhesion molecules and chemotactic cytokines in cultured human mesothelial cells. *J Exp Med* 1992; 176: 1165-1174.
- Kadonaga JT**, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R: Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 1987; 51: 1079-1090.
- Kahaleh MB**, DeLustro F, Bock W, Leroy EC: Human monocyte modulation of endothelial cells and fibroblast growth: possible mechanism for fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1986; 39 :242-255.
- Kahaleh MB**, Fan PS: Mechanism of serum-mediated endothelial injury in scleroderma: identification of a granular enzyme in scleroderma skin and sera. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 83: 32-40.
- Kahaleh MB**, Sherer GK, LeRoy EC: Endothelial injury in scleroderma. *J Exp Med* 1979; 149: 1326-1335.
- Kahari VM**, Sandberg M, Kalimo H, Vuorio T, Vuorio E: Identification of fibroblasts responsible for increased collagen production in localized scleroderma by in situ hybridization. *J Invest Dermatol* 1988; 90: 664-670.
- Kanbe N**, Kurosawa M, Nagata H, Saitoh H, Miyachi Y: Cord blood-derived human cultured mast cells produce transforming growth factor beta1. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 105-113.
- Kantor TV**, Friberg D, Medsger TA, Jr., Buckingham RB, Whiteside TL: Cytokine production and serum levels in systemic sclerosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 65: 278-285.
- Karakurum M**, Shreeniwas R, Chen J, Pinsky D, Yan SD, Anderson M, Sunouchi K, Major J, Hamilton T, Kuwabara K, et al: Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; 93: 1564-1570.
- Kawaguchi Y**, Harigai M, Hara M, Suzuki K, Kawakami M, Ishizuka T, Hidaka T, Kitani A, Kawagoe M, Nakamura H: Increased interleukin 1 receptor, type I, at messenger RNA and protein level in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 184: 1504-1510.
- Kawaguchi Y**, Suzuki K, Hara M, Hidaka T, Ishizuka T, Kawagoe M, Nakamura H: Increased endothelin-1 production in fibroblasts derived from patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 506-510.
- Kawaguchi Y**: IL-1 alpha gene expression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 445-450.

- Kawakami T**, Ihn H, Xu W, Smith E, LeRoy C, Trojanowska M: Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 47-51.
- Keane MP**, Arenberg DA, Lynch JP, 3rd, Whyte RI, Iannettoni MD, Burdick MD, Wilke CA, Morris SB, Glass MC, DiGiovine B, Kunkel SL, Strieter RM: The CXC chemokines, IL-8 and IP-10, regulate angiogenic activity in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol* 1997; 159: 1437-1443.
- Kelner GS**, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, et al: Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 1994; 266: 1395-1399.
- Kieran M**, Blank V, Logeat F, Vandekerckhove J, Lottspeich F, Le Bail O, Urban MB, Kourilsky P, Baeuerle PA, Israel A: The DNA binding subunit of NF-kappa B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product. *Cell* 1990; 62: 1007-1018.
- Kikuchi K**, Hartl CW, Smith EA, Leroy EC, Trojanowska M: Direct demonstration of transcriptional activation of collagen gene expression in systemic sclerosis fibroblasts: insensitivity to TGF beta 1 stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187: 45-50.
- Klareskog L**, Gustafsson R, Scheynius A, Hallgren R: Increased expression of platelet-derived growth factor type B receptors in the skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1534-1541.
- Kledal TN**, Rosenkilde MM, Schwartz TW: Selective recognition of the membrane-bound CX3C chemokine, fractalkine, by the human cytomegalovirus-encoded broad-spectrum receptor US28. *FEBS Lett* 1998; 18: 209-214.
- Koch AE**, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM: Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992; 258: 1798-1801.
- Koong AC**, Chen EY, Giaccia AJ: Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res* 1994; 54:1425-30.
- Kuwabara K**, Ogawa S, Matsumoto M, Koga S, Clauss M, Pinsky DJ, Lyn P, Leavy J, Witte L, Joseph-Silverstein J, et al: Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4606-4610.
