

PROTOCOLO CINVA- IRE-585-12

**“DETERMINACIÓN DEL MECANISMO Y POSOLOGÍA
DEL MATRIKEL EN UN MODELO DE CIA”**

INVESTIGADOR: DRA. GUADALUPE JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA

DEPARTAMENTO: INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA

Research Article

Polymerized-Type I Collagen Induces Upregulation of Foxp3-Expressing CD4 Regulatory T Cells and Downregulation of IL-17-Producing CD4⁺ T Cells (Th17) Cells in Collagen-Induced Arthritis

Janette Furuzawa-Carballeda,¹ Perla Macip-Rodríguez,¹ Angeles S. Galindo-Feria,¹ David Cruz-Robles,² Virginia Soto-Abraham,² Sergio Escobar-Hernández,² Diana Aguilar,³ Deshiré Alpizar-Rodríguez,¹ Karen Férrez-Blando,¹ and Luis Llorente¹

¹ Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, Colonia Sección XVI, Tlalpan, 14000 Mexico City, DF, Mexico

² Department of Pathology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano No. 1, Colonia Sección XVI, Tlalpan, 14080 Mexico City, DF, Mexico

³ Department of Experimental Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, Colonia Sección XVI, Tlalpan, 14000 Mexico City, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Janette Furuzawa-Carballeda, jfuruzawa@gmail.com

Received 13 June 2011; Revised 22 July 2011; Accepted 23 July 2011

Academic Editor: Zoltan Szekanecz

Copyright © 2012 Janette Furuzawa-Carballeda et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Previous studies showed that polymerized-type I collagen (polymerized collagen) exhibits potent immunoregulatory properties. This work evaluated the effect of intramuscular administration of polymerized collagen in early and established collagen-induced arthritis (CIA) in mice and analyzed changes in Th subsets following therapy. Incidence of CIA was of 100% in mice challenged with type II collagen. Clinimorphometric analysis showed a downregulation of inflammation after administration of all treatments ($P < 0.05$). Histological analysis showed that the CIA-mice group had extensive bone erosion, pannus and severe focal inflammatory infiltrates. In contrast, there was a remarkable reduction in the severity of arthritis in mice under polymerized collagen, methotrexate or methotrexate/polymerized collagen treatment. Polymerized Collagen but not methotrexate induced tissue joint regeneration. Polymerized Collagen and methotrexate/polymerized collagen but not methotrexate alone induces downregulation of CD4⁺/IL17A⁺ T cells and upregulation of Tregs and CD4⁺/IFN- γ ⁺ T cells. Thus, Polymerized Collagen could be an effective therapeutic agent in early and established rheumatoid arthritis by exerting downregulation of autoimmune inflammation.

1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a common systemic disorder characterized by autoimmunity and chronic inflammation of multiple joints. Collagen-induced arthritis (CIA) is a well-established animal model of RA [1]. CIA is induced in genetically susceptible strains of mice by immunization with type II bovine collagen (CII). Although the effector mechanisms of inflammation ultimately result in pathogenic lesions of joints (inflammatory component of CIA), there is

considerable evidence implicating CII-specific CD4⁺ T cells as primary mediators of disease induction (T-cell immunity component of CIA) [2, 3]. After antigenic stimulation naive CD4⁺ T cells develop into different types of helper T cells, each produces its own set of cytokines that mediate different responses in CIA. It has been well documented that Th1 cells produce interferon (IFN)- γ and interleukin (IL)-2 and have been considered to be the major mediator of the disease [4, 5]. However, the notion that CIA is a Th1-mediated disorder has been challenged by studies using

Th1-defective mice [6]. Mice lacking IFN- γ , IFN- γ receptor, or IL-12p35 develop accelerated arthritis after induction of CIA [7, 8]. Furthermore, recent studies have suggested that highly proinflammatory IL-17-producing Th17 cells, rather than Th1 cells, are central to the pathology of autoimmune arthritis [9, 10]. IL-17-producing CD4⁺ T cells contribute to severe synovitis, pannus formation, joint destruction in arthritis joints and autoimmune inflammation [6]. On the other hand, there is ample evidence that CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cells also play a critical role on the inhibition of autoimmune reaction. Thus, a reciprocal relationship between the differentiation of Th17 and Treg cells has been reported [11]. Hence, therapeutic strategies of RA should consider the regulation of Th17 and Treg differentiation as well as the inhibition of proinflammatory cells and Th1 cytokines.

In order to shift the cytokine balance to anti-inflammatory cytokines in RA and to delete hyperactive proinflammatory Th17 and Th1 cells that closely associate with etiology of RA, it is of utmost importance to discover novel biological substances that can selectively suppress the function or downregulate activated Th1 and Th17 cells, whilst at the same time enhance Treg cell function.

This study focuses on the effect of polymerized-type I collagen on Th subsets and its primary mechanism of action in early and established CIA in mice. Polymerized Collagen is a γ -irradiated mixture of atelopeptidic porcine type I collagen and polyvinylpyrrolidone, which has immunomodulatory properties [12–14]. One percent Polymerized Collagen addition to synovial tissue cultures from non-RA and RA cultures does not induce any change in DNA concentration or metabolism. However, the addition of the biodrug to RA synovial tissue cultures modifies the histological and biochemical pattern of fibrosis, without changing the total collagen content. Polymerized Collagen induces the recovery of type III collagen at similar levels to those detected in normal synovial tissue. The biodrug diminishes the accumulation of dense and tightly packed type I collagen fibers and contributes to establish similar tissue architecture to that observed in normal synovium. Polymerized Collagen induces a decrease of collagenolytic activity, mainly calcium-independent collagenase activity (cathepsins) and the increase of TIMP-1, as well as type III collagen production. The chronic inflammatory process is altered by Polymerized Collagen action, presumably due to the downregulation of IL-1 β and TNF- α , ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1, and Cox-1 [15, 16].

Subcutaneous or intramuscular administration of Polymerized Collagen in combination with methotrexate to RA patients was safe and well tolerated in the treatment of this pathology [17]. The biodrug induced a statistically significant clinical improvement in basal versus 3- or 6-month treatment [18]. Besides, intramuscular administration diminished C-reactive protein (CRP) and rheumatoid factor (RF) levels, and patients required lower doses of methotrexate versus placebo. Thirty percent achieved remission. No differences in serological or hematological variables were found. Adverse events were not detected, except pain lasting <5 min at the injection site [18].

In this study, we show that Polymerized Collagen suppresses the development of CIA by enhancing a proportion of Treg cells while simultaneously diminishing Th17 cells suggesting that Polymerized Collagen ameliorates autoimmune arthritis through the regulation of both Treg/Th17 differentiation and Th1/Th2 balance.

2. Materials and Methods

2.1. Mice. Male DBA1/J mice (7–8 weeks old, 20–22 g) were obtained from Harlan S.A. de C.V. (Mexico City, Mexico). Mice were kept under specific pathogen-free conditions. All animals were set aside under standard conditions in a 12 h day/night rhythm with access to food and water *ad libitum*. All animal procedures and experiments were carried according to international guidelines (ICLAS-WHO) and national law (NOM 062-ZOO-1999). The protocol of this study was approved by the Animal Care and Research Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

2.2. Induction of CIA. Arthritis was induced according to methods as described previously [1]. Chicken CII (SIGMA-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) was dissolved in 0.05 M acetic acid to a concentration of 2 mg/mL at 4°C, and emulsified with an equal volume of complete Freund's adjuvant (SIGMA-Aldrich Co.) Male mice were injected intradermally at the base of the tail with 0.1 mL of emulsion containing 100 μ g of chicken CII. Twenty-one days after the primary immunization, mice were boosted with 0.1 mL of the mixture of 2 mg/mL chicken CII and incomplete Freund's adjuvant (SIGMA-Aldrich Co.) via the same route. In each experiment, a control group mice were injected with citric/citrate buffer alone.

2.3. Evaluation of Arthritis Severity in Mice with CIA. The severity of arthritis was measured by scoring each limb from 0 to 4 grades and by summing up the scores of four limbs: 0 = normal; 1 = erythema or swelling of one or several digits; 2 = erythema and moderate swelling extending from the ankle to the mid-foot (tarsals); 3 = erythema and severe swelling extending from the ankle to the metatarsal joints; 4 = complete erythema and swelling encompassing the ankle, foot, and digits, resulting in deformity and/or ankylosis. The maximum score for each animal is thus 16 [3]. Paw edema in each animal was measured with a vernier (Mitutoyo America Co.). All the evaluations were made by the same observer.

2.4. Disease Models

2.4.1. Toxicity. Sixteen mice ($n = 4$ per group) without arthritis were treated by intramuscular administration once weekly during six weeks with 100 μ L of (a) placebo (citric/citrate buffer), (b) polymerized-type I collagen (0.17 mg of collagen), (c) Methotrexate (2.5 mg/kg) [19], or (d) methotrexate (2.5 mg/kg)/Polymerized-type I collagen

(0.17 mg of collagen). Two mice of each group were sacrificed at the 6th and 13th weeks.

2.4.2. Early Arthritis. Forty-eight male mice ($n = 12$ per group) were injected with emulsion of chicken CII. Twenty one days after the primary immunization, mice were boosted. At the same time, mice were treated with 100 μ L of (a) placebo (citric/citrate buffer), (b) Polymerized-Type I Collagen, (c) methotrexate (2.5 mg/kg) or (d) methotrexate/Polymerized-Type I Collagen. Six mice of each group were sacrificed at the 6th and 13th weeks.

2.4.3. Established Arthritis. Forty eight male mice ($n = 12$ per group) were injected with emulsion of chicken CII. Twenty one days after the primary immunization, mice were boosted. One week later, mice were treated with 100 μ L of (a) placebo (citric/citrate buffer), (b) Polymerized-Type I Collagen, (c) methotrexate, or (d) Methotrexate/Polymerized-Type I Collagen. Six mice of each group were sacrificed at the 8th and 13th weeks.

2.5. Drug Treatment. One hundred μ L of (a) placebo (citric/citrate buffer), (b) Polymerized-Type I Collagen, (c) methotrexate (2.5 mg/kg), or (d) methotrexate/polymerized-type I collagen was intramuscularly administered once weekly during six weeks.

2.6. Histological Analysis. On day 35 and day 98, the mice were killed in a carbon dioxide chamber, and the hind paws were collected, fixed with 10% buffered formalin, and then decalcified in 5% formic acid and embedded in paraffin. Sections (5 μ m) of whole hind paws were stained with hematoxylin and eosin and PAS technique. Histopathological changes were scored by a blinded observer using the previously reported parameters: 0 = normal joint structure; 1 = mild changes, synovitis and pannus front with view discrete cartilage focal erosions; 2 = moderate changes, accompanying loss of large areas of cartilage, eroding pannus front and synovial hyperplasia with infiltrating mononuclear cells and polymorphonuclear cells; 3 = severe synovitis, cartilage, and bone erosion; 4 = total destruction of joint architecture [20].

2.7. Cell Preparations and Flow Cytometric Analysis. Spleens were isolated from mice. Splenocytes were stained with 5 μ L of anti-CD4-FITC-labelled monoclonal antibody (BD Biosciences, San Jose, Calif, USA) at room temperature in the dark for 20 min. After two washes, cells were permeabilized with 200 μ L of cytofix/cytoperm solution (BD Biosciences) at 4°C for 20 min. After two washes with permwash solution (BD Biosciences), cells were stained for intracellular cytokines and transcription factors with 5 μ L of anti-IL-17A-PE-labelled, anti-IFN- γ -PE-labeled anti-IL-4-PE-labelled, and PE-labelled anti-Foxp3 for Tregs (BD Biosciences), for 30 min at 4°C in the dark. Finally, after washing with permwash solution, splenocytes were analyzed by flow cytometry with a FACScan (BD Biosciences). A total of 10000 events were recorded for each sample and analyzed with the

CellQuest software (BD Biosciences). Results are expressed as the relative percentage of IL-17A, IFN- γ , IL-4, or Foxp3-expressing cells in each gate. In order to avoid false positive PE results and also for setting compensation for multi-color flow cytometric analysis, we performed instrument calibration/standardization procedures each day according to established protocols of our laboratory. Briefly, we run an unstained (autofluorescence control) and permeabilized PBMCs sample. Autofluorescence control (unstained cells) was compared with single-stained cell-positive controls to confirm that the stained cells were on scale for each parameter. Besides, BD Calibrite 3 beads were used to adjust instrument settings, set fluorescence compensation, and check instrument sensitivity (BD CaliBRITE, BD Biosciences).

2.8. NF κ B/I κ B α Flow Cytometric Analysis. Splenocytes were permeabilized with 200 μ L of cytofix/cytoperm solution (BD Biosciences) at 4°C for 20 min. After two washes with permwash solution (BD Biosciences), cells were stained for intracellular transcription factors with 5 μ L of anti-NF κ Bp65-FITC-labelled monoclonal antibody (Santa Cruz, Calif, USA) and 5 μ L of anti-I κ B α PE-labeled monoclonal antibody (I κ B α binds to the p65 subunit of p50-p65 heterocomplex through ankyrin repeats) (Santa Cruz), for 30 min at 4°C in the dark. After washing with permwash solution, splenocytes were analyzed by flow cytometry with a FACScan (BD Biosciences). A total of 10000 events were recorded for each sample and analyzed with the CellQuest software (BD Biosciences). Results are expressed as the relative percentage of NF κ Bp65⁺/I κ B α ⁺ cells in each gate.

2.9. Statistical Analysis. Statistical analysis was performed using the SigmaStat11 program by one way analysis of variance on Ranks and by Holm-Sidak method for all pairwise multiple comparison procedures. Data were expressed as the mean \pm SEM. The *P*-values smaller than or equal to 0.05 were considered as significant.

3. Results

3.1. Effect of Polymerized-Type I Collagen on Toxicity Model. Treatments evaluated in this study have no *in vivo* toxicity for mice. It was evaluated by macroscopical and histopathological analysis of kidneys, heart, lungs, spleen, lymph nodes, and hind paws. All tissues resembled normal architecture. No inflammatory infiltrates or other abnormalities were observed (*data not shown*).

3.2. Effect of Polymerized-Type I Collagen on Attenuation of Early and Established Arthritis Model. To investigate the effect of polymerized-type I collagen in the progression of CIA, intramuscular administration of biodrug was initiated one week before booster of CII. The dose selected was based on our previous *in vitro* and *in vivo* results [16, 17]. Typically, DBA1/J mice developed signs of arthritis after the second immunization given at 21 day after the first CII immunization and showed maximum arthritis

around day 35–42 (Figure 1). Mice of early arthritis model treated with polymerized-type I collagen showed significant reductions in the severity of CIA compared with placebo (Figures 1(a) and 1(b)). On day 8–16, arthritis score and paw thickness reached their peaks. Polymerized Collagen and methotrexate/Polymerized Collagen treatments more than methotrexate alone significantly suppressed arthritis severity scores. A similar pattern of response was observed on established arthritis model (Figures 1(c) and 1(d)). Paw thickness was normal in early and established CIA models in groups treated with Polymerized Collagen and methotrexate/Polymerized Collagen (Figures 1(a) and 1(c)). However, methotrexate treatment does not diminish edema and induces fever ($\Delta \approx 1.5^\circ\text{C}$).

3.3. Histopathological Analysis of the Polymerized-Type I Collagen Effect on Early and Established Arthritis Model. Histopathological analysis was performed on hind paws of CIA mice harvested on day 35 and 98 after booster immunization by two blinded investigators. Representative images of hematoxylin and eosin-stained and PAS-stained joint tissue sections from the groups treated with placebo, Polymerized-Type I Collagen, methotrexate, and methotrexate/polymerized-type I collagen are presented in Figure 2. Mice showed typical arthritis, which is characterized by extensive infiltration of inflammatory cells, synovial hyperplasia, and bone erosion. Treatment with polymerized-type I collagen showed no signs of inflammation. Whereas methotrexate/polymerized-type I collagen resulted in significant reduction in cellular infiltration, pannus formation, and destruction of cartilage and bone in arthritic joints with a low pathogenic score of CIA mice in both models. Methotrexate induced other tissue abnormalities such as the presence of nodules (amorphous fibrin tissue like) and a low quality wound repair tissue as well as inflammatory infiltrates. The effect of polymerized-type I collagen and methotrexate/polymerized-type I collagen was sustained until the second sacrifice. Thus, histological evaluations confirmed the characteristic arthritic lesions and showed an excellent correlation with clinical grading (Figure 2).

3.4. Polymerized-Type I Collagen Modulates Th Spleen Cell Population on Early and Established CIA Model. To investigate Th cytokine patterns, mice were sacrificed by a blinded researcher at two different periods after booster immunization, on day 35 and 98. One control mice group without CIA was included. Cell suspensions from spleens were obtained and analyzed for *ex vivo* cytokine production by intracellular staining using flow cytometry (Figure 3).

Proportions of Th17 were consistently $\sim 0.7\%$ in splenocytes from mice without CIA. Higher percentage of IL-17-producing CD4^+ T cells were determined in CIA mice in early arthritis (2.5% and 4.3%, for the first and second sacrifice, resp. Figures 4(a) and 4(b)) and established arthritis (2.4% and 3.6%, for the first and second sacrifice, resp. Figures 4(c) and 4(d)). A reduction on percentage of IL-17A-producing CD4^+ T cells similar to normal levels was determined in mice with early and established arthritis

treated with polymerized-type I collagen (1.2% and 1.3% for the first and second sacrifice in early arthritis, Figures 4(a) and 4(b) and 0.5% and 1.3% for the first and second sacrifice in established arthritis Figures 4(c) and 4(d)) and methotrexate/Polymerized Type I Collagen (0.8% and 1.4% for the first and second sacrifice in early arthritis, Figures 4(a) and 4(b) and 0.7% and 1.3% for the first and second sacrifice in established arthritis Figures 4(c) and 4(d)). Methotrexate treatment was not so effective compared to the biodrug and the mixture of it with methotrexate (1.4% and 2.2% for the first and second sacrifice in early arthritis, Figures 4(a) and 4(b) and 1.2% and 1.1% for the first and second sacrifice in established arthritis Figures 4(c) and 4(d)). Polymerized-Type I Collagen and methotrexate/Polymerized Collagen treatments had a sustained effect in early and established arthritis model until the second sacrifice (follow up) on the percentage of IL-17A-producing CD4^+ T (Figures 4(b) and 4(d)). IFN- γ -producing Th1 cells were also induced by CII *in vivo* immunization, and their frequency was similar than that of Th17 in early and established arthritis. However, IFN- γ producing Th1 cells were lower after treatment in established arthritis model (Figures 4(c) and 4(d)).