- Lahrtz F**, Piali L, Nadal D, Pfister HW, Spanaus KS, Baggiolini M, Fontana A: Chemotactic activity on mononuclear cells in the cerebrospinal fluid of patients with viral meningitis is mediated by interferon-gamma inducible protein-10 and monocyte chemotactic protein-1. *Eur J Immunol* 1997; 27: 2484-2489.
- Lain de Lera T**, Figueira L, Martin AG, Dargemont C, Pedraza MA, Bermejo M, Bonay P, Fresno M, Alcami J: Expression of IkappaBalpha in the nucleus of human peripheral blood T lymphocytes. *Oncogene* 1999; 18: 1581-1588.
- Laudanna C**, Campbell JJ, Butcher EC: Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* 1996; 271: 981-983.
- Leof EB**, Proper JA, Goustin AS, Shipley GD, DiCorleto PE, Moses HL: Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor beta: a proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 2453-2457.

- Leroy EC**, Mercurio S, Sherer GK: Replication and phenotypic expression of control and scleroderma human fibroblasts: responses to growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 1286-1290.
- Leroy EC**: Connective tissue synthesis by scleroderma skin fibroblasts in cell culture. *J Exp Med* 1972; 135: 1351-1362.
- Lin R**, Heylbroeck C, Genin P, Pitha PM, Hiscott J: Essential role of interferon regulatory factor 3 in direct activation of RANTES chemokine transcription. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 959-966.
- Lodi PJ**, Garrett DS, Kuszewski J, Tsang ML, Weatherbee JA, Leonard WJ, Gronenborn AM, Clore GM: High-resolution solution structure of the beta chemokine hMIP-1 beta by multidimensional NMR. *Science* 1994; 263: 1762-1767.
- Loetscher P**, Seitz M, Baggiolini M, Moser B: Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J Exp Med* 1996; 184: 569-577.
- Lukacs NW**, Chensue SW, Smith RE, Strieter RM, Warmington K, Wilke C, Kunkel SL: Production of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha by inflammatory granuloma fibroblasts. *Am J Pathol* 1994; 144: 711-718.
- Lukacs NW**, Strieter RM, Shaklee CL, Chensue SW, Kunkel SL: Macrophage inflammatory protein-1 alpha influences eosinophil recruitment in antigen-specific airway inflammation. *Eur J Immunol* 1995; 25: 245-251.
- Luster AD**, Ravetch JV: Genomic characterization of a gamma-interferon-inducible gene (IP-10) and identification of an interferon-inducible hypersensitive site. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 3723-3731.
- Luster AD**, Rothenberg ME: Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *J Leukoc Biol* 1997; 62: 620-633.
- Luster AD**: Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436-445.
- Lynch SE**, Nixon JC, Colvin RB, Antoniades HN: Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 7696-7700.
- Majewski S**, Hunzelmann N, Johnson JP, Jung C, Mauch C, Ziegler-Heitbrock HW, Riethmuller G, Krieg T: Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the skin of patients with systemic scleroderma. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 667-671.
- Mantovani A**: The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 1999; 20: 254-257.
- Marra F**, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pastacaldi S, Pinzani M, Romanelli RG, Laffi G, Gentilini P: Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol* 1998; 152: 423-430.
- Martin T**, Cardarelli PM, Parry GC, Felts KA, Cobb RR: Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kappa B and AP-1. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1091-1097.
- Marumo T**, Schini-Kerth VB, Fisslthaler B, Busse R: Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* 1997; 96: 2361-2367.
- Matsumoto M**, Sakao Y, Akira S: Inducible expression of nuclear factor IL-6 increases endogenous gene expression of macrophage inflammatory protein-1 alpha, osteopontin and CD14 in a monocytic leukemia cell line. *Int Immunol* 1998; 10: 1825-1835.

- Matthews JR**, Wakasugi N, Virelizier JL, Yodoi J, Hay RT: Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF- κ B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62: *Nucleic Acid Res* 1992; 20: 3821-3830.
- Mattila L**, Airola K, Ahonen M, Hietarinta M, Black C, Saarialho-Kere U, Kahari VM: Activation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) mRNA expression in scleroderma skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 416-421.
- Maul GG**, Jimenez SA, Riggs E, Ziemnicka-Kotula D: Determination of an epitope of the diffuse systemic sclerosis marker antigen DNA topoisomerase I: sequence similarity with retroviral p30gag protein suggests a possible cause for autoimmunity in systemic sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 8492-8496.
- Mavalia C**, Scaletti C, Romagnani P, Carossino AM, Pignone A, Emmi L, Pupilli C, Pizzolo G, Maggi E, Romagnani S: Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. *Am J Pathol* 1997; 151: 1751-1758.
- Moller A**, Henz BM, Grutzkau A, Lippert U, Aragane Y, Schwarz T, Kruger-Krasagakes S: Comparative cytokine gene expression: regulation and release by human mast cells. *Immunology* 1998; 93: 289-295.
- Murphy PM**: The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 593-633.
- Myrset AH**, Bostad A, Jamin N, Lirsac PN, Toma F, Gabrielsen OS: DNA and redox state induced conformational changes in the DNA-binding domain of the Myb oncoprotein. *EMBO J* 1993; 12: 4625-4633.
- Nagasawa T**, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T: Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996; 382: 635-638.
- Nelken NA**, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN: Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 1991; 88: 1121-1127.
- Nolan GP**, Ghosh S, Liou HC, Tempst P, Baltimore D: DNA binding and I kappa B inhibition of the cloned p65 subunit of NF- kappa B, a rel-related polypeptide. *Cell* 1991; 64: 961-969.
- Oemar BS**, Luscher TF: Connective tissue growth factor. Friend or foe? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1483-1489.
- Olashaw NE**: Inducible activation of RelB in fibroblasts. *J Biol Chem* 1996; 271: 30307-30310.
- Ono K**, Matsumori A, Furukawa Y, Igata H, Shioi T, Matsushima K, Sasayama S: Prevention of myocardial reperfusion injury in rats by an antibody against monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1. *Lab Invest* 1999; 79: 195-203.
- Pablos JL**, Amara A, Bouloc A, Santiago B, Caruz A, Galindo M, Delaunay T, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F: Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *Am J Pathol* 1999; 155: 1577-1586.
- Pan Y**, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA, Vath J, Gosselin M, Ma J, Dussault B, Woolf E, Alperin G, Culpepper J, Gutierrez-Ramos JC, Gearing D: Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 1997; 387: 611-617.
- Peltonen J**, Kahari L, Uitto J, Jimenez SA: Increased expression of type VI collagen genes in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1829-1835.
- Ping D**, Boekhoudt GH, Rogers EM, Boss JM: Nuclear factor-kappa B p65 mediates the assembly and activation of the TNF-responsive element of the murine monocyte chemoattractant-1 gene. *J Immunol* 1999; 162: 727-734.

- Plaksin D**, Baeuerle PA, Eisenbach L: KBF1 (p50 NF-kappa B homodimer) acts as a repressor of H-2Kb gene expression in metastatic tumor cells. *J Exp Med* 1993; 177: 1651-1662.
- Plater-Zyberk C**, Hoogewerf AJ, Proudfoot AE, Power CA, Wells TN: Effect of a CC chemokine receptor antagonist on collagen induced arthritis in DBA/1 mice. *Immunol Lett* 1997; 57: 117-120.
- Pollard KM**, Lee DK, Casiano CA, Bluthner M, Johnston MM, Tan EM: The autoimmunity-inducing xenobiotic mercury interacts with the autoantigen fibrillar and modifies its molecular and antigenic properties. *J Immunol* 1997; 158: 3521-3528.
- Postlethwaite AE**, Seyer JM: Fibroblast chemotaxis induction by human recombinant interleukin-4. Identification by synthetic peptide analysis of two chemotactic domains residing in amino acid sequences 70-88 and 89-122. *J Clin Invest* 1991; 87: 2147-2152.