Proportions of Treg cells were consistently $\sim 3.0\%$ in splenocytes from mice without CIA. Lower percentage of Treg cells were determined in CIA mice in early arthritis (2.2% and 1.6%, for the first and second sacrifice, resp. Figures 4(a) and 4(b)) and established arthritis (1.5% and 1.2%, for the first and second sacrifice, respectively, Figures 4(c) and 4(d)). A statistically significant increase on percentage of Treg cells was determined in mice with early and established arthritis treated with polymerized-type I collagen (4.5% and 3.5% for the first and second sacrifice in early arthritis, Figures 4(a) and 4(b) and 2.4% and 2.5% for the first and second sacrifice in established arthritis Figures 4(c) and 4(d)) and methotrexate/Polymerized Collagen (4.4% and 3.0% for the first and second sacrifice in early arthritis, Figures 4(a) and 4(b) and 2.4% and 1.7% for the first and second sacrifice in established arthritis Figures 4(c) and 4(d)). Methotrexate-treated mice had a slightly increased response on percentage of Treg cells (2.0% and 1.6% for the first and second sacrifice in early arthritis, Figures 4(a) and 4(b) and 1.2% and 1.8% for the first and second sacrifice in established arthritis Figures 4(c) and 4(d)). However, this subpopulation was reduced in 50% compared to mice without CIA.

Taken together, these results indicate that polymerized-type I collagen is a biological compound that downregulated Th17 and upregulated Treg cell differentiation *in vivo* on early and established arthritis.

3.5. Effect of Polymerized-Type I Collagen on NF- κ B on Early and Established CIA Model. We infer that polymerized-type I collagen mechanism of action might be mediated through the regulation of certain transcription factors such as NF- κ B and AP-1. In particular, NF- κ B regulates the expression of proinflammatory enzymes, cytokines, chemokines, immunoreceptors, and cell adhesion molecules as well as apoptosis. In the light of this knowledge, NF- κ Bp65 and I κ B α were analyzed in splenocytes *ex vivo* (Figure 5). Percentage

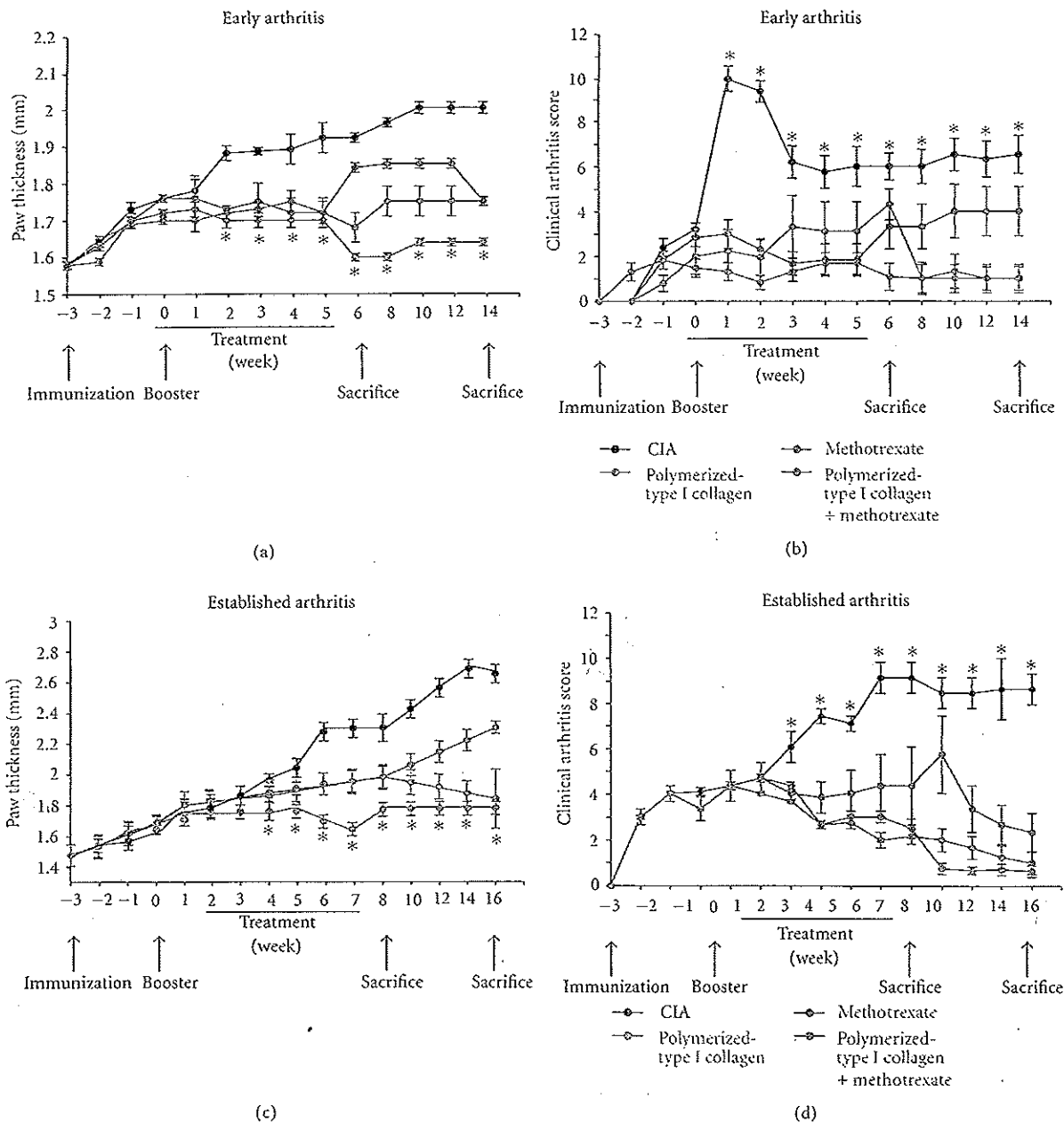


FIGURE 1: Preventive and therapeutic effects of polymerized-type I collagen on mouse CIA. (a) Paw thickness in early arthritis model. One hundred microliters of Polymerized Collagen, 100 μ L of Polymerized Collagen, and 100 μ L of methotrexate (2.5 mg/kg) or 100 μ L of methotrexate (2.5 mg/kg)/Polymerized Collagen were administered intramuscularly once a week during 6 weeks at the same time of that of the booster. Citric/citrate buffer was injected as a vehicle control. Data represent mean \pm SEM (each group, $n = 6$). (b) Clinical arthritis score in early arthritis model ($n = 6$). (c) Paw thickness in established arthritis model. One hundred microliters of Polymerized Collagen, 100 μ L of Polymerized Collagen, and 100 μ L of methotrexate (2.5 mg/kg) or 100 μ L of methotrexate (2.5 mg/kg)/Polymerized Collagen were administered intramuscularly once a week during 6 weeks. Treatments were started on 14 days after the booster. Citric/citrate buffer was injected as a vehicle control. Data represent mean \pm SEM (each group, $n = 6$). (d) Clinical arthritis score in established arthritis model ($n = 6$). * $P < 0.05$.

of NF- κ Bp65 (~1.5%), I κ B α (~1.1%), and NF- κ B/I κ B α cells (~2.2%) were consistently found in splenocytes from mice without CIA.

Higher percentage of I κ B α ⁺ and NF- κ B⁺/I κ B α ⁺ cells were found in CIA mice under polymerized-type I collagen and

methotrexate/polymerized-type I collagen treatment in early arthritis in the first and second sacrifice compared with CIA mice without treatment (Figures 5(a) and 5(b)). Interestingly, normal levels of NF- κ Bp65 were observed in CIA mice under Polymerized Collagen and methotrexate/Polymerized

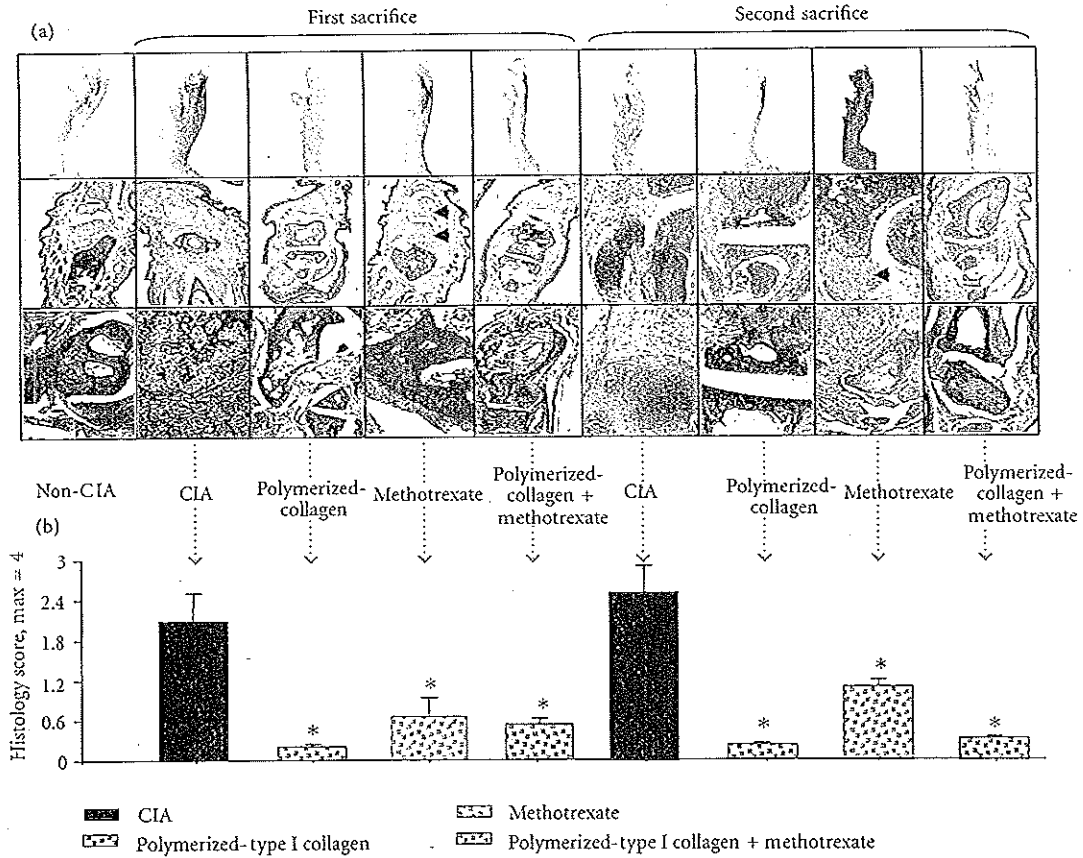


FIGURE 2: Preventive effect of polymerized-type I collagen on the histological damage in CIA mice. (a) Representative section of joint histopathology is shown. Upper panel: hematoxylin and eosin stained and lower panel: PAS stained; magnification: 10x. Arrow heads point out nodules. (b) Pathology scores of each group were calculated and expressed as mean \pm SEM ($n = 6$). * $P < 0.05$.

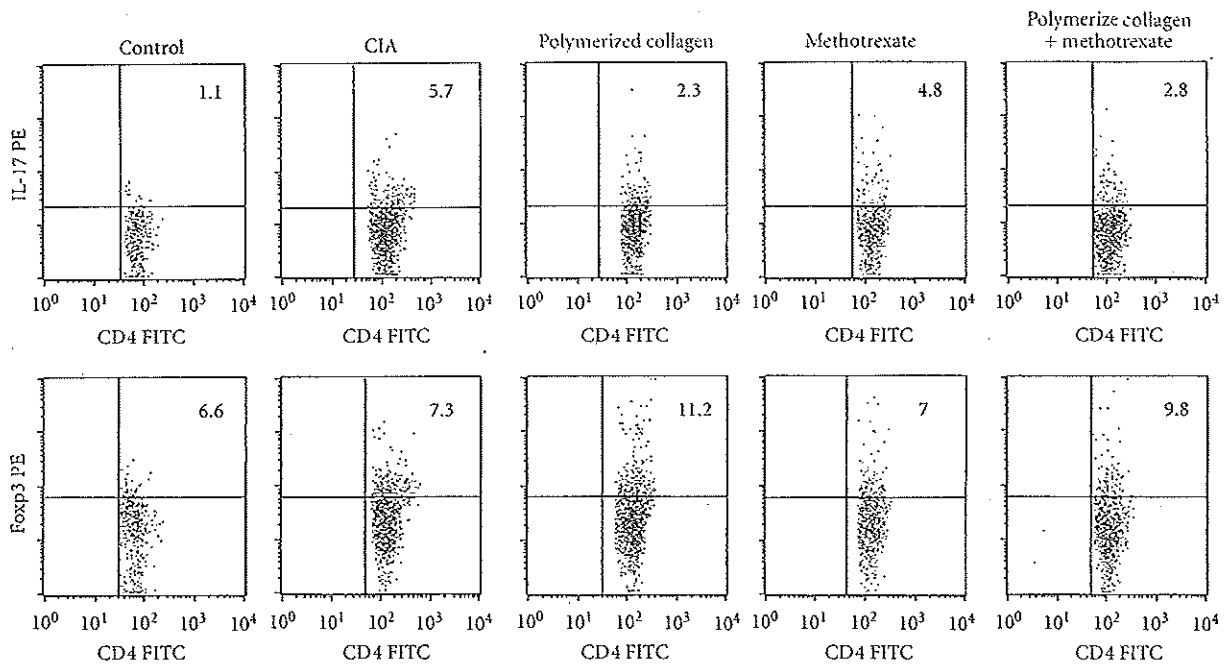


FIGURE 3: Representative flow plots of IL-17A- and Foxp3-expressing CD4⁺ T cells.

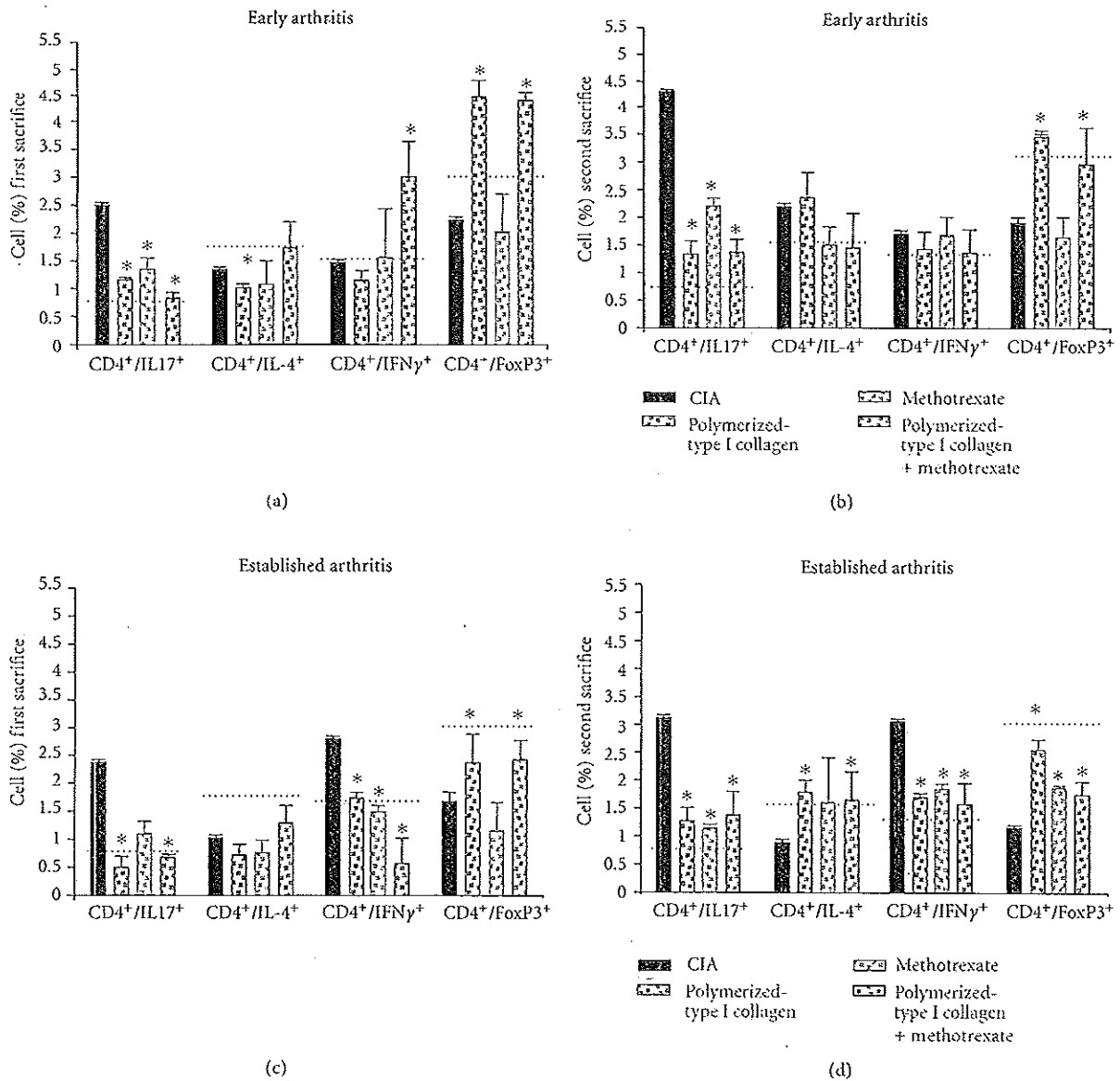


FIGURE 4: Effect of polymerized-type I collagen on the *ex vivo* intracellular cytokine production and on CD4⁺ T cell subsets regulation in splenocytes. (a) Splenic cells obtained immediately *ex vivo* in early arthritis model on day 35 after booster immunization. (b) Splenocytes obtained immediately *ex vivo* in early arthritis model on day 98 after booster immunization. (c) Splenic cells obtained immediately *ex vivo* in established arthritis model during first sacrifice. (d) Splenocytes obtained from established arthritis model during second sacrifice. Intracellular production of IL-17A, IL-4, IFN- γ , and Foxp3 by CD4⁺ T cells was detected by flow cytometry. Results are representative of 6 mice analyzed in each group. Horizontal dotted line represents mean normal values, obtained from mice ($n = 3$) without CIA. Data represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

Collagen treatment in early arthritis during second sacrifice (Figure 5(b)). In established arthritis model, normal percentages of NF- κ Bp65 were found in mice under Polymerized Collagen, methotrexate, or methotrexate/Polymerized Collagen treatment in the first and second sacrifice (Figures 5(c) and 5(d)), as well as, I κ B α levels during second sacrifice (Figure 5(d)). Finally, NF- κ B⁺/I κ B α ⁺ cells were increased in treated mice compared with CIA mice in the first and second sacrifice (Figures 5(c) and 5(d)).

4. Discussion

In the present work, we demonstrated that polymerized-type I collagen as monotherapy as well as in combination with methotrexate exhibits both preventive and therapeutic effects on mouse CIA, through downregulation of Th17 subset and upregulation of Treg cells.

Th17 cells represent a new subset of T helper cells, which mainly produce IL-17A and IL-17E, and, to a lesser extent,

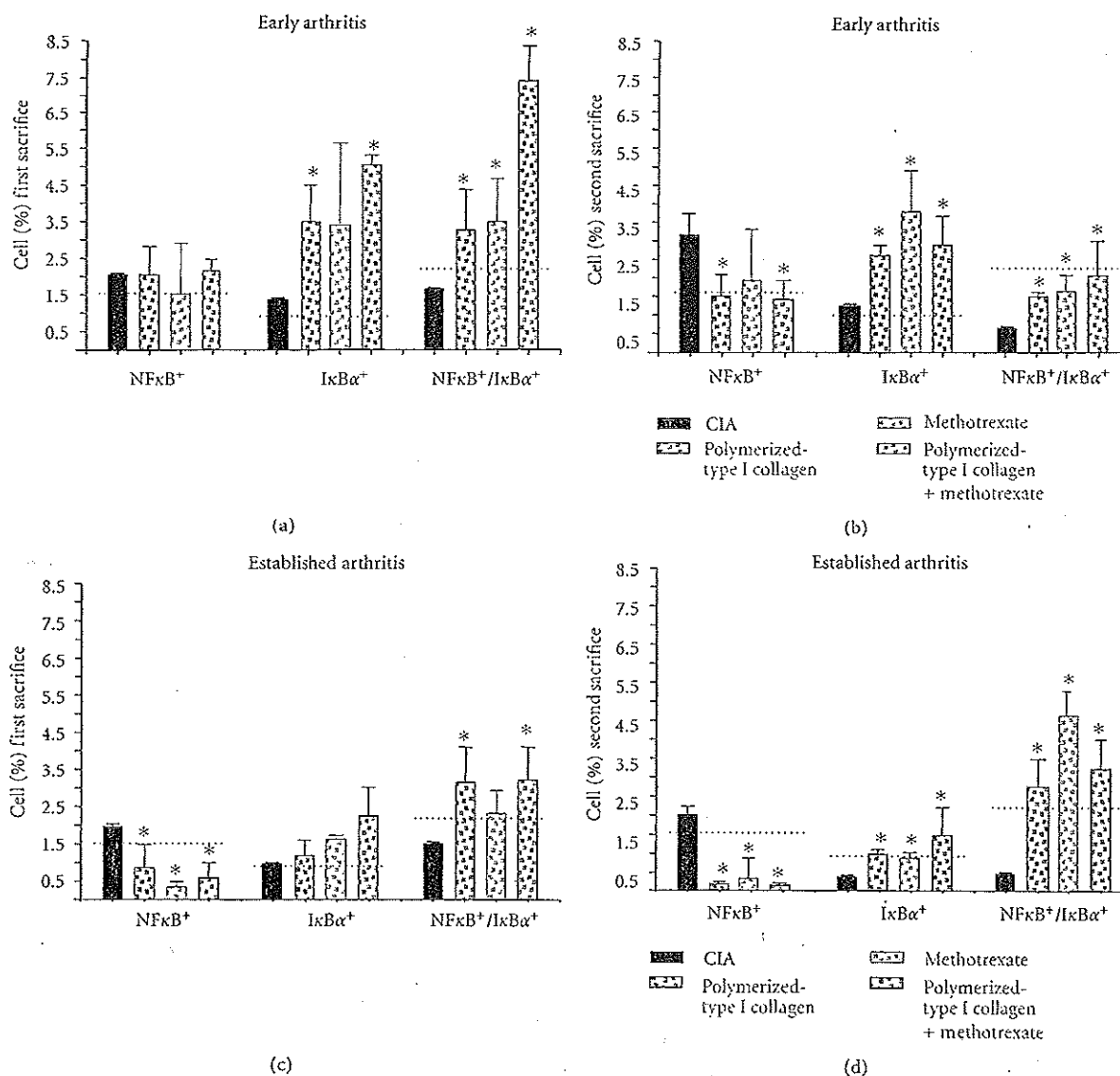


FIGURE 5: Effect of polymerized-type I collagen on the *ex vivo* NF- κ B and I κ B- α in splenocytes. (a) Spleen cells obtained immediately *ex vivo* in early arthritis model on day 35 after booster immunization. (b) Splenocytes obtained immediately *ex vivo* in early arthritis model on day 98 after booster immunization. (c) Spleen cells obtained immediately *ex vivo* in established arthritis model during first sacrifice. (d) Splenocytes obtained from established arthritis model during second sacrifice. Intracellular levels of NF- κ Bp65 and I κ B α cells were detected by flow cytometry. Results are representative of 6 mice analyzed in each group. Horizontal dotted line represent mean normal values, obtained from mice ($n = 3$) without CIA. Data represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

TNF- α and chemokines. The first report on IL-17-producing CD4⁺ T cells came from a study of *in vitro*-primed TCR transgenic T cells where the addition of *Borrelia burgdorferi* lysate induced IL-17 production [21].

However, in the last years, the outstanding importance of Th17 cells has most convincingly been demonstrated in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. This was in fact, a broken paradigm, as previously Th1 cells had been regarded as the preponderant cell subpopulation driving autoimmune tissue damage. This concept was challenged when it became clear that IFN- γ and IFN- γ -receptor deficient mice were not protected from CIA but

developed more severe disease [22–26]. Moreover, IL-17-deficient mice or mice treated with anti-IL-17 antibody reduce joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion [27–29]. Collectively, these data corroborate the importance of Th17 cells for the induction of autoimmune tissue inflammation.

Our results are in agreement with the subcutaneous, intramuscular or mucosal administration of type II collagen or altered CII263–272 peptide that suppress Th17 cells and expand regulatory T cells in the early stage of the disease [30–33]. However, the mechanism of action could be quite different meanwhile altered CII263–272 peptides

could bind to RA-associated HLA-DR4/1 with no T cell stimulating effects and might inhibit T cell activation in RA, polymerized-type I collagen could be acting likely as a tolerogenic molecule.

Methotrexate therapy is associated with depletion of all CD4⁺ T cell subsets, including Tregs, and also with the development of rheumatoid nodules following improvement of arthritis, as has been reported in previous studies [34–36].

Methotrexate/polymerized-type I collagen induced effective downregulation of inflammatory T cell subsets although, unexpectedly, there was no synergistic effect between both treatments.

On the other hand, it is well known that impaired Treg function is also associated with pathogenesis of autoimmune disease, and that CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ cells represent one of the major Treg cells involved in susceptibility/resistance to autoimmunity [37]. In the present experiments, we found that the percentage of Treg cells in the spleen of CIA mouse was significantly upregulated by Polymerized Collagen and methotrexate/polymerized-type I collagen treatments but not by methotrexate alone. These results support the hypothesis that the reciprocal downregulation of IL-17 expression at the time of upregulation of Foxp3 induced by Polymerized Collagen is involved in the balance of Treg/Th17, and this can lead to prevention or full blown autoimmune arthritis.

It is important to note that, 28 days after the last polymerized-type I collagen or methotrexate/polymerized-type I collagen administration, mice were without any sign of disease. Besides, side effects were not determined in mice under Polymerized-Type I Collagen, albeit methotrexate induced other tissue abnormalities such as the presence of nodules (amorphous fibrin tissue like) and hyperthermia ($\Delta \approx 1.5^\circ\text{C}$) determined during all the study, which was also previously described by Lange et al. [19].

Furthermore, animals treated with Polymerized Collagen in the early and established CIA model not only remained without clinical manifestations of the disease and without hyperthermia, but their joints were free from inflammatory cell infiltrates. Indeed, histological sections of ankle from polymerized-type I collagen but not methotrexate treatment showed normal joint tissues, without inflammatory infiltration of bone erosions and preservation of proteoglycans content (PAS staining), compared to CIA. Thus, histological evaluations confirmed the characteristic arthritic lesions and showed an excellent correlation with clinical grading.

NF- κ B has been often termed a “central mediator of the immune response,” because of its critical role in the control of key physiological and pathological states, from immune to autoimmune response. Regulation of the so-called “canonical” NF- κ B transcription factor by the IKK complex involves its cytosolic-to-nuclear translocation mediated by the phosphorylation of the inhibitory molecule I κ B- α [38]. Imbalance of NF- κ B and I κ B α has been associated with development of common inflammatory diseases including ulcerative colitis, Crohn’s disease, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, psoriatic arthritis, giant cell arthritis, type 1 diabetes, multiple sclerosis, celiac disease, and Parkinson’s disease, as well as susceptibility of several cancers, such as oral squamous cell carcinoma, colorectal cancer, hepatocellular

carcinoma, breast cancer, and myeloma. In the present work, we found that Polymerized Collagen alone or in combination with methotrexate is capable to increase I κ B- α inhibitor in early and established arthritis models. Thus, it is not preposterous to speculate that, this biodrug could contribute considerably to the downmodulation of inflammation and tissue regeneration effects observed.

Summing up, polymerized-type I collagen may be one of the novel therapeutic candidates that can suppress autoimmune inflammation by regulating the T cell differentiation and the balance of pathogenic and regulatory T cells, in such a way that proinflammatory Th17 cells are downregulated and Treg cells are expanded. Besides, Polymerized Collagen induces downregulation of proinflammatory cytokine expression and tissue regeneration that could be regulated probably through NF- κ B modulation. Our results shed further light into the preponderant role of polymerized-type I collagen in downregulation of inflammation and tissue regeneration and certainly deserve to be studied in depth in order to determine the precise mechanism(s) of action.

Acknowledgment

This work was supported by a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico (CONACyT SALUD S0008-2009-1).

References

- [1] D. D. Brand, K. A. Latham, and E. Rosloniec, “Collagen-induced arthritis,” *Nature Protocols*, vol. 2, no. 5, pp. 1269–1275, 2007.
- [2] D. D. Brand, A. H. Kang, and E. F. Rosloniec, “Immunopathogenesis of collagen arthritis,” *Springer Seminars in Immunopathology*, vol. 25, no. 1, pp. 3–18, 2003.
- [3] D. D. Brand, A. H. Kang, and E. F. Rosloniec, “The mouse model of collagen-induced arthritis,” *Methods in molecular medicine*, vol. 102, pp. 295–312, 2004.
- [4] C. Mauri, R. O. Williams, M. Walmsley, and M. Feldmann, “Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and the arthritogenic response in collagen-induced arthritis,” *European Journal of Immunology*, vol. 26, no. 7, pp. 1511–1518, 1996.
- [5] A. Doncarli, L. M. Stasiuk, C. Fournier, and O. Abehsira-Amar, “Conversion *in vivo* from an early dominant Th0/Th1 response to a Th2 phenotype during the development of collagen-induced arthritis,” *European Journal of Immunology*, vol. 27, no. 6, pp. 1451–1460, 1997.
- [6] C. T. Weaver, R. D. Hatton, P. R. Mangan, and L. E. Harrington, “IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages,” *Annual Review of Immunology*, vol. 25, pp. 821–852, 2007.
- [7] I. B. McInnes and G. Schett, “Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 7, no. 6, pp. 429–442, 2007.
- [8] J. Furuzawa-Carballeda, M. I. Vargas-Rojas, and A. R. Cabral, “Autoimmune inflammation from the Th17 perspective,” *Autoimmunity Reviews*, vol. 6, no. 3, pp. 169–175, 2007.
- [9] E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo, “Th-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity,” *Nature Immunology*, vol. 8, no. 4, pp. 345–350, 2007.

- [10] M. Fujimoto, S. Serada, M. Mihara et al., "Interleukin-6 blockade suppresses autoimmune arthritis in mice by the inhibition of inflammatory Th17 responses," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 58, no. 12, pp. 3710–3719, 2008.
- [11] E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao et al., "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells," *Nature*, vol. 441, no. 7090, pp. 235–238, 2006.
- [12] J. Chimal-Monroy, T. Bravo-Ruiz, F. E. Krötzsch-Gómez, and L. Díaz de León, "Implantes de Fibroquel^{MR} aceleran la formación de hueso nuevo en defectos óseos inducidos experimentalmente en cráneos de rata: un estudio histológico," *Revista Biomédica*, vol. 8, pp. 81–88, 1997.
- [13] F. E. Krötzsch-Gómez, J. Furuzawa-Carballeda, R. Reyes-Márquez, E. Quiróz-Hernández, and L. Díaz de León, "Cytokine expression is downregulated by collagen-polyvinylpyrrolidone in hypertrophic scars," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 111, no. 5, pp. 828–834, 1998.
- [14] J. Furuzawa-Carballeda, F. E. Krötzsch-Gómez, R. Espinosa-Morales, M. Alcalá, and L. Barile-Fabris, "Subcutaneous administration of collagen-polyvinylpyrrolidone down regulates IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1, ELAM-1 and VCAM-1 expression in scleroderma skin lesions," *Clinical and Experimental Dermatology*, vol. 30, no. 1, pp. 83–86, 2005.
- [15] J. Furuzawa-Carballeda, J. Alcocer-Varela, and L. Díaz de León, "Collagen-PVP decreases collagen turnover in synovial tissue cultures from rheumatoid arthritis patients," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 878, pp. 598–603, 1999.
- [16] J. Furuzawa-Carballeda, R. Rodríguez-Calderón, L. Díaz de León, and J. Alcocer-Varela, "Mediators of inflammation are down-regulated while apoptosis is up-regulated in rheumatoid arthritis synovial tissue by polymerized collagen," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 130, no. 1, pp. 140–149, 2002.
- [17] J. Furuzawa-Carballeda, A. R. Cabral, M. Zapata-Zuñiga, and J. Alcocer-Varela, "Subcutaneous administration of polymerized-type I collagen for the treatment of patients with rheumatoid arthritis. An open-label pilot trial," *The Journal of Rheumatology*, vol. 30, no. 2, pp. 256–259, 2003.
- [18] J. Furuzawa-Carballeda, R. Fenutria-Ausmequet, V. Gil-Espinosa et al., "Polymerized-type I collagen for the treatment of patients with rheumatoid arthritis. Effect of intramuscular administration in a double blind placebo-controlled clinical trial," *Clinical and Experimental Rheumatology*, vol. 24, no. 5, pp. 521–528, 2006.
- [19] F. Lange, E. Bajtner, C. Rintisch, K. S. Nandakumar, U. Sack, and R. Holmdahl, "Methotrexate ameliorates T cell dependent autoimmune arthritis and encephalomyelitis but not antibody induced or fibroblast induced arthritis," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 64, no. 4, pp. 599–605, 2005.
- [20] R. Zhou, W. Tang, Y.-X. Ren et al., "(*s*,R)-5-Hydroxytryptolide attenuated collagen-induced arthritis in DBA/1 mice via suppressing interferon- γ production and its related signaling," *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 8, no. 1, pp. 35–44, 2006.
- [21] C. Infante-Duarte, H. F. Horton, M. C. Byrne, and T. Kamradt, "Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells," *The Journal of Immunology*, vol. 165, no. 11, pp. 6107–6115, 2000.
- [22] C.-Q. Chu, D. Swart, D. Alcorn, J. Tocker, and K. B. Elkon, "Interferon- γ regulates susceptibility to collagen-induced arthritis through suppression of interleukin-17," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 56, no. 4, pp. 1145–1151, 2007.
- [23] B. Manoury-Schwartz, G. Chiochia, N. Bessis et al., "High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN- γ receptors," *The Journal of Immunology*, vol. 158, no. 11, pp. 5504–5506, 1997.
- [24] K. Vermeire, H. Heremans, M. Vandeputte, S. Huang, A. Billiau, and P. Matthys, "Accelerated collagen-induced arthritis in IFN- γ receptor-deficient mice," *The Journal of Immunology*, vol. 158, no. 11, pp. 5507–5513, 1997.
- [25] Y. Kageyama, Y. Koide, A. Yoshida et al., "Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in mice deficient in IFN- γ /receptor," *The Journal of Immunology*, vol. 161, no. 3, pp. 1542–1548, 1998.
- [26] E. Bettelli, B. Sullivan, S. J. Szabo, R. A. Sobel, L. H. Glimcher, and V. K. Kuchroo, "Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 200, no. 1, pp. 79–87, 2004.
- [27] S. Nakae, A. Nambu, K. Sudo, and Y. Iwakura, "Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice," *Journal of Immunology*, vol. 171, no. 11, pp. 6173–6177, 2003.
- [28] E. Lubberts, M. I. Koenders, B. Oppers-Walgreen et al., "Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 50, no. 2, pp. 650–659, 2004.
- [29] K. Sato, A. Suematsu, K. Okamoto et al., "Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 203, no. 12, pp. 2673–2682, 2006.
- [30] Z. Q. Yao, R. Li, and Z. G. Li, "A triple altered collagen II peptide with consecutive substitutions of TCR contacting residues inhibits collagen-induced arthritis," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 66, no. 3, pp. 423–424, 2007.
- [31] L. K. Myers, Y. Sakurai, E. F. Rosloniec, J. M. Stuart, and A. H. Kang, "An analog peptide that suppresses collagen-induced arthritis," *American Journal of the Medical Sciences*, vol. 327, no. 4, pp. 212–216, 2004.
- [32] Y. Sakurai, D. D. Brand, B. Tang et al., "Analog peptides of type II collagen can suppress arthritis in HLA-DR4 (DRB1*0401) transgenic mice," *Arthritis Research & Therapy*, vol. 8, no. 5, article R150, 2006.
- [33] J. Zhao, R. Li, J. He, J. Shi, L. Long, and L. Zhanguo, "Mucosal administration of an altered CII263-272 peptide inhibits collagen-induced arthritis by suppression of Th1/Th17 cells and expansion of regulatory T cells," *Rheumatology International*, vol. 29, no. 1, pp. 9–16, 2008.
- [34] R. Segal, D. Caspi, M. Tishler, B. Fishel, and M. Yaron, "Accelerated nodulosis and vasculitis during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 31, no. 9, pp. 1182–1185, 1988.
- [35] P. A. Hessian, J. Highton, A. Kean, Ch. K. Sun, and M. Chin, "Cytokine profile of the rheumatoid nodule suggests that it is a Th1 granuloma," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 48, no. 2, pp. 334–338, 2003.
- [36] I. Matsushita, M. Uzuki, H. Matsuno, E. Sugiyama, and T. Kimura, "Rheumatoid nodulosis during methotrexate therapy in a patient with rheumatoid arthritis," *Modern Rheumatology*, vol. 16, no. 6, pp. 401–403, 2006.
- [37] J. Duarte, A. Agua-Doce, V. G. Oliveira, J. E. Fonseca, and L. Graca, "Modulation of IL-17 and Foxp3 expression in the prevention of autoimmune arthritis in mice," *PLoS one*, vol. 5, no. 5, p. e10558, 2010.