- Prescott RJ**, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P: Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol* 1992; 166: 255-263.
- Raghow R**, Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH: Transforming growth factor-beta 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.
- Roberts AB**, Flanders KC, Kondaiah P, Thompson NL, Van Obberghen-Schilling E, Wakefield L, Rossi P, de Crombrughe B, Heine U, Sporn MB: Transforming growth factor beta: biochemistry and roles in embryogenesis, tissue repair and remodeling, and carcinogenesis. *Recent Prog Horm Res* 1988; 44: 157-197.
- Roebuck KA**, Carpenter LR, Lakshminarayanan V, Page SM, Moy JN, Thomas LL: Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *J Leukoc Biol* 1999; 65: 291-298.
- Rollins BJ**, Stier P, Ernst T, Wong GG: The human homolog of the JE gene encodes a monocyte secretory protein. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 4687-4695.
- Rossi P**, Karsenty G, Roberts AB, Roche NS, Sporn MB, de Crombrughe B: A nuclear factor 1 binding site mediates the transcriptional activation of a type I collagen promoter by transforming growth factor-beta. *Cell* 1988; 52: 405-414.
- Roth M**, Nauck M, Yousefi S, Tamm M, Blaser K, Perruchoud AP, Simon HU: Platelet-activating factor exerts mitogenic activity and stimulates expression of interleukin 6 and interleukin 8 in human lung fibroblasts via binding to its functional receptor. *J Exp Med* 1996; 184: 191-201.
- Rothenberg ME**, MacLean JA, Pearlman E, Luster AD, Leder P: Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen- induced tissue eosinophilia. *J Exp Med* 1997; 185: 785-790.
- Ruiz-Ortega M**, Bustos C, Hernández-Presa MA, Lorenzo O, Plaza JJ, Egido J: Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis. *J Immunol* 1998; 161: 430-439.
- Sallusto F**, MacKay CR, Lanzavecchia A: Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 1997; 277: 2005-2007.
- Sánchez-Madrid F**, del Pozo MA: Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J* 1999; 18: 501-511.
- Saurer L**, Reber P, Schaffner T, Buchler MW, Buri C, Kappeler A, Walz A, Friess H, Mueller C: Differential expression of chemokines in normal pancreas and in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2000; 118: 356-367.

- Schieven GL**, Kirihara JM, Burg DL, Geahlen RL, Ledbetter JA: p72^{syk} tyrosine kinase is activated by oxidizing conditions that induce lymphocyte tyrosine phosphorylation and Ca²⁺ signals. *J Biol Chem* 1993; 269: 20718-20726.
- Schieven GL**, Kirihara JM, Myers DE, Ledbetter JA, Uckun FM: Reactive oxygen intermediates activate NF- κ B in a tyrosine kinase-dependent mechanism and in combination with vanadate activate the p56(lck) and p59(fyn) tyrosine kinases in human lymphocytes. *Blood* 1993; 82: 1212-1220.
- Schneider A**, Panzer U, Zahner G, Wenzel U, Wolf G, Thaiss F, Helmchen U, Stahl RA: Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-beta. *Kidney Int* 1999; 56: 135-144.
- Schwarz EM**, Van Antwerp D, Verma IM: Constitutive phosphorylation of IkappaBalpha by casein kinase II occurs preferentially at serine 293: requirement for degradation of free IkappaBalpha. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3554-3559.
- Seibold JR**, Giorno RC, Claman HN: Dermal mast cell degranulation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1702-1709.
- Seibold JR**: Scleroderma. En: Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB, eds. Textbook of Rheumatology (3rd ed.) Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1989; 1215-1244.
- Semenza GL**: Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 551-578.
- Sempowski GD**, Chess PR, Phipps RP: CD40 is a functional activation antigen and B7-independent T cell costimulatory molecule on normal human lung fibroblasts. *J Immunol* 1997; 158: 4670-4677.
- Sen R**, Baltimore D: Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; 46: 705-716.
- Sgonc R**, Gruschwitz MS, Dietrich H, Recheis H, Gershwin ME, Wick G: Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest* 1996; 98: 785-792.
- Shreeniwas R**, Koga S, Karakurum M, Pinsky D, Kaiser E, Brett J, Wolitzky BA, Norton C, Plocinski J, Benjamin W, et al: Hypoxia-mediated induction of endothelial cell interleukin-1 alpha. An autocrine mechanism promoting expression of leukocyte adhesion molecules on the vessel surface. *J Clin Invest* 1992; 90: 2333-2339.
- Shyy YJ**, Li YS, Kolattukudy PE: Activation of MCP-1 gene expression is mediated through multiple signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 693-699.
- Silman AJ**, Black CM; Welsh KI: Epidemiology, Demographics, Genetics. En: Clements PJ, Furst DE, eds. Systemic Sclerosis. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996; 23-49.
- Slack JL**, Liska DJ, Bornstein P: Regulation of expression of the type I collagen genes. *Am J Med Genet* 1993; 45: 140-151.
- Smith RS**, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP: Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol* 1997; 151: 317-322.
- Sorensen TL**, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, Qin S, Rottman J, Sellebjerg F, Strieter RM, Frederiksen JL, Ransohoff RM: Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 1999; 103: 807-815.

- Steen VD**, Ziegler GL, Rodnan GP, Medsger TA, Jr: Clinical and laboratory associations of anticentromere antibody in patients with progressive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 125-131.
- Strieter RM**, Wiggins R, Phan SH, Wharram BL, Showell HJ, Remick DG, Chensue SW, Kunkel SL: Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine-treated human fibroblasts and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 162: 694-700.
- Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Committee Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee**: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-90.
- Szekanecz Z**, Strieter RM, Kunkel SL, Koch AE: Chemokines in rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 1998; 20: 115-132.
- Takeda K**, Hatamochi A, Ueki H, Nakata M, Oishi Y: Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 359-363.
- Takeshita A**, Chen Y, Watanabe A, Kitano S, Hanazawa S: TGF-beta induces expression of monocyte chemoattractant JE/monocyte chemoattractant protein 1 via transcriptional factor AP-1 induced by protein kinase in osteoblastic cells. *J Immunol* 1995; 155: 419-426.
- Tamm M**, Bihl M, Eickelberg O, Stulz P, Perruchoud AP, Roth M: Hypoxia-induced interleukin-6 and interleukin-8 production is mediated by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor in primary human lung cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 653-661.
- Tanaka Y**, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S: T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* 1993; 361: 79-82.
- Tanaka Y**, Fujii K, Hubscher S, Aso M, Takazawa A, Saito K, Ota T, Eto S: Heparan sulfate proteoglycan on endothelium efficiently induces integrin-mediated T cell adhesion by immobilizing chemokines in patients with rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1365-1377.
- Tomura K**, Narumi S: Differential induction of interferon (IFN)-inducible protein 10 following differentiation of a monocyte, macrophage cell lineage is related to the changes of nuclear proteins bound to IFN stimulus response element and kappaB sites. *Int J Mol Med* 1999; 3: 477-484.
- Trotta F**, Biagini G, Cenacchi G, Ballardini G, Varotti C, Passarini B, Garbisa S, Faccani G, Bianchi FB, Govoni E: Microvascular changes in progressive systemic sclerosis: immunohistochemical and ultrastructural study. *Clin Exp Rheumatol* 1984; 2: 209-215.
- Ueda A**, Okuda K, Ohno S, Shirai A, Igarashi T, Matsunaga K, Fukushima J, Kawamoto S, Ishigatsubo Y, Okubo T: NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J Immunol* 1994; 153: 2052-2063.
- Uguccioni M**, Gionchetti P, Robbiani DF, Rizzello F, Peruzzo S, Campieri M, Baggiolini M: Increased expression of IP-10, IL-8, MCP-1, and MCP-3 in ulcerative colitis. *Am J Pathol* 1999; 155: 331-336.
- Van Der Voorn P**, Tekstra J, Beelen RH, Tensen CP, Van Der Valk P, De Groot CJ: Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol* 1999; 154: 45-51.