- [38] S. Ghosh and M. S. Hayden, "New regulators of NF- κ B in inflammation," *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 11, pp. 837–848, 2008.

Subcutaneous administration of polymerized type I collagen downregulates interleukin (IL)-17A, IL-22 and transforming growth factor- β 1 expression, and increases Foxp3-expressing cells in localized scleroderma

J. Furuzawa-Carballeda, M. Ortíz-Ávalos,* G. Lima, F. Jurado-Santa Cruz* and L. Llorente

Department of Immunology and Rheumatology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico; and *Department of Collagen and Vascular Diseases, Dermatologic Centre Ladislao de la Pascua, Dr Vértiz 646, Esquina Baja California, Col. Buenos Aires, Mexico City, Mexico

doi:10.1111/j.1365-2230.2012.04385.x

Summary

Background. Localized scleroderma (LS) is a disfiguring inflammatory autoimmune disease of the skin and underlying tissue. As in systemic sclerosis, a key feature is the presence of T cells in inflammatory lesions.

Aim. To evaluate the effect of polymerized type I collagen vs. methylprednisolone (MP) in LS, and to determine the influence of this polymerized collagen (PC) on CD4+ peripheral T cells expressing interleukin (IL)-4, IL-17A, interferon- γ and Forkhead box protein (Foxp)3, and on cells expressing transforming growth factor (TGF)- β 1, IL-17A, IL-22 and Foxp3 in the skin.

Methods. In total, 16 patients with LS were treated for 3 months with monthly subcutaneous intralesional injections of 0.1 mL MP (giving a total dose of 20 mg/mL each month) and 15 patients were treated, with weekly subcutaneous intralesional injections of PC, ranging from 0.2 mL (equivalent to 1.66 mg collagen) for a lesion > 100 mm in size, up to a maximum of 1.0 mL (8.3 mg collagen) for a lesion > 100 mm in size, and followed up for a further 6 months. Skin biopsies were obtained from lesions at baseline (before treatment) and 9 months later (6 months after treatment end). Tissue sections were evaluated by histology and immunohistochemistry (IL-17A, IL-22, TGF- β 1 and Foxp3). CD4+ T-cell subsets were determined in peripheral blood by flow cytometry.

Results. Abnormal tissue architecture was seen in the biopsies taken from patients treated with MP, whereas the PC treatment restored normal skin architecture. PC downregulated pro-inflammatory/profibrotic cytokine expression in peripheral cells, and upregulated the number of regulatory T cells (Tregs) in skin. PC was safe and well tolerated.

Conclusions. PC is not only an antifibrotic/fibrolytic agent but also an immunomodulator biologic that restores the balance between T helper (Th)1, Th2, Th17 and Tregs, downregulates production of pro-inflammatory or profibrogenic cytokines (IL-17A, IL-22 and TGF- β 1), and renews skin architecture, without adverse effects.

Correspondence: Dr Janette Furuzawa-Carballeda, Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga no. 15, Colonia Sección XVI, Tlalpan, CP 14000, Mexico City, Mexico
E-mail: jfuruzawa@gmail.com

JF-C and MO-Á contributed equally to this manuscript, and should be considered joint first authors.

Conflict of interest: none declared.

Accepted for publication 4 January 2012

Introduction

Localized scleroderma (LS; also termed 'morphoea') is a disfiguring inflammatory/fibrotic autoimmune disease of the skin and underlying connective tissue. The pathogenesis of LS is poorly understood, but various factors, including autoimmunity, genetics, vascular dysfunction and environmental factors, have been suggested.^{1,2} Several lines of evidence suggest that an imbalance of CD4+ T-helper (Th) cells and their cytokine production in tissue and peripheral blood may play a central role in the pathogenesis of LS.^{2,3} Thus, the traditional Th1/Th2 paradigm does not explain several aspects of LS.⁴ The more recent identification of other Th cell types (Th17 and Th22) and their biology opened new possibilities in the study of LS and other autoimmune diseases.^{5,6}

Th17 cells are a distinct effector lineage. Expression of retinoic acid-related orphan nuclear hormone receptor C (RORC), a proliferation factor specific for Th17,⁷ is driven by the combination of either transforming growth factor (TGF)- β 1 plus interleukin (IL)-6, IL-1 β and IL-21, or TGF- β 1 plus IL-1 β and IL-23. The cytokine profile of Th17 cells is IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-26, tumour necrosis factor (TNF)- α , and granulocyte-monocyte colony-stimulating factor, along with chemokine (C-C motif) ligand (CCL)20.^{7,8} This cytokine profile is markedly pro-inflammatory, and the overall effects of these cytokines could lead to the inflammation, fibroblast proliferation and extensive fibrosis that are the hallmark of LS. Increased serum levels of IL-1 β , IL-6, IL-17A and IL-22 were reported in 71 children with LS, supporting the possible role of Th17 cells in the disorder.^{3,4}

However, IL-22 is a member of the IL-10 family, preferentially produced by terminally differentiated Th22 cells.⁹ The Th22 subset coexpresses chemokine receptor CCR6 and the skin-homing receptors C-C chemokine receptor (CCR)4 and CCR10, lacks both IL-17A and interferon (IFN)- γ , and expresses the transcription factors basonuclin-2 and Forkhead box protein (FOX)O4.^{6,10} The IL-22 receptor is strongly expressed in nonhaematopoietic tissue cells of the outer body barriers, such as the epithelial cells of the gastrointestinal tract and keratinocytes of the skin, whereas it is not detectable on immune cells.¹¹ In those epithelial cells, IL-22 induces the production of antimicrobial proteins such as human β -defensin, indicating involvement of this cytokine in early host defence against microbial pathogens.¹¹ In the skin, IL-22 also mediates keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia by down-regulating terminal keratinocyte differentiation

genes.^{9,12} Hence, IL-22 is thought to play a central role in inflammatory diseases characterized by marked epidermal acanthosis such as psoriasis, atopic eczema and allergic contact dermatitis,^{9,12} and probably in scleroderma.

Therefore, pharmacological manipulation of the pathways involved in inflammatory processes, fibrogenesis and extracellular matrix turnover offers a potentially promising approach for the treatment of LS. We have previously evaluated a γ -irradiated mixture of atelopeptidic porcine type I collagen and polyvinylpyrrolidone (PVP), known as polymerized type I collagen or polymerized collagen (PC), which can downregulate inflammation and promote tissue regeneration.¹³ Intralesional injection of this biodrug once a week for 3 months into human hypertrophic scars or scleroderma skin lesions was found to diminish inflammatory infiltrates, modulate type I and III collagen turnover, and downregulate production of pro-inflammatory cytokines.^{13,14} PC has also been shown, both *in vitro* and in a model of collagen-induced arthritis, to produce a marked reduction in the severity of arthritis, and to induce downregulation of CD4+ IL17A+T cells and upregulation of T-regulatory cells (Tregs) and CD4+ IFN- γ +T cells.^{15,16} Thus, PC has potential as a novel therapeutic candidate to suppress autoimmune inflammation by regulating T-cell differentiation and the balance between pathogenic and regulatory T cells.

In this study, we aimed to evaluate the clinical effect of PC vs. methylprednisolone (MP) in LS, and to determine the influence of PC on Th1, Th2, Th17 and Treg peripheral cells, and on the expression in skin of TGF- β 1, IL-17A, IL-22 and Foxp3+ cells.

Methods

The protocol was approved by the Committee of Medical Ethics from both institutions, and performed in accordance with the principles of the revised Declaration of Helsinki. All participants provided informed consent.

Participants

This study was a prospective, double-blind, randomized controlled trial. Patients were enrolled¹⁷ over a period of 2 years (2008–2010) at the Dermatologic Centre Ladislado de la Pascua. Enrolment criteria were a diagnosis of LS, in patients aged > 18 years, based on clinical findings and histological evaluation; at least one skin lesion; and a negative reaction to a standard forearm skin test for PC administration.¹⁸

Exclusion criteria were pregnancy or breastfeeding; presence of lesions of lichen sclerosis et atrophicus; fibrosis induced by L-tryptophan, bleomycin, vinyl chloride or other photosensitizers; known hypersensitivity to PC or its components; history of photosensitivity; use of topical steroids within the 2 months prior to the study, use of systemic corticosteroids or immunosuppressant drugs within 3 months prior to the study; concomitant chronic or malignant disease (melanoma or nonmelanoma skin cancer), any relevant abnormalities in baseline laboratory assessment at baseline, or serological evidence of *Borrelia burgdorferi* infection. Women of childbearing potential were required to use an acceptable means of contraception.

In total, 43 patients were assessed and 12 excluded, leaving 31 patients (6 men, 25 women; age 38.6 ± 15.0 years, range 18–73) who met the criteria for inclusion into the study. Baseline measurements were recorded, then patients were allocated using random number generation and block randomization to two parallel groups, to receive either PC ($n = 15$; 3 men, 12 women; age 35.5 ± 14.2 years, range 18–62) or steroid (MP; $n = 16$; 3 men, 13 women; age 41.4 ± 15.6 years, range 18–73). The control group comprised 10 healthy subjects (1 man, 9 women; age 37.2 ± 10.9 years, range 20–57), who were included in the study to compare subsets of CD4+ peripheral T cells.

Treatment

Treatment consisted of either weekly subcutaneous intralesional injections of PC ranging from 0.2 mL (equivalent to 1.66 mg collagen) for a lesion of 50 mm in size, up to a maximum of 1.0 mL (8.3 mg collagen) for a lesion > 100 mm in size, or monthly subcutaneous injections of 0.1 mL MP (maximum dose of 20 mg or 5 mL/month) and weekly subcutaneous injections of 0.1 mL placebo (PVP citric/citrate buffer). The placebo experimental preparation was visually identical, and its viscosity was very similar to PC. Both researchers and patients were blinded to the study preparations and had no access to them.

Clinical evaluation and efficacy assessment

A screening and baseline clinic visit was required for each patient enrolled in the study. The treatment was carried out over a period of 3 months, and patients attended for follow-up every 4 weeks for 6 months after the end of the treatment period. Complete blood cell count, serum analyses including glucose and electrolyte

measurement, and liver function tests and urinalysis were performed at the initial (baseline) visit, at the end of treatment, and at the last follow-up visit. Additional treatment was restricted to the use of emollients.

All patients were assessed before and after treatment by two dermatologists blinded to the treatment groups. Skin appearance was assessed using a score adapted from the modified Rodnan Scoring System (mRSS),^{2,19} which is an aggregate skin score [0 = normal; 1 = thickened skin (able to pinch skin fold); 2 = thickened skin (unable to pinch skin fold); or 3 = unable to move skin] assessed for each of 17 areas [face, anterior chest, abdomen plus each limb (comprising upper arm, forearm, dorsum of hand, fingers, thighs, lower legs, dorsum of foot)]. The maximum potential score is 51. All individual plaques of morphea were graded from 0 to 4 (0 = normal thickness; 1 = mild thickening; 2 = moderate thickening; 3 = severe thickening; 4 = extreme thickening). The total score for all the plaques was then calculated. A decrease in mRSS exceeding 35% from baseline was considered to reflect a clinically significant improvement.

Safety assessment

Treatment safety was determined by the occurrence of systemic and local adverse events (AEs) related to administration of the study drug. At each subsequent visit, efficacy evaluations were conducted and AEs recorded before the scheduled administration of the study medication. Safety monitoring included records of vital signs and clinical laboratory tests (blood chemistry, urinalysis and liver function tests).

Skin biopsy

The biopsy site was chosen according to clinical criteria, and was required to be an indurate and inflammatory area, excluding areas with close proximity to vasculature or tendons. Skin punch biopsies 6 mm in diameter were taken from the clinically affected areas of skin before treatment (baseline) and at the end of treatment (9 months after baseline). For the second biopsy, specimens were obtained from previously affected areas adjacent to the first biopsy. The tissue samples were fixed in 10% formaldehyde, then embedded in paraffin wax and cut into sections 4 μ m thick on a microtome.

Histology

Sections were evaluated by one blinded observer using standard light microscopy. The presence and distribution

of sclerosis was assessed within the various layers of the dermis. Atrophy of dermal appendages, hyalinization and fibrosis of arterioles, presence of inflammatory infiltrates, acanthosis and hyperkeratosis were also evaluated.

Immunohistochemistry

To determine expression of IL-17A, IL-22, TGF- β 1 and Foxp3, tissues were incubated with 10 μ g/mL rabbit polyclonal antihuman IL-17A IgG antibody or with goat polyclonal antihuman Foxp3, IL-22 or TGF- β 1 IgG antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The secondary antibodies were biotinylated donkey antigoat IgG antibody or goat antirabbit IgG antibody, diluted 1 : 200 with the kit buffer, in accordance with the manufacturer's instructions (ABC Staining System, Santa Cruz Biotechnology). To exclude nonspecific staining or endogenous enzymatic activity, a negative control was prepared with normal human serum (diluted 1 : 100) instead of the primary antibody, and a reaction blank control was prepared with phosphate-buffered saline and egg albumin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA).

At least two different sections were examined for each biopsy. Cytokine- and Foxp3-expressing cells were assessed by estimating the number of positively staining cells in two fields (\times 200) and were reported as the percentage of immunoreactive cells. A decrease in pro-inflammatory/profibrotic cytokine expression exceeding 45% from baseline was considered a significant improvement.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells

A sample (10 mL) of venous blood was obtained from each subject before treatment (baseline), at 3 months (treatment phase) and at 9 months (6 months of follow-up), and a single blood sample was also collected from each of the 10 healthy controls. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by gradient centrifugation (Lymphoprep; Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway).

Flow cytometry

PBMCs (1×10^6) were stained with 5 μ L of anti-CD4 monoclonal antibody labelled with phycoerythrin/cyanin 5 (anti-CD4-PE-Cy5) and anti-CD14 monoclonal antibody labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC) (both BD Biosciences, San Jose, CA, USA). PBMCs were permeabilized with 200 μ L of a commercial solution

(Cytofix/Cytoperm; BD Biosciences) and stained for intracellular cytokines or transcription factors with PE-labelled-anti-IFN- γ , PE-labelled-anti-IL-4 (BD Biosciences), PE-labelled-anti-IL-17A and PE-labelled-anti-Foxp3 (both eBioscience Inc., San Diego, CA, USA).

PBMC subsets were analysed by flow cytometry (FACSscan; BD Biosciences). An electronic gate was made for CD4+ CD14- cells, and 50 000 events were recorded for each sample and analysed (CellQuest software; BD Biosciences). As isotype controls, IgG₁-FITC/IgG₁-PE/CD45-PeCy5 mouse IgG_{1,k} (BD Tritest™, BD Biosciences) was used to set the threshold and gates in the cytometer. Results were expressed as the relative percentage of IFN- γ -, IL-4-, IL-17A- or Foxp3-expressing cells in each gate. A decrease in IL-17A-expressing CD4+ T cells exceeding 45% from baseline was considered to indicate a significant improvement

Statistical analysis

We calculated the sample size required by using the following formula for calculating sample for proportion:

$$N = \left[\sqrt{\{pq(1 + 1/k)\} \times z_{1-\alpha/2}} + \sqrt{\{p_1q_1 + p_2q_2/k\} \times z_{1-\beta}} \right]^2 / \Delta^2$$

where $\alpha = 0.05$ and $1 - \beta = 0.80$.¹⁴ This gave a required sample size of 13, and we assumed a dropout rate of 20%.

All statistical analyses were performed using Sigma-Stat software (version 11.0; Aspire Software International, Leesburg, VA, USA). For the primary analysis, the means of the scores were compared between the two treatment groups on an intention-to-treat (ITT) basis (all patients who received a dose of study medication and had at least one efficacy observation recorded after treatment). We used the Kruskal-Wallis ANOVA and the Holm-Sidak method for all pairwise multiple comparison procedures. Data are expressed as mean \pm SD or mean \pm SEM as appropriate, and $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Participants

The two treatment groups were similar with respect to age, number of skin lesions and mRSS, with no significant differences (Table 1). In total, 13 patients (87%) in the PC group and 14 (88%) in the MP group completed the study, and were valid for ITT analysis.

Table 1 Demographic characteristics and disease history.

	Healthy controls	Baseline	3 months		9 months	
			PC	MP	PC	MP
Gender						
Female, n (%)	9 (90)	25 (81)	10 (77)	11 (79)	10 (77)	11 (79)
Male, %	1 (10)	6 (19)	3 (23)	3 (21)	3 (23)	3 (21)
Age, years						
Mean ± SD	37.2 ± 10.9	38.4 ± 15.2	–	–	–	–
Median	35.1	35	–	–	–	–
Disease duration, months						
Mean ± SD	–	40.5 ± 37.8	–	–	–	–
Median	–	24	–	–	–	–
Subgroup						
Plaque, n (%)	–	30 (97)	14 (93)	16 (100)	–	–
Linear, n (%)	–	1 (3)	1 (7)	0 (0)	–	–
No. of skin lesions						
Mean ± SD	–	–	1.3 ± 0.6	1.1 ± 0.3	–	–
Median	–	–	1	1	–	–
mRSS						
Mean ± SD	–	5.2 ± 2.9	4.2 ± 1.7	2.9 ± 0.7*	2.6 ± 1.3*	2.1 ± 0.5*
Median	–	4	3	2	2	2
Leukocytes, cells/mL						
Mean ± SD	6618.2 ± 1475.0	6050 ± 1665.1	6823.1 ± 2205.1	6037.9 ± 2265.3	6664.6 ± 1526.4	6217.9 ± 1380.1
Median	6800	6300	7000	5900	7000	6015
Lymphocytes, %						
Mean ± SD	33.5 ± 2.4	36.2 ± 9.3	33.6 ± 7.3	33.9 ± 9.2	36.3 ± 9.1	32.5 ± 10.1
Median	35.5	36.8	36	33.1	37	33.4

MP, methyl prednisolone; mRSS, modified Rodnan Scoring System; PC, polymerized type I collagen. * $P < 0.05$, treatment vs. baseline.

Both patients who withdrew from the PC group received seven injections each before withdrawal; one patient withdrew for personal reasons, and one withdrew because of lack of time. Of the two patients who withdrew from the MP group, one received five injections and withdrew because of therapeutic inefficacy, and the other received three injections and withdrew for personal reasons.

Clinical assessment

There was a significant decrease in mRSS from baseline to 9 months (end of follow-up) for both treatments [change (Δ) \cong -60% for MP and \cong -44% for PC; Table 1). Although the MP group attained a clinical improvement before the PC group, MP caused hyperpigmentation, hypopigmentation, thinning of the skin and atrophy, whereas PC produced softening of the skin, fading of signs of inflammation, and restoration of normal pigmentation and cutaneous appendages (determined by presence of sweat glands and villous hairs) (Fig. 1a–f).