- Varga J**, Rosenbloom J, Jimenez SA: Transforming growth factor beta (TGF beta) 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.

- Villiger PM**, Terkeltaub R, Lotz M: Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression in human articular cartilage. Induction by peptide regulatory factors and differential effects of dexamethasone and retinoic acid. *J Clin Invest* 1992; 90: 488-496.
- Vuorio T**, Kahari VM, Black C, Vuorio E: Expression of osteonectin, decorin, and transforming growth factor-beta 1 genes in fibroblasts cultured from patients with systemic sclerosis and morphea. *J Rheumatol* 1991; 18: 247-251.
- Walz A**, Baggiolini M: Generation of the neutrophil-activating peptide NAP-2 from platelet basic protein or connective tissue-activating peptide III through monocyte proteases. *J Exp Med* 1990; 171: 449-454.
- Wang HS**, Cao HJ, Winn VD, Rezanka LJ, Frobert Y, Evans CH, Sciaky D, Young DA, Smith TJ: Leukoregulin induction of prostaglandin-endoperoxide H synthase-2 in human orbital fibroblasts. An in vitro model for connective tissue inflammation. *J Biol Chem* 1996; 271: 22718-22728.
- Ward SG**, Bacon K, Westwick J: Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity* 1998; 9: 1-11.
- Weih F**, Carrasco D, Durham SK, Barton DS, Rizzo CA, Ryseck RP, Lira SA, Bravo R: Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell* 1995; 80: 331-340.
- Westwick JK**, Brenner DA: Methods for analyzing c-Jun kinase. *Methods Enzymol* 1995; 255: 342-359.
- White B**: Pathogenesis: Immune aspects. En: Clements PJ, Furst DE, eds. Systemic Sclerosis. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996: 229-250.
- Williams SR**, Jiang Y, Cochran D, Dorsam G, Graves DT: Regulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 in normal human osteoblastic cells. *Am J Physiol* 1992; 263: C194-9.
- Xia Y**, Chen S, Wang Y, Mackman N, Ku G, Lo D, Feng L: RelB modulation of IkappaBalpha stability as a mechanism of transcription suppression of interleukin-1alpha (IL-1alpha), IL-1beta, and tumor necrosis factor alpha in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7688-7696.
- Xia Y**, Pauza ME, Feng L, Lo D: RelB regulation of chemokine expression modulates local inflammation. *Am J Pathol* 1997; 151: 375-387.
- Xu Y**, Rojkind M, Czaja MJ: Regulation of monocyte chemoattractant protein 1 by cytokines and oxygen free radicals in rat hepatic fat-storing cells. *Gastroenterology* 1996; 110: 1870-7.
- Yamakage A**, Kikuchi K, Smith EA, Leroy EC, Trojanowska M: Selective upregulation of platelet-derived growth factor alpha receptors by transforming growth factor beta in scleroderma fibroblasts. *J Exp Med* 1992; 175: 1227-1234.
- Yang L**, Cohn L, Zhang DH, Homer R, Ray A, Ray P: Essential role of nuclear factor kappaB in the induction of eosinophilia in allergic airway inflammation. *J Exp Med* 1998; 188: 1739-1750.
- Yoshie O**, Imai T, Nomiyama H: Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. *J Leukoc Biol* 1997; 62: 634-644.
- Yoshimura T**, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Kuratsu J, Leonard EJ: Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J Exp Med* 1989; 169: 1449-1459.
- Yu X**, Barnhill RL, Graves DT: Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in delayed type hypersensitivity reactions in the skin. *Lab Invest* 1994; 71: 226-235.

Yu X, Druz S, Graves DT, Zhang L, Antoniades HN, Hollander W, Prusty S, Valente AJ, Schwartz CJ, Sonenshein GE: Elevated expression of monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 6953-6957.

Zachariae CO, Thestrup-Pedersen K, Matsushima K: Expression and secretion of leukocyte chemotactic cytokines by normal human melanocytes and melanoma cells. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 593-599.