Histological findings

Before treatment, the skin of all patients was characterized by marked accumulation of type I collagen bundles orientated horizontally in the reticular dermis. Eccrine glands were encircled by collagen, and thus appeared closer to the epidermis. There was atrophy of the hair follicles and the sweat and sebaceous glands, and all were reduced in number. There was also hyalinization and fibrosis of arterioles, and there was a variably dense perivascular infiltrate of leucocytes, including lymphocytes, plasma cells, eosinophils and histiocytes (Fig. 2a).

After MP treatment, the skin had a flattened epidermal profile, and acanthosis and hyperkeratosis were visible. Type I collagen fibres in the reticular dermis were orientated horizontally, and there was atrophy of the dermal appendages (Fig. 2b). After PC treatment, there was recovery of cutaneous appendages and a decrease in the number of bundles of type I collagen. In addition, collagen fibres had a reticular distribution, and the tissue architecture resembled normal skin.

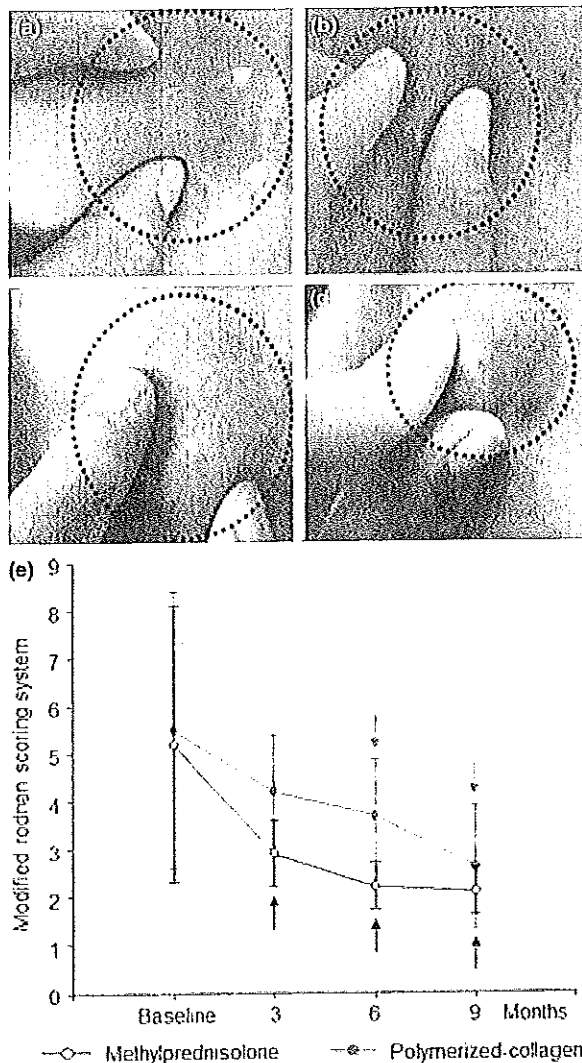


Figure 1 Clinical evaluation was performed at baseline, month 3 and month 9 of the study. (a–d) Skin lesions at (a,c) baseline, and (b,d) at 9 months after (b) methylprednisolone (MP) and (d) polymerized collagen (PC) treatment. (e) Modified Rodnan skin score. Arrows depict the month in which the treatment reaches a $P < 0.05$ compared with baseline, in black for MP and in red for PC group. Results depict mean \pm SD.

Hyalinization, fibrosis of arterioles and inflammatory infiltrates were slight (Fig. 2c).

In situ pro-inflammatory/profibrogenic cytokine expression and Foxp3-producing cells

The PC group had a significant downregulation in IL-17A ($\cong -61\%$), IL-22 (-61%) and TGF- β 1 ($\cong -66\%$) at 9 months after study start compared with baseline; the

changes in the MP group were not significant ($\cong -6\%$ for IL-17A, $\cong -26\%$ for IL-22, and $\cong 0\%$ TGF- β 1) (Table 2; Fig. 2d–f, Fig. 3). Foxp3-expressing cells were conspicuously increased in the PC group ($\cong +86\%$) at the end of the study compared with baseline, whereas those in the MP group were not ($\cong -5\%$) (Table 2, Fig. 2m–o, Fig. 3).

CD4+ T-cell subsets in peripheral blood

CD4+ T cells expressing IL-17A, IL-4, IFN- γ and Foxp3 were increased in patients with LS at baseline compared with healthy controls (Table 2, Fig. 4). After treatment and during follow-up, CD4+ T cell subsets decreased in both sets of patients with LS to those found in healthy controls. However, only the PC group had a significant downregulation in the percentage of Th17 ($\cong -77\%$), Th2 ($\cong -67\%$) and Treg ($\cong -65\%$) cells compared with baseline (Fig. 4).

Safety

PC was well tolerated during extended treatment, and there were no AEs apart from pain of short duration (< 5 min) at the injection site. By contrast, patients receiving MP treatment reported atrophy, thinning and hyper/hypopigmentation of the skin, ecchymoses, pain at the injection site, persistent pruritus, and progression of cutaneous fibrosis (data not shown). There was no change in liver, urine or blood test results for either group.

Discussion

In this study, we evaluated the histological and immunological effects of intradermal administration of PC compared with MP into sclerotic plaques of patients with LS. Management of LS usually includes observation, topical medications or phototherapy, but patients with lesions that are likely to cause significant cosmetic disfigurement, joint contractures or other functional impairments require aggressive systemic (methotrexate and/or corticosteroids) and physical therapy.¹

In LS, a clinically evident inflammatory stage often precedes the development of sclerosis. This is accompanied by vascular dysfunction, reduced numbers of dermal capillaries, abnormalities in the basal lamina of blood vessels, and damage to endothelial cells. Injury to the vascular endothelium during the inflammatory stage stimulates the release of cytokines that upregulate tissue and serum expression of vascular cell adhesion

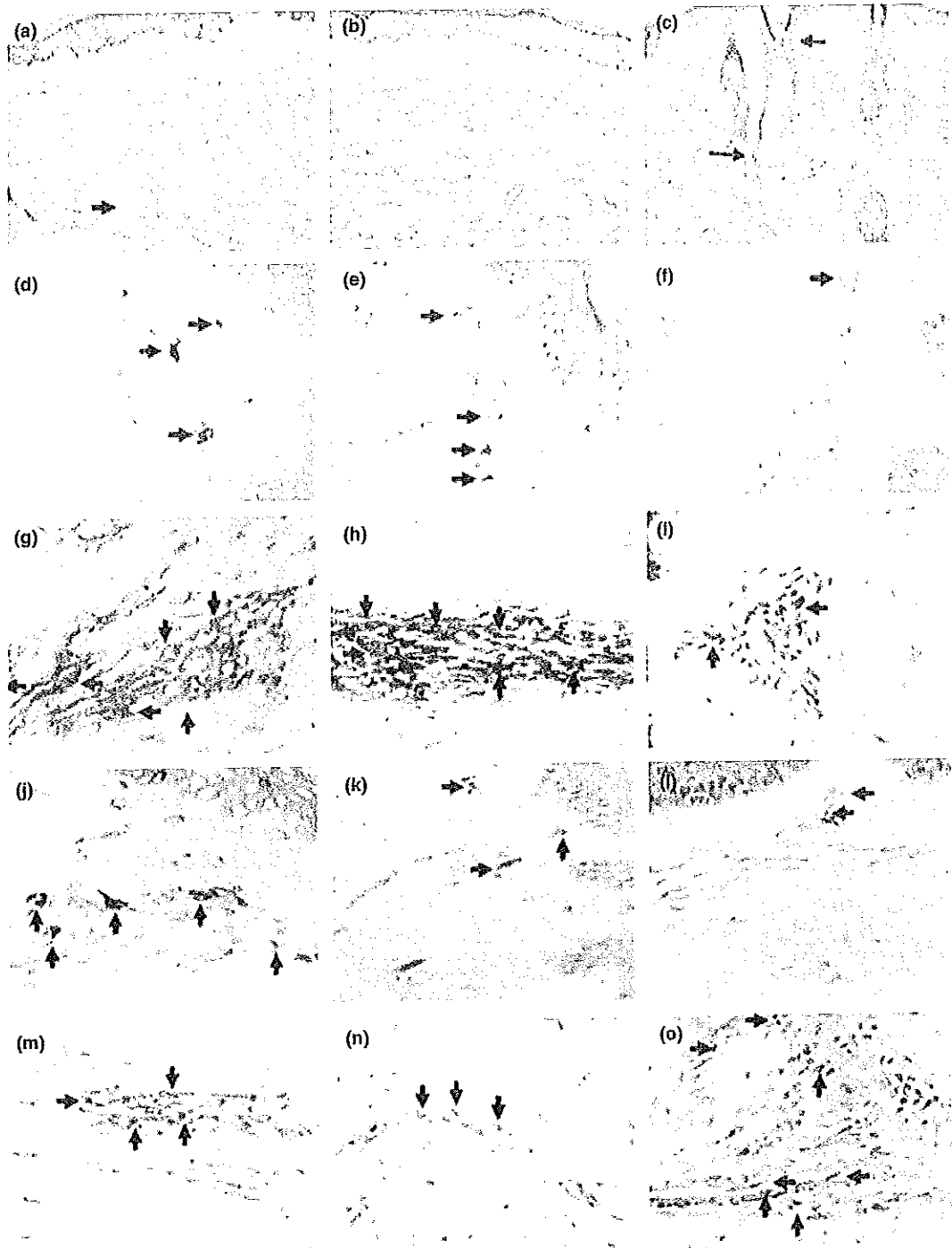


Figure 2 Effect on tissue architecture and expression of cytokines and Foxp-3 at (left column) baseline and at 9 months after start of treatment with (middle) methylprednisolone (MP) or (right) polymerized collagen (PC). (a) At baseline, the dermis contained thick type I collagen bundles and moderate inflammatory infiltrates in the interstitial space and specifically around blood vessels; (b) after MP treatment, skin treated showed accumulation of collagen bundles orientated horizontally, while (c) skin treated with PC exhibited rete ridges and a reticular arrangement of collagen (in this section, a hair follicle is also visible; arrows). Haematoxylin and eosin, original magnification (a–c) $\times 100$. (d–f) Expression of (d–f) interleukin (IL)-17A, (g–i) IL-22, (j–l) transforming growth factor)- β 1, and (m–o) Foxp3 at baseline and 9 months after MP or PC treatment. Original magnification $\times 200$.

Table 2 Percentage of T helper (Th)17, Th2, Th1 and T-regulatory cells in peripheral blood and cutaneous lesion from patients with localized scleroderma.

	Healthy controls	Baseline	3 months		9 months	
			PC	MP	PC	MP
Peripheral blood cells, %						
IL-17A+						
Mean ± SEM	1.1 ± 0.2	5.7 ± 0.9	1.9 ± 0.3*	2.2 ± 0.6	1.3 ± 0.2*	2.1 ± 0.4
Median	0.9	5.2	1.9	1.4	1.5	1.8
IL-4+						
Mean ± SEM	0.7 ± 0.2	3.9 ± 0.7	2.2 ± 0.5	1.9 ± 0.5	1.3 ± 0.3*	2.5 ± 0.6
Median	0.7	3.2	1.8	1.4	0.9	1.8
IFN-γ+						
Mean ± SEM	0.7 ± 0.2	2.8 ± 0.6	2.3 ± 0.6	2.1 ± 0.6	1.5 ± 0.4	2.1 ± 0.6
Median	0.6	2.5	1.2	1.5	1.2	1.5
Foxp3+						
Mean ± SEM	1.9 ± 0.3	8.1 ± 1.4*	3.6 ± 0.5*	2.9 ± 0.7	2.8 ± 0.4*	2.4 ± 0.4*
Median	2	6.3	3.2	2	2.7	2.1
Tissue cells, %						
IL-17A+						
Mean ± SEM	–	19.5 ± 1.2	–	–	7.7 ± 0.4*	18.4 ± 3.0
Median	–	19	–	–	8.0	18
IL-22+						
Mean ± SEM	–	26.3 ± 2.1	–	–	8.4 ± 1.2*	19.4 ± 1.5
Median	–	28	–	–	9	19
TGF-β1+						
Mean ± SEM	–	7.0 ± 1.2	–	–	2.4 ± 0.5*	7.0 ± 1.1
Median	–	6.5	–	–	2	6
Foxp3+						
Mean ± SEM	–	9.7 ± 0.9	–	–	18.0 ± 0.9*	9.2 ± 1.6
Median	–	10	–	–	18	8

IFN, interferon; IL, interleukin; TGF, transforming growth factor. All cells in peripheral blood were CD4+CD14-. *P < 0.05, treatment vs. baseline.

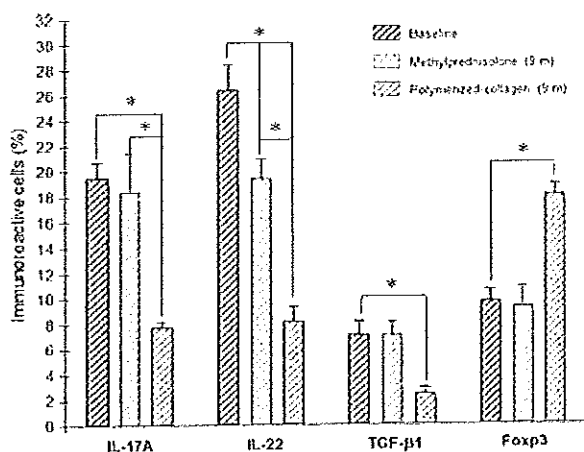


Figure 3 Percentage of cells expressing interleukin (IL)-17A, IL-22, transforming growth factor (TGF)-β1 and Foxp3 in skin from patients with localized scleroderma (LS) at baseline and 9 months after treatment. Results are expressed as mean ± SEM. *P < 0.05.

molecule-1, intercellular adhesion molecule-1 and endothelial leukocyte adhesion molecule-1.²⁰ Adhesion molecules and pro-inflammatory soluble factors facilitate the recruitment and influx of large numbers of activated lymphocytes, macrophages, plasma cells, neutrophils and eosinophils. Macrophages themselves secrete IL-1β, which cooperates with and is cross-regulated by IL-17A. The presence of increased numbers of IL-17A-producing CD4+ T cells in peripheral blood and tissue suggests an increase in the levels of IL-1β, IL-6, IL-17A and TNF-α. Such signals recruit, expand and activate fibroblasts to produce collagen, and induce the differentiation of Th17 cells from naive precursors, in a positive feedback mechanism.²¹ Alternatively, cytokines associated with Th2 immune responses, such as IL-4 and IL-13, are, in conjunction with TGF-β1, capable of stimulating fibroblast production of collagen and other extracellular matrix proteins, and may contribute to the development of sclerosis.²² In fact, the levels of IL-4 and

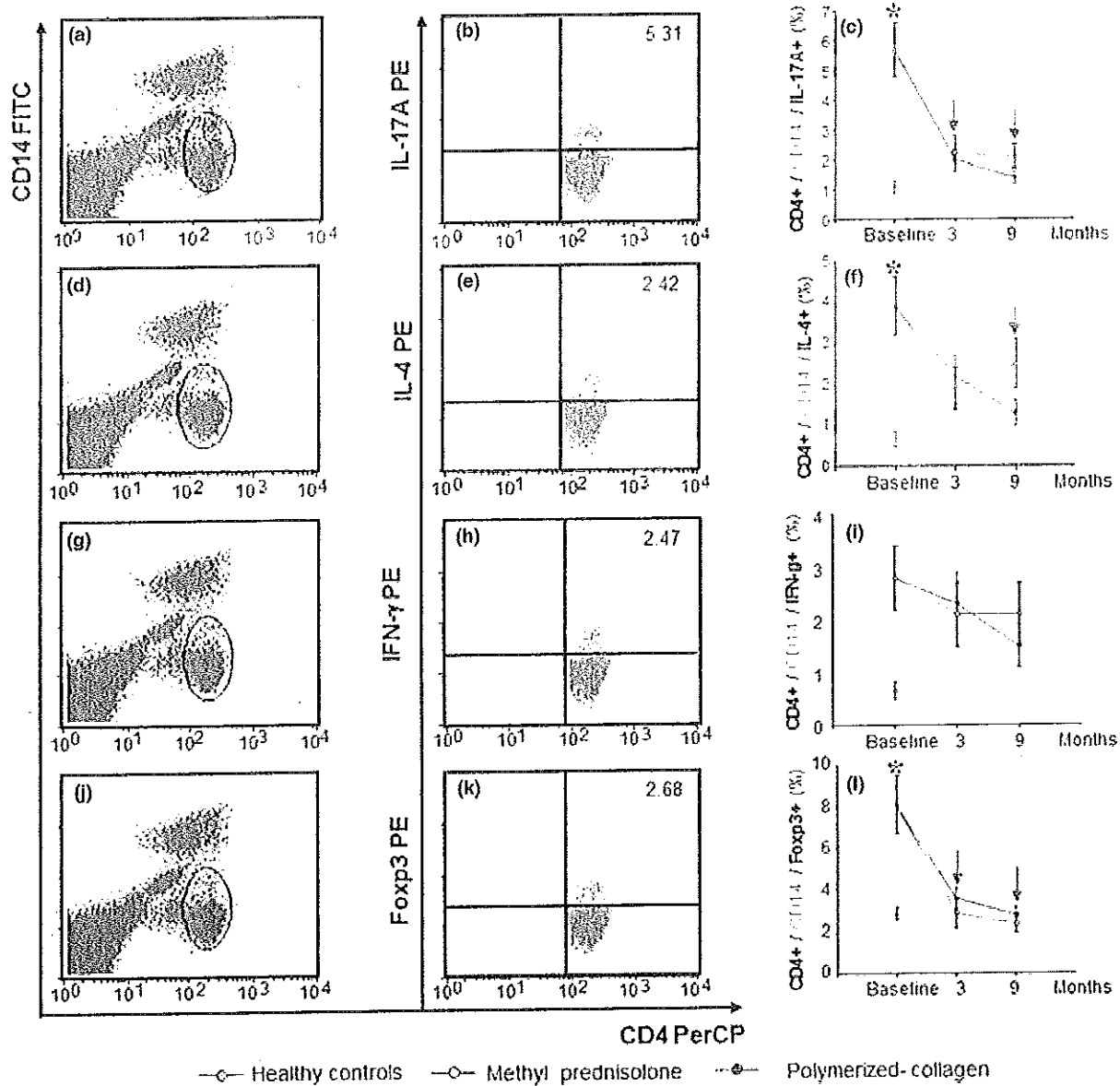


Figure 4 Representative flow-cytometry graphs of peripheral blood CD4+ T cells from healthy controls (purple), and patients with localized scleroderma (LS) treated with methylprednisolone (MP; black) and polymerized collagen (PC; pink). A total of 50 000 events were recorded for each sample. (a,d,g,j) An electronic gate was made for CD4+ CD14- single positive cells, and from this gate, CD4+ CD14- cells expressing (b) interleukin (IL)-17A, (e) IL-4, (h) interferon (IFN)-γ and (k) Foxp3 were defined. Results are expressed as mean ± SEM. *P < 0.05 compared with healthy control group. (c,f,i,l) Change in expression of (c) IL-17A, (f) IL-4, (i) IFN-γ and (l) Foxp3 over time. Results are expressed as mean ± SEM. (c,f,i,l) Red arrows depict the month in which polymerized collagen (PC) reached significance (P < 0.05) compared with baseline.

IL-13 are increased in patients with LS, and are significantly associated with the number of plaque lesions.²² Thus, novel approaches for treating LS should include a combination of immunomodulators and fibrolytic/antifibrotic agents.

In this study, we found that PC was better than MP in restoring the balance between Th1, Th2, Th17 and Treg cells, and inducing tissue regeneration at 9 months. There was a decrease in mRSS from baseline, with both groups having a substantially higher decrease than the

prespecified effect size of 35% ($\Delta \cong -60\%$ for MP and $\cong -44\%$ for PC). PC treatment produced recovery in cutaneous appendages, while bundles of type I collagen decreased, collagen fibres were distributed reticularly, and the tissue architecture resembled normal skin. By contrast, skin treated with MP had a flattened epidermal profile, with atrophy of the dermal appendages, acanthosis and hyperkeratosis. Type I collagen fibres in the reticular dermis were orientated horizontally.

The proportions of Th1, Th2, Th17 and Treg cells were increased in peripheral blood from all patients with LS. These T-cell subsets were restored to normal levels at month 9 in the PC but not the MP group. In addition, the levels of cytokines in sclerotic lesions were downregulated by both treatments at month 9 compared with baseline, but this downregulation was greater with PC than MP (see Results).

Tregs are one of many mechanisms of the immune system that enforce tolerance to harmless and self antigens by suppressing the activation, cytokine production and proliferation of other T cells.²³ Tregs are characterized by strong expression of the transcription factor Foxp3. In normal human skin, 5–10% of the resident T cells are Foxp3+ Tregs, and these cells proliferate under conditions similar to those found in inflamed skin.²³ This suggests that local proliferation of Tregs in the skin is able to stop cutaneous inflammation.²⁴ It is noteworthy that in this study, Tregs were 2.9-fold (about 86%) higher in LS sclerotic plaques from patients receiving PC compared with baseline, and were also higher than in plaques from patients receiving MP. This observation correlates with the decrease in the number of Foxp3-expressing peripheral cells, suggesting that circulating cells might migrate into inflamed tissue to downregulate inflammation *in situ*.

One of the strengths of this study is that we were able to analyse the effect of MP and PC on CD4+ peripheral T-cell subsets and cytokines, and the effect of Foxp3 protein on tissue in the same patients in a prospective, randomized, controlled, blinded clinical trial, and to compare the results before and after treatment and between treatments. In general, PC was well tolerated during extended therapy, and there were no systemic and/or local AEs, except pain lasting for < 5 min at the injection site. By contrast, the patients in the MP group reported pruritus, atrophy, thinning and hypopigmentation of the skin; ecchymosis; pain at the injection site; and progression of cutaneous fibrosis. The last may be due to the lack of immunosuppressive effects during follow-up and the

large number of cells expressing IL-17A, IL-22 and TGF- β 1. In contrast to previously published studies,²⁵ we measured the efficacy of treatment in this study not only by clinical improvement, but also by the resumption of normal tissue architecture and normal levels of pro-inflammatory and profibrotic cytokine expression to normal levels.

The limitation of our study is that the efficacy of pharmacotherapeutic agents in LS is a challenge because of the rarity of the condition, the heterogeneity of the disease severity within study populations, the difficulty in establishing controls, and the spontaneous remission of LS in about 50% of patients, which makes it difficult to discern the effect of treatment.¹ LS seems to be self-limiting, with activity or progression of disease lasting 3–5 years; however, reactivation can occur, and despite regression, few lesions resolve completely. Thus, cosmetic disfigurement or functional impairment due to hypopigmentation/hyperpigmentation, atrophy or contractures often remain after resolution of active disease.

Conclusion

The results from this study show that PC is very effective in LS, with excellent safety profile. PC is not only an antifibrotic/fibrolytic agent, but also an immunomodulator biodrug that restores the balance of Th1, Th2, Th17 and Treg cells, downregulates production of pro-inflammatory/profibrogenic cytokines (IL-17A, IL-22 and TGF- β 1), and renews skin architecture, without producing AEs. Further work needs to be carried out to determine the precise mechanism(s) of action of PC.

What's already known about this topic?

- LS is a disfiguring inflammatory/fibrotic autoimmune disease of the skin and the underlying connective tissue.
- Several factors, including autoimmunity, genetics, vascular dysfunction and environmental factors have been implicated in the aetiology of LS.
- This study provides evidence supporting that an imbalance in CD4+ T-helper cells (Th1, Th2, Th17 and Treg cells) and production of their cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-17A, IL-22) in tissue and peripheral blood may play a central role in disease pathogenesis.

What does this study add?

- PC has an excellent safety and efficacy profile.
- PC is not only an antifibrotic/fibrolytic agent but also an immunomodulator biodrug.
- It restores the balance between Th1, Th2, Th17 and Treg cells, downregulates production of pro-inflammatory/profibrogenic cytokines (IL-17A, IL-22 and TGF- β 1) and renews skin architecture, without producing AEs.

References

- 1 Badaea I, Taylor M, Rosenberg A, Foldvari M. Pathogenesis and therapeutic approaches for improved topical treatment in localized scleroderma and systemic sclerosis. *Rheumatol* 2009; **48**: 213–21.
- 2 Takehara K, Sato S. Localized scleroderma is an auto-immune disorder. *Rheumatol* 2005; **44**: 274–9.
- 3 Kurzinski K, Torok KS. Cytokine profiles in localized scleroderma and relationship to clinical features. *Cytokine* 2011; **55**: 157–64.
- 4 Torok K, Arkachaisri T, Medsger TA Jr, Feghali-Bostwick CA. Th1 and Th17 cytokine signatures in early pediatric localized scleroderma. *Arthritis Rheum* 2010; **62**: S839.
- 5 Rodríguez-Reyna TS, Furuzawa-Carballeda J, Cabledes J et al. Th17 peripheral cells are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis compared with limited illness: a cross-sectional study. *Rheumatol Int* 2011; PMID: 21789610. DOI 10.1007/s00296-011-2056-y.
- 6 Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ et al. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2009; **130**: 1373–83.
- 7 Annunziato F, Cosmi L, Liotta F et al. Human Th17 cells: are they different from murine Th17 cells? *Eur J Immunol* 2009; **39**: 637–40.
- 8 Yang XO, Pappu BP, Nurieva R et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 2008; **28**: 29–39.
- 9 Fujita H, Nograles KE, Kikuchi T et al. Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. *PNAS* 2009; **106**: 21795–800.
- 10 Trifari S, Kaplan CD, Tran EH et al. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from Th17, Th1 and Th2 cells. *Nature Immunol* 2009; **10**: 864–71.
- 11 Wolk K, Kunz S, Witte E et al. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004; **21**: 241–54.
- 12 Eyerich S, Eyerich K, Pennino D et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodelling. *J Clin Invest* 2009; **119**: 3573–85.
- 13 Kröttsch-Gómez FE, Furuzawa-Carballeda GJ, Reyes-Márquez R et al. Cytokine expression is downregulated by collagen-PVP in hypertrophic scars. *J Invest Dermatol* 1998; **111**: 828–34.
- 14 Furuzawa-Carballeda J, Kröttsch-Gómez FE, Espinosa-Morales R et al. Subcutaneous administration of collagen-polyvinylpyrrolidone down-regulates IL-1beta, TNF-alpha, TGF-beta1, ELAM-1 and VCAM-1 expression in scleroderma skin lesions. *Clin Exp Dermatol* 2005; **30**: 83–6.
- 15 Furuzawa-Carballeda J, Rodríguez-Calderón R, de Díaz León L, Alcocer-Varela J. Mediators of inflammation are down-regulated while apoptosis is up-regulated in rheumatoid arthritis synovial tissue by polymerized collagen. *Clin Exp Immunol* 2002; **130**: 140–9.
- 16 Furuzawa-Carballeda J, Macip-Rodríguez P, Galindo-Feria AS et al. Polymerized-type I collagen induces up-regulation of Foxp3-expressing CD4 regulatory T cells and down-regulation of IL-17-producing CD4+ T cells (Th17) cells in collagen-induced arthritis. *Clin Dev Immunol* 2012; **2012**: 618608.
- 17 Peterson LS, Nelson AM, Su D. Classification of morphea (localized scleroderma). *Mayo Clin Proc* 1995; **79**: 1068–76.
- 18 Furuzawa-Carballeda J, Rojas E, Valverde M et al. Cellular and humoral responses to collagen-polyvinylpyrrolidone administered during short and long periods in humans. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; **81**: 1029–35.
- 19 Furst DE, Clements PJ, Steen VD et al. The modified Rodnan skin score is an accurate reflection of skin biopsy thickness in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1998; **25**: 84–8.
- 20 Usmani N, Murphy A, Veale D et al. Photochemotherapy for localized morphea: effect on clinical and molecular markers. *Clin Exp Dermatol* 2008; **33**: 698–704.
- 21 Barron L, Wynn TA. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; **300**: G723–8.
- 22 Hasegawa M, Sato S, Nagaoka T et al. Serum levels of tumor necrosis factor and interleukin-13 are elevated in patients with localized scleroderma. *Dermatol* 2003; **207**: 141–7.
- 23 Clark RA, Kupper TS. IL-15 and dermal fibroblasts induce proliferation of natural regulatory T cells isolated from human skin. *Blood* 2007; **109**: 194–202.
- 24 Vikmanovic-Stejt M, Angus E, Booth N et al. The kinetics of CD4+Foxp3+ T cell accumulation during a human cutaneous antigen-specific memory response in vivo. *J Clin Invest* 2008; **118**: 3639–50.
- 25 Zwischenberger BA, Jacobe HT. A systematic review of morphea treatments and therapeutic algorithm. *J Am Acad Dermatol* 2011; **65**: 925–41.

GUÍA PARA LA PRESENTACIÓN DEL REPORTE
FINAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



Fecha de elaboración de este Informe final:

19 de Junio, 2015

Fecha de ingreso al Servicio Social en Investigación :

Agosto 2014

mes y año

El pasante en servicio social con el aval del tutor, como responsable del proyecto de investigación, deberá enviar por correo electrónico (formato pdf) a la Dirección de Educación en Salud, de la Dirección General de Calidad y Educación en Salud (a la dirección electrónica que le informe la propia DGCEs), este Reporte Final, de la Investigación que presentó para su ingreso en el Programa Nacional de Servicio Social en Investigación en Salud.

Considerando su ética profesional, se dará el voto de confianza en la información que USTED proporcione; siempre y cuando contenga la rúbrica del tutor en cada página y su firma en la final.

El reporte final deberá estar acorde con el protocolo que presentó para ingresar al programa y el informe de avances del desarrollo del protocolo entregado semestralmente. Si Ud. no demostró el Curso de Metodología de la Investigación, en el reporte semestral, adjunte la imagen escaneada -como una hoja adicional- al final de este informe y presente el original y una fotocopia el día de la presentación final.

I. DATOS GENERALES

1.1 Título de la investigación: Determinación de la posología del Fibroquel^{Cartilage}, un fármaco modificador de la progresión de la osteoartritis en un modelo en rata.

1.2 Número de registro del protocolo ante la Comisión de Ética: 1093

1.3 Fecha de autorización por :

1.3.1 Comité de investigación: 17 12 2013
dd mm aaaa

1.3.2 Comité de Ética: 17 12 2013
dd mm aaaa

1.4 Nombre completo del alumno: Esquivel Alvarez Yeraldin
Apellido paterno Apellido materno Nombre (s)

1.5 Nombre completo del responsable de la investigación: Furuzawa Carballeda Guadalupe Janette
Apellido paterno Apellido materno Nombre (s)

GUÍA PARA LA PRESENTACIÓN DEL REPORTE
FINAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



1.6 Nombre completo de los investigadores colaboradores:			
1.-	Almonte <i>Apellido paterno</i>	Becerril <i>Apellido materno</i>	Maylin <i>Nombre (s)</i>
2.-	Enriquez <i>Apellido paterno</i>	González <i>Apellido materno</i>	Ana B. <i>Nombre (s)</i>
3.-	De la Cruz <i>Apellido paterno</i>	García <i>Apellido materno</i>	Juan Carlos <i>Nombre (s)</i>
4.-	Hernández <i>Apellido paterno</i>	González <i>Apellido materno</i>	Rafael <i>Nombre (s)</i>
5.-	Salmerón <i>Apellido paterno</i>	Estrada <i>Apellido materno</i>	Griselda <i>Nombre (s)</i>
6.-	Fonseca <i>Apellido paterno</i>	Camarillo <i>Apellido materno</i>	Gabriela <i>Nombre (s)</i>
1.7 Horas a la semana dedicadas a la investigación:			40 Hrs.
1.8 Horas de asesoría a la semana, recibidas del responsable del proyecto:			40 Hrs.
1.9 Tipo de investigación: <i>(marque con una x)</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Básica	<input type="checkbox"/> Aplicada	<input type="checkbox"/> Desarrollo Tecnológico
1.10 Línea de investigación en la que se inscribe el proyecto de investigación:	- Regulación de la inflamación mediante el uso de proteínas de matriz extracelular modificadas. - Fármacos modificadores de la progresión de la OA y regeneradores del cartílago.		
1.11 Institución, Centro(s) y Departamento(s) donde se ubica la investigación:			
1.11.1	INCMNSZ, Departamento de Inmunología y Reumatología.		
1.11.2	..		
1.11.3	..		
1.11.4	..		
1.11.5	..		
1.12 Otras instituciones participantes y su tipo de participación:			
	Institución	Participación	
1.12.1	Depto. de infectómica, Centro de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, CINVESTAV-IPN	Desarrollo del modelo	
1.12.2	

GUÍA PARA LA PRESENTACIÓN DEL REPORTE
FINAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



1.12.3
1.12.4
1.12.5

1.13	Fecha de inicio de la investigación:	Fecha de término de la investigación:
	04 08 2014	01 06 2015
	dd mm aaaa	dd mm aaaa

1.14 Indicar si han tenido prórrogas y/o suspensiones en la investigación y la causa:

No Si

Si la respuesta es sí, anote la causa:

.....

1.15 Porcentaje de avance actual de la investigación: 100 %

1.16 Fecha en que presentó el avance semestral: 06 02 2015

dd mm aaaa

1.17 Fecha en que cumplió con el curso de metodología de la investigación: 19 06 2015

dd mm aaaa

II. INFORMACIÓN TÉCNICA

2.1 Objetivos	
Programados	
2.1.1	Búsqueda bibliográfica y aplicación de medicamentos en modelo murino.
2.1.2	Obtención de datos clinimétricos (grosor de patas, peso, temperatura).
2.1.3	Evaluar histológicamente la arquitectura tisular de la cavidad articular y si existen modificaciones de la matriz extracelular.
2.1.4	Determinar inmunohistoquímicamente la presencia de colágena tipo II, colágena tipo I, y proteína oligomérica de cartílago.
2.1.5	Determinar radiológicamente el espacio articular y la presencia de cartílago.
Alcanzados	
2.1.1	Búsqueda bibliográfica y aplicación de medicamentos en modelo murino.
2.1.2	Obtención de datos clinimétricos (grosor de patas, peso, temperatura).
2.1.3	Evaluar histológicamente la arquitectura tisular de la cavidad articular y si existen modificaciones de la matriz extracelular.
2.1.4	Determinar por inmunofluorescencia la presencia de colágena tipo II, colágena tipo I, y proteína oligomérica de cartílago.
2.1.5	Determinar radiológicamente el espacio articular y la presencia de cartílago.

2.2 Principales actividades del alumno en el desarrollo del proyecto	
Programadas	
2.2.1	Búsqueda bibliográfica y desarrollar el modelo de osteoartritis en la rata.
2.2.2	Aplicación de medicamentos en modelo murino.
2.2.3	Obtención de datos clinimétricos y radiográficos.
2.2.4	Evaluación histológica.
2.2.5	
Realizadas	

GUÍA PARA LA PRESENTACIÓN DEL REPORTE
FINAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



2.2.1	Búsqueda bibliográfica y desarrollar el modelo de osteoartritis en la rata
2.2.2	Aplicación de medicamentos en modelo murino.
2.2.3	Obtención de datos clinimétricos y radiográficos.
2.2.4	Evaluación histológica.
2.2.5	
2.3 Problemas detectados durante el desarrollo del proyecto:	
2.3.1	Ninguno
2.3.2	
2.3.3	
2.3.4	
2.3.5	
2.3.6	
2.3.7	
2.3.8	
2.3.9	

III. INFORMACIÓN FINANCIERA

3.1 Tipo de financiamiento para la realización de la investigación: Fondos propios del Investigador

IV. INFORMACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 Resumen de la investigación (máximo 250 palabras)



(Máximo 250 palabras, conservando el formato, con letra arial 10 puntos, justificado)

Una de las prioridades del sector salud a nivel mundial es la búsqueda de fármacos y estrategias terapéuticas que puedan tener un impacto positivo en la modificación de la progresión de la OA, en la condroprotección/regeneración del cartílago hialino, en el costo/beneficio y que sea inocuo. Debido a lo anterior, el presente proyecto tiene como objetivo determinar la eficacia terapéutica y el mecanismo de acción de la administración supracapsular de Fibroquel^{Cartilage} (mezcla de matricinas con colágena polimerizada tipo I preparada en 3 diferentes proporciones: PA1, PA2 y PA3), en tres modelos distintos de OA en rata (Toxicidad, OA temprana y de larga evolución). Los resultados clinimétricos no mostraron diferencias entre los grupos de estudio. El análisis histológico de los tejidos teñidos con safranina O evidenció que el tratamiento con el PA3 en el modelo de OA temprano y de larga evolución fue el más efectivo evitando la pérdida de proteoglicanos y conservando la estructura tisular de las zonas superficial, media y profunda del cartílago; radiológicamente se determinó la conservación del espacio articular, la ausencia de osteofitos y esclerosis; bioquímicamente se determinó un incremento significativo en la síntesis de colágena tipo II, una disminución en la tipo I y en la expresión de MMP-13 vs. el control de OA y los tratamientos con el PA1, PA2 y Fibroquel. No se determinaron efectos adversos en los grupos de tratamiento con el Fibroquel, el PA1, PA2 y PA3.

- 4.2 Introducción, Material y métodos (metodología), Resultados, Discusión, Conclusiones y Bibliografía** *(en una extensión máxima de 15 cuartillas)*
En caso de contar con un producto publicado que informe los resultados de la investigación (en revista indexada) podrá sustituir el reporte, siempre y cuando anote la(s) cita(s) e incorpore los documentos, según corresponda.



(Máximo 15 cuartillas, conservando el formato, con letra arial 10 puntos, justificado)

Introducción

La osteoartritis (OA) es el resultado de sucesos mecánicos y biológicos que incrementan la degradación del cartílago articular y del hueso subcondral. Se manifiesta por cambios morfológicos, bioquímicos, moleculares y biomecánicos produciendo reblandecimiento, fibrilación, ulceración y pérdida del cartílago articular, esclerosis y eburneación del hueso subcondral, osteófitos y quistes subcondrales. Las causas pueden ser factores genéticos, de desarrollo, metabólicos y traumáticos e involucran a todos los tejidos de la articulación diartroïdal. Se caracteriza por dolor articular y a la presión, crepitación, limitación de movimientos, derrame y grados variables de inflamación local.

La OA es la enfermedad reumática más común y la principal causa de discapacidad en adultos mayores de 45 años. Afecta a más de 20 millones de personas en EEUU (13%). En México tiene una prevalencia estimada del 3-6 % en población general. Se espera que para el año 2020 se duplique el número de personas con alguna discapacidad asociada a la OA. La terapéutica tiene un costo de más de 60 mil millones de USD/año. El tratamiento actual de la OA se enfoca principalmente en el alivio de los síntomas con pocas opciones terapéuticas paliativas que sean seguras y eficaces. En la actualidad, el empleo de proteínas de matriz extracelular y de péptidos derivados de las anteriores, han demostrado tener eficacia terapéutica en el tratamiento de enfermedades como la osteoartritis, artritis reumatoide, y esclerosis múltiple, entre otras.

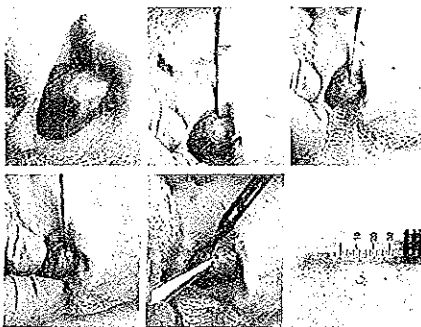
En cuanto a la mezcla de matricinas (péptidos derivados de colágena y elastina) con colágena polimerizada tipo I (Fibroquel^{Cartilage}) se ha demostrado en estudios anteriores el efecto antiinflamatorio que ejercen al inhibir el daño articular en un modelo de artritis inducida por colágena (CIA), sin producir eventos adversos; estos resultados sugieren que estas moléculas podrían estar actuando como tolerágenos. Dado las características clínicas de la OA y las propiedades que han mostrado el uso de matricinas y colágena tipo I podemos inferir que la mezcla de estas proteínas extracelular modificadas podrían ser de gran utilidad modificando el curso y comportamiento de la inflamación así como el recambio de la matriz extracelular. Por lo tanto, nuestro objetivo es evaluar el efecto regulador negativo de la inflamación de la mezcla de estas proteínas de matriz extracelular modificadas (Fibroquel^{Cartilage}) en un modelo de OA en ratas Wistar desde un punto de vista clínico, histológico y molecular.

Material y Métodos

Modelo de OA y evaluación clinimétrica

Durante el semestre se desarrolló el modelo de OA en 51 ratas Wistar macho de 130 a 150 g de peso, las cuales fueron sometidas a meniscectomía parcial (30-50% del menisco) de la pata trasera derecha.

Secuencia quirúrgica de la inducción de OA



A los tres días post-cirugía se les sometió a ejercicio de alto impacto durante 15 minutos diarios. Cuatro

GUÍA PARA LA PRESENTACIÓN DEL REPORTE
FINAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



animales se depositaron en una caja de 33 cm de ancho X 60 cm de alto X 33cm de profundidad con una cama de aserrín. Durante la primera semana se realizaron 3 ciclos de ejercicios diarios, de la siguiente manera: 1) La caja se meció de un lado a otro durante 2 min, 2) posteriormente, se tomó a cada una de las ratas y se dejó caer 10 veces desde la mitad de la altura y 3) finalmente la caja se movió de manera trepidatoria durante un minuto. Para la segunda semana y en adelante, la única modificación consistió en dejar caer a las ratas desde la altura total de la caja.

Durante el transcurso de las 12 o 16 semanas que comprendió el experimento, se valoró la progresión inflamatoria en cada animal, midiendo el grosor de los tobillos (vernier), temperatura, peso, tonicidad muscular y rigidez (nula, leve, moderada y grave). Para probar el efecto de las diferentes proporciones de **Fibroquel^{Cartilage}** en la OA inducida las ratas, se inyectaron 25-50 µl vía supracapsular cada semana durante 4 semanas, previa sedación con Sevoflurane (Sevorane (sevofluorane, ABBOT)).

Las ratas se dividieron en 9 grupos:

- a) **Grupo control:** 3 ratas sin cirugía sometidas a la rutina de ejercicio y sin tratamiento.
- b) **Grupo control quirúrgico:** 6 ratas que se sometieron a cirugía sin meniscectomía (Sham: no se indujo OA) y sin tratamiento.
- c) **Grupo control de toxicidad:** 6 ratas que se sometieron a cirugía sin meniscectomía (Sham: no se indujo OA) y tratadas con el principio activo (PA).
- d) **Grupo control positivo:** 6 ratas con OA tratadas con 25-50 µl del vehículo del PA (Fibroquel^{Cartilage}) a los 20 días post-meniscectomía cada semana durante 4 semanas.
- e) **Grupo tratado con el estándar de oro:** 6 ratas con OA tratadas vía supracapsular con 25-50 µl del Fibroquel^{Cartilage} a los 20 días post-meniscectomía cada semana durante 4 semanas. Tres ratas se sacrificaron una semana después de la última aplicación del tratamiento, mientras que las 3 restantes se sacrificaron 5 semanas después de la última aplicación.
- f) **Grupo de corta evolución tratado con Fibroquel^{Cartilage} (PA1: 1:9):** 6 ratas con OA tratadas vía supracapsular con 25-50 µl del Fibroquel^{Cartilage} a los 20 días post-meniscectomía cada semana durante 4 semanas. Tres ratas se sacrificaron una semana después de la última aplicación del tratamiento, mientras que las 3 restantes se sacrificaron 4 semanas después de la última aplicación.
- g) **Grupo de corta evolución tratado con Fibroquel^{Cartilage} (PA2: 3:7):** 6 ratas con OA tratadas vía supracapsular con 25-50 µl del Fibroquel^{Cartilage} a los 20 días post-meniscectomía cada semana durante 4 semanas. Tres ratas se sacrificaron una semana después de la última aplicación del tratamiento, mientras que las 3 restantes se sacrificaron 4 semanas después de la última aplicación.
- h) **Grupo de corta evolución tratado con Fibroquel^{Cartilage} (PA3: 5:5):** 6 ratas con OA tratadas vía supracapsular con 25-50 µl del Fibroquel^{Cartilage} a los 20 días post-meniscectomía cada semana durante 4 semanas. Tres ratas se sacrificaron una semana después de la última aplicación del tratamiento, mientras que las 3 restantes se sacrificaron 4 semanas después de la última aplicación.
- i) **Grupo de larga evolución tratado con Fibroquel^{Cartilage} proporción de mayor eficacia terapéutica:** 6 ratas con OA tratadas vía supracapsular con 25-50 µl del Fibroquel^{Cartilage} a los 45 días post-meniscectomía cada semana durante 4 semanas. Tres ratas se sacrificaron una semana después de la última aplicación del tratamiento, mientras que las 3 restantes se sacrificaron 4 semanas después de la última aplicación.

Todos los procedimientos se realizaron siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.



Modelo de OA

51 ratas Wistar macho de 130-150g
Meniscectomía parcial pata trasera derecha



Modelo:		Toxicidad	OA Temprana	OA Temprana	OA Temprana	OA Temprana	OA Temprana	OA Temprana	OA larga evolución
Grupo:	Control{}	Control quirúrgico	Sin OA	OA	Estándar de Oro	PA1	PA2	PA3	PA3
No. de animales:	3	5	5	5	5	5	5	5	5
Meniscectomía:	No	No	No	S	S	S	S	S	S
Ejercicio:	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tratamiento:	Ninguno	Ninguno	PA2	Ninguno	Colágeno-PVP	1S	1T	5S	2S
No. de aplicaciones:	0	3	4 (1 ósem)	0	4 (1 ósem)	4 (1 ósem)	4 (1 ósem)	4 (1 ósem)	4 (1 ósem)
Sacrificios (sem):		7, 12 Posdx	7, 12 Posdx	7, 12 Posdx	7, 12 Posdx	7, 12 Posdx	7, 12 Posdx	7, 12 Posdx	12, 14 Posdx

Peso
Temperatura
Grosor
Registro radiográfico
Histología
Inmunofluorescencia

Evaluación radiográfica

Previo al sacrificio se realizó un registro radiográfico para evaluar el espacio articular, la presencia de osteofitos, esclerosis y la integridad de cartílago hialino (1.30 seg de penetración, Aparato de Rayos X marca Tryumph, 25 s de revelado, 25 s agua, 25 s de fijación con Revelador y Fijador AGFA DENTUS Bélgica; Radiografías DENTUS E-speed, intra-oral X-Ray Film, Single Dental Film /3X4 cm/Size2/150X1, AGFA, Bélgica, o 15 s de revelado, 25 s agua, 25 s de fijación con radiografías oclusales).

Obtención de las muestras.

Concluido el tiempo de inducción de OA, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de dióxido de carbono; se obtuvieron los cóndilos femorales de cada grupo y éstos fueron congelados o fijados en paraformaldehído al 4% en PBS para la inmunofluorescencia.

Evaluación histológica

De los animales sacrificados se extrajo el tejido articular de la rodilla para valorar la arquitectura tisular, la celularidad, la pérdida de proteoglicanos y el recambio de la matriz extracelular mediante la tinción con Safranina O. Los tejidos se fijaron en metanol y se cortaron por criocongelación.

Los tejidos se lavaron e hidrataron en PBS por 5 min y en agua por 2 min, se incubaron sucesivamente en una solución de verde rápido (A16520, Cymit, Santander, 42-48, Nave 2 08020, Barcelona) al 0.01% durante 12 min; ácido acético (Sigma-Aldrich, 3050 Spruce street, St Louis, MO, USA) al 1% durante 12 segundos y Safranina O (Santander, 42-48, Nave 2 08020, Barcelona) al 1% en agua durante 40 min. Inmediatamente después los tejidos se deshidrataron en etanol (50%, 70%, 90%, 96% y 100% por 1 min), y xilol (2min) y se montaron con entellan (Merk Darmstadt, Germany).



Inmunofluorescencia

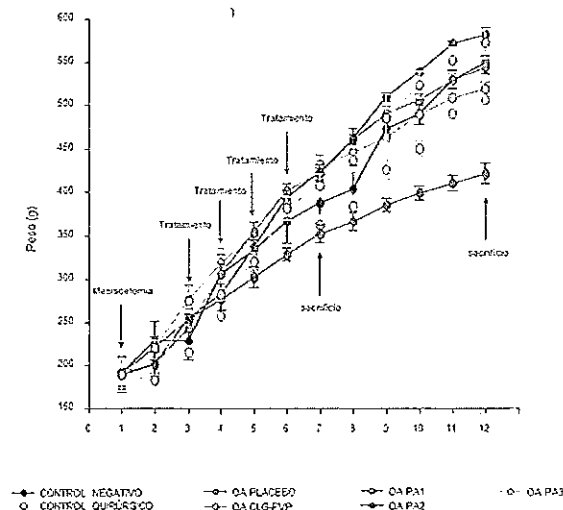
Pasado el tiempo de fijación (24h), las muestras se incluyeron en sacarosa al 10% en PBS como crioprotector (24 h). Con ayuda de un criostato se obtuvieron cortes de 6 μm en laminillas gelatinizadas (gelatina al 5% y sulfato de cromo y potasio al 0.05%; Panreac Química, Barcelona), las cuales fueron almacenadas a 4°C por 2 días antes de ser procesadas para la IF. Los tejidos fueron hidratados con PBS, permeabilizados con PBS-Tween (0.02%) y los sitios de pegado inespecífico fueron bloqueados con albumina libre de IgG al 0.2% en PBS-Tween. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en cada caso (anti-colágena I, anti-colágena II o anti-MMP13, Santa Cruz Biotechnology) toda la noche a 4 °C. Posteriormente los tejidos se incubaron con el anticuerpo secundario-FITC o Cy3 durante una hora a temperatura ambiente y se contratiñeron con yoduro de propidio o DAPI (Sigma Aldrich) para marcar el núcleo. Finalmente las laminillas fueron montadas con Vectashield y analizadas en un microscopio confocal (Leica SP8).

Análisis estadístico de la inmunofluorescencia

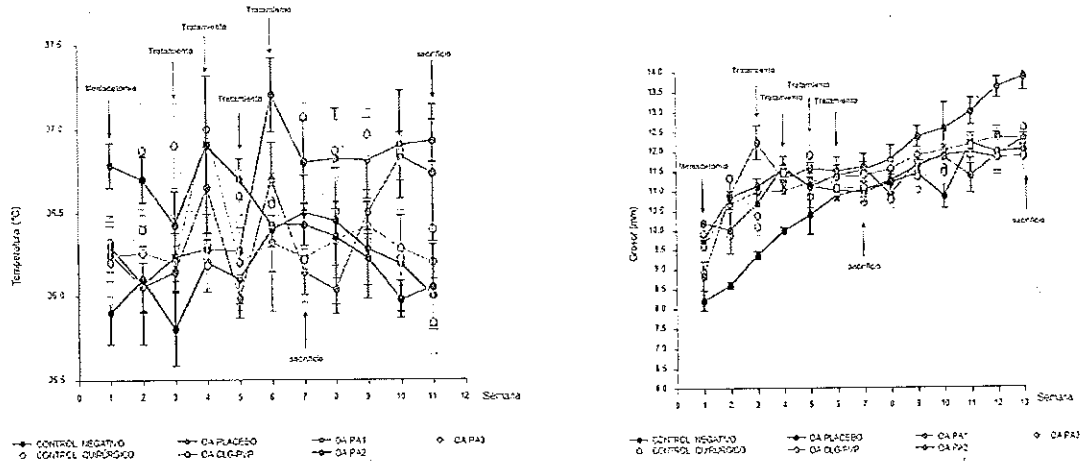
El análisis estadístico se realizó por triplicado. De cada tratamiento se obtuvieron tres cóndilos, de cada cóndilo se usaron tres cortes, donde se eligieron tres zonas por corte y se analizaron a través del programa Las-AF lite de Confocal, considerando el número de pixeles por área (μm) y la zona del cartilago, en cada caso. Posteriormente, el análisis estadístico fue realizado empleando la prueba de Tukey-Kramer.

Resultados

Los grupos de rata que fueron sometidos a meniscectomía y que recibieron los tratamientos presentaron un incremento de peso significativo con respecto al grupo con OA. No se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos, el grupo del control quirúrgico y el grupo control negativo.

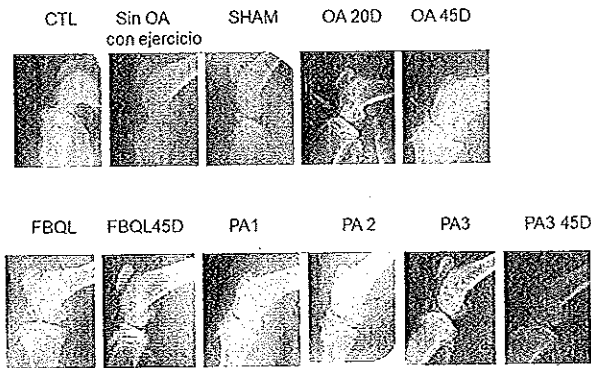


En lo relacionado a la temperatura, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos, el grupo del control quirúrgico, el grupo control negativo y el grupo de OA.



Al evaluar el grosor de la articulación se observó que el grupo de ratas con OA presentó un grosor significativamente mayor en comparación con los grupos de rata que fueron sometidos a meniscectomía y que recibieron los tratamientos, el grupo del control quirúrgico y el grupo control negativo.

La evaluación radiográfica demostró que el grupo de ratas con OA tratadas con el PA3 conservó el espacio articular y el cartílago hialino intacto, semejando una articulación normal, seguido del Fibroquel (colágena-PVP), el PA2 y PA1.



CTL: control sin meniscectomía y sin ejercicio; SHAM: control quirúrgico con ejercicio; PA-1: principio activo 1 (Fibroquel 9 partes/matricinas 1 parte) al día 20 post-meniscectomía; PA-2: principio activo 2 (Fibroquel 7 partes/matricinas 3 partes) al día 20 post-meniscectomía; PA-3: principio activo 3 (Fibroquel 5 partes/matricinas 5 partes) al día 20 post-meniscectomía; FIBROQUEL: Fibroquel al día 20 post-meniscectomía, OA; Osteoartritis al día 20 post-meniscectomía; PA-3: principio activo 3 (Fibroquel 5 partes/matricinas 5 partes) al día 45 post-meniscectomía.

GUÍA PARA LA PRESENTACIÓN DEL REPORTE FINAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

SALUD

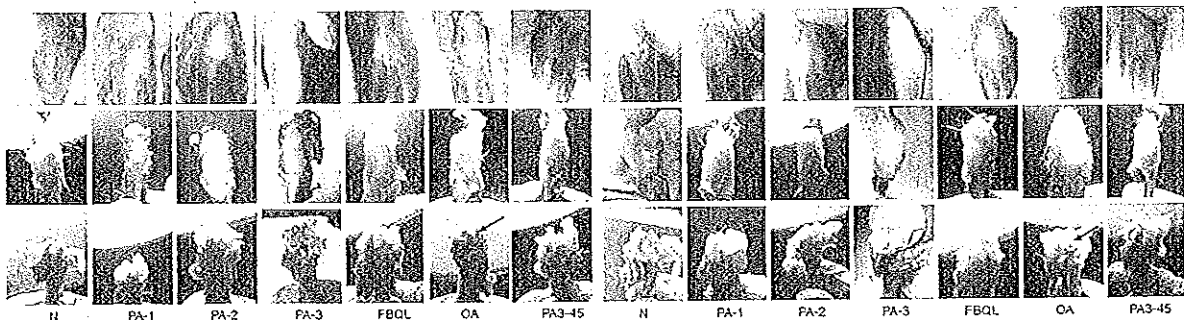
SECRETARÍA DE SALUD



El análisis macroscópico de las articulaciones mostró que el cartílago de las ratas con OA se encontraba reblandecido, con fibrilación, ulceraciones y en muchas ocasiones ausente, con esclerosis y eburneación del hueso subcondral. Mientras que los diversos tratamientos, fueron condroprotectores manteniendo en la mayoría de los casos el espacio articular y la integridad del cartílago. El mejor tratamiento fue el del PA-3 a los días 20 y 45, seguido del Fibroquel (colágena-PVP).

Izquierda (sin menisectomía)

Derecha (con menisectomía)



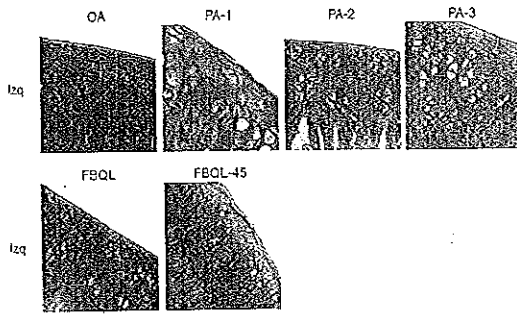
N: sin menisectomía y con ejercicio; PA-1: principio activo 1 (Fibroquel 9 partes/matricinas 1 parte) al día 20 post-menisectomía; PA-2: principio activo 2 (Fibroquel 7 partes/matricinas 3 partes) al día 20 post-menisectomía; PA-3: principio activo 3 (Fibroquel 5 partes/matricinas 5 partes) al día 20 post-menisectomía; FIBROQUEL: Fibroquel al día 20 post-menisectomía, OA; Osteoartritis al día 20 post-menisectomía; PA-3: principio activo 3 (Fibroquel 5 partes/matricinas 5 partes) al día 45 post-menisectomía.

De los animales sacrificados se extrajo el tejido articular para valorar la arquitectura tisular, la inflamación y el grado de pérdida de cartílago articular a través de la tinción de Safranina O. El cartílago articular en condiciones normales, está dividido en tres, la primera es la denominada zona superficial (ZS), la cual incluye las primeras dos filas de células más cercanas a la superficie del cartílago y se caracteriza por contener células alargadas únicas o en grupos de dos, las cuales cubren aproximadamente del 10-15% del tejido. A continuación, se encuentra la zona media (ZM), la cual constituye aproximadamente del 70 al 80% del tejido; se encuentra localizada en la parte central del cartílago y se caracteriza por la presencia de conjuntos de 2 a 4 células circulares cercanas entre sí. Finalmente, la zona profunda (ZP), está constituida por una fila de células hipertróficas, cercanas al hueso subcondral que no presentan una forma definida. La disminución del color rojo indica la pérdida de proteoglicanos.

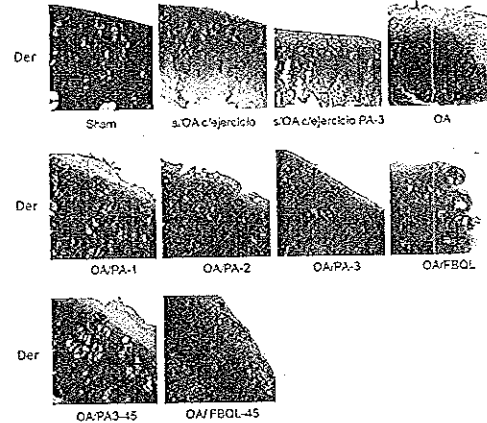
Los tejidos de las ratas tratadas con Fibroquel (colágena-PVP) y el PA3 a 20 y 45-días (4 semanas post-tratamiento) fueron los más efectivos para conservar la integridad de las diferentes capas del cartílago así como la proporción de los proteoglicanos a una concentración semejante al cartílago normal.



Tinción con Safranina

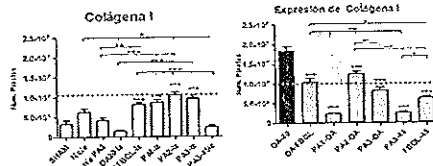


Tinción con Safranina

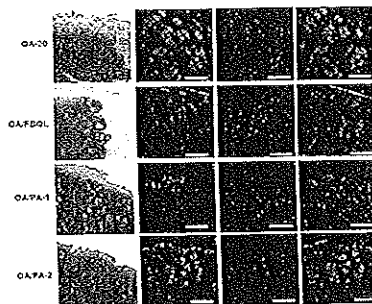
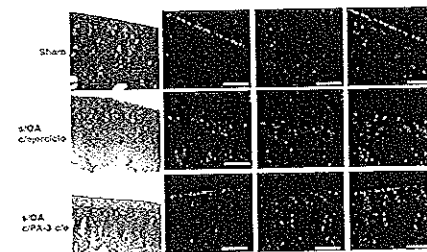


Izq: pata izquierda sin meniscectomía; Der: pata derecha con meniscectomía; s/OA c/ejercicio: sin meniscectomía y con ejercicio; s/OA c/ejercicio PA-3: sin meniscectomía y con ejercicio tratadas con el principio activo; PA-1: principio activo 1 (Fibroquel 9 partes/matricinas 1 parte) al día 20 post-meniscectomía; PA-2: principio activo 2 (Fibroquel 7 partes/matricinas 3 partes) al día 20 post-meniscectomía; PA-3: principio activo 3 (Fibroquel 5 partes/matricinas 5 partes) al día 20 post-meniscectomía; FIBROQUEL: Fibroquel al día 20 post-meniscectomía, OA; Osteoartritis al día 20 post-meniscectomía; PA-3: principio activo 3 (Fibroquel 5 partes/matricinas 5 partes) al día 45 post-meniscectomía.

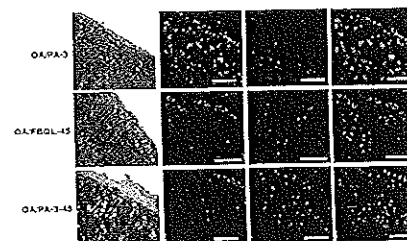
El recambio de la matriz extracelular (colágena tipo I) se evaluó por inmunofluorescencia (microscopía confocal). Los tejidos de las ratas tratadas con Fibroquel y PA3 a 45 días (4 semanas post-tratamiento) mantuvieron un bajo porcentaje de colágena tipo I (componente principal del cartílago fibroso fibrocartilago) en comparación con el de PA2 y el de OA.



Colágena I



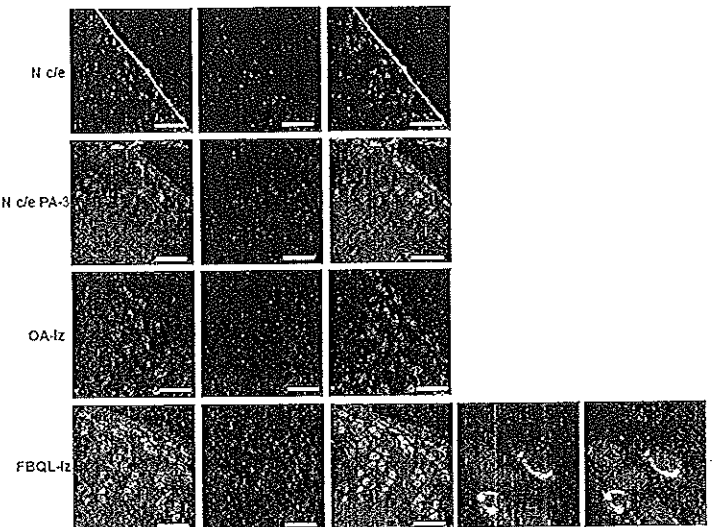
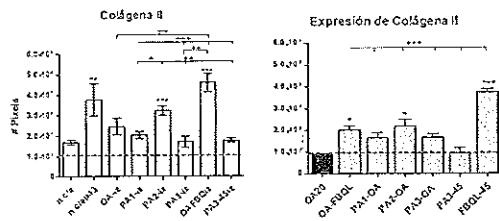
Colágena I



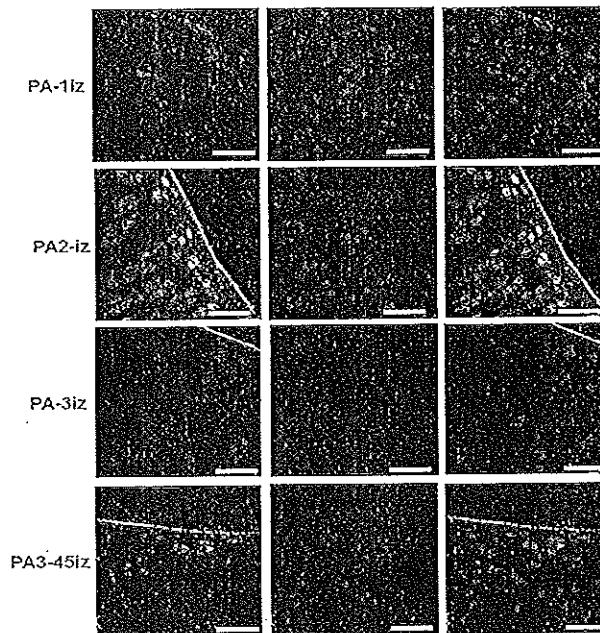


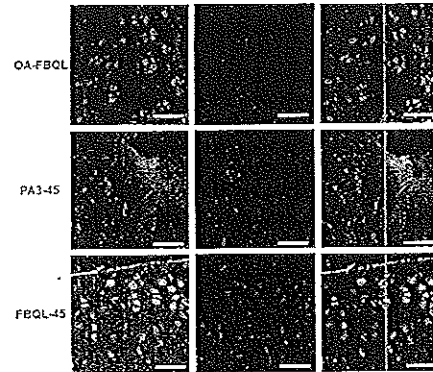
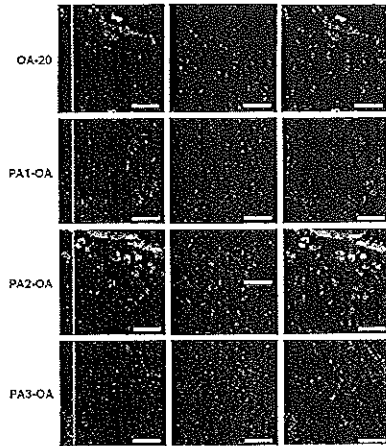
Los tejidos de las ratas tratadas con Fibroquel y PA3 a 20 y 45 días (4 semanas post-tratamiento) fueron los más efectivos induciendo la síntesis de colágeno tipo II por los condrocitos (componente principal del cartilago hialino).

Colágeno II

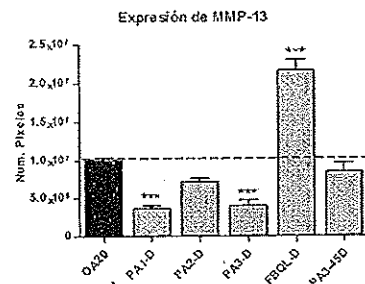
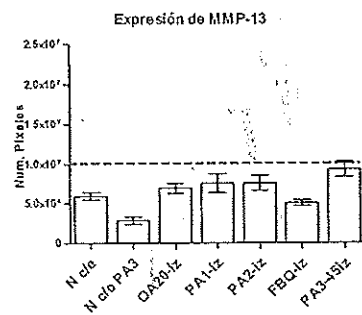


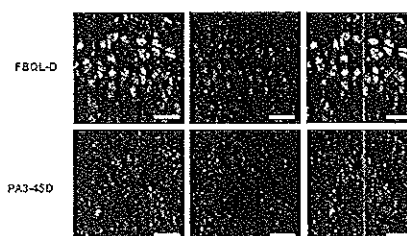
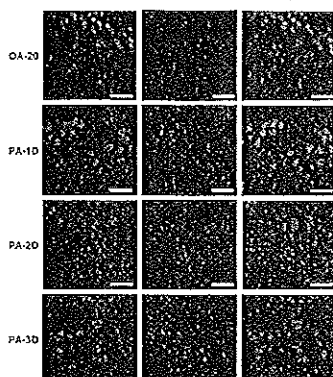
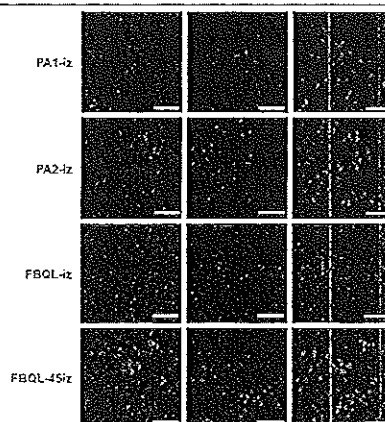
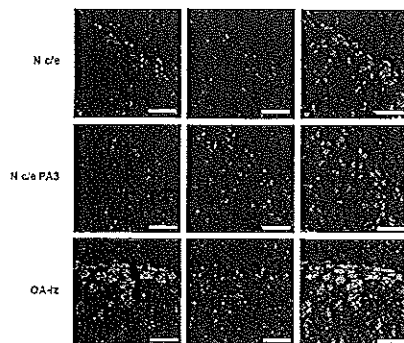
Colagéna II





Los tejidos de las ratas tratadas con Fibroquel un mayor número de condrocitos productores de MMP-13 (colagenasa específica para degradar colágena tipo II) en comparación con el PA3, el PA2 y el PA1.





Discusión

El presente trabajo de investigación cumplió con los objetivos propuestos al evaluar clínicamente, histológicamente y molecularmente el efecto de Fibroquel^{Cartilage} en un modelo de rata de OA, determinándose que el PA3 fue el tratamiento más efectivo para modificar la progresión de la OA, en la condroprotección/regeneración del cartilago hialino y en la innocuidad (como se determinó en el modelo de toxicidad). En la evaluación clínica, solamente el peso y el grosor de la articulación mostraron diferencias significativas, no así las mediciones de temperatura, tonicidad muscular y rigidez. El peso fue mayor en el grupo de ratas que fue sometida a meniscectomía y que recibieron los tratamientos. Por otro lado, el grupo que presento un mayor grosor en la articulación fue el grupo de ratas con OA. Por consiguiente, esto sugiere que al haber un incremento en el peso de las ratas con tratamiento hay una regulación hacia la disminución del proceso inflamatorio que se ve reflejado de manera sistémica en la capacidad del animal de desplazarse para alimentarse y del bienestar general que conllevan a una ganancia de peso; lo anterior, es reforzado por el hecho de que los grupos de ratas con tratamiento tuvieron menor grosor en la articulación en comparación con el grupo de ratas con OA, demostrando el efecto regulador de la colágena polimerizada tipo I sobre la inflamación y su papel como inductor de la reparación/regeneración tisular.

La evaluación histológica demostró que la concentración más efectiva al mejorar la integridad del cartilago y proporción de proteoglicanos es la de Fibroquel y PA3 a 45 días. Lo cual sugiere que se está modificando el curso y comportamiento de la inflamación de la manera local y sistémica así como el



recambio de la matriz extracelular hacia un estado de conservación de la estructura tisular, semejando una articulación normal.

Por último la evaluación molecular confirmó los resultados obtenidos histológicamente, al demostrar la misma concentración de FIBROQUEL y PA3 como la más efectiva, esto por medio de inmunofluorescencia al encontrarse que mantenían un bajo porcentaje de colágena tipo I y de MMP-13 e incrementaban el porcentaje de condrocitos productores de colágena tipo II.

Conclusiones

En conclusión, el presente trabajo demuestra el beneficio que tiene tratamiento PA3 sobre el de Fibroquel como tratamiento en la modificación de la progresión de la osteoartritis en un modelo de rata, así como la proporción óptima para el mismo. Lo anterior, es importante debido a la falta de tratamientos que existen para tratar esta enfermedad, a la necesidad de generar medicamentos condroprotectores e inductores de la regeneración tisular y a la alta incidencia/prevalencia de la enfermedad. Por último, consideramos que estudios piloto fase I deberán de ser implementados para continuar con la línea de investigación y determinar la seguridad y eficacia de este principio activo.

Bibliografía

1. Almazán Díaz A, de la Cruz García JC, Lira Romero JM, et al. Investigación experimental de la regeneración ósea en fémures de rata después de la aplicación de colágena I polimerizada: Estudio radiológico, histológico e inmunohistoquímico. *Rev Mex. Ortop Traum* 1996;10:142-52.
2. Almonte-Becerril M, Navarro-García F, González-Robles A, Vega-López MA, Lavalle C, Kouri JB. Cell death of chondrocytes is a combination between apoptosis and autophagy during the pathogenesis of Osteoarthritis within an experimental model. *Apoptosis* 2010;15:631-638.
3. Arroyo AG, Iruela-Arispe M. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovasc Res* 2010.
4. Bauer K, Knipper A, Tu-Rapp H, et al. Perforin deficiency attenuates collagen-induced arthritis. *Arthritis Research* 2005;7:877-84.
5. Bellon G, Martiny L, Robinet A. Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:203-20.
6. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nature protocols* 2007;2:1269-75.
7. Chimal-Monroy J, Bravo-Ruiz T, Krötzsch-Gómez FE, Díaz de León L. Implantes de Fibroquel aceleran la formación de hueso nuevo en defectos óseos inducidos experimentalmente en cráneos de rata: un estudio histológico. *Rev Biomed* 1997;8:81-8.
8. Chimal-Monroy J, Bravo-Ruiz T, Furuzawa-Carballeda GJ, et al. Collagen-PVP accelerates new bone formation of experimentally induced bone defects in rat skull and promotes the expression of osteopontin and SPARC during bone repair of rat femora fractures. *Ann NY Acad Sci* 1998;857:232-6.
9. Duca L, Debelle L, Debret R, Antonicelli F, Hornebec W, Haye B. The elastin peptides-mediated induction of pro-collagenase-1 production by human fibroblasts involves activation of MEK/ERK pathway via PKA- and PI(3)K-dependent signaling. *FEBS Lett* 2002;524:193-8.
10. Duca L, Floquet N, Alix AJ, Haye B, Debelle L. Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:235-44.
11. Dzhambazov B, Nadakumar K S, Kihlberg J. Therapeutic Vaccination of Active Arthritis with a Glycosylated Collagen Type II I Complex with MHC Class II Molecules. *J Immunol* 2006;176:1525-33.
12. Furuzawa-Carballeda J, Alcocer-Varela J. Interleukin-8, Interleukin-10, Intracellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression Levels are higher in Synovial Tissue from patients with Rheumatoid Arthritis than in Osteoarthritis. *Scand J Immunol* 1999;50:215-22.
13. Furuzawa-Carballeda J, Alcocer-Varela J, Diaz de León L. Collagen-PVP decreases collagen turnover in synovial tissue cultures from rheumatoid arthritis patients. *Ann NY Acad Sci* 1999;878:508-.



602.

14. Furuzawa-Carballeda J, Alcocer-Varela J, Díaz de León L. Mediators of inflammation are down-regulated meanwhile apoptosis is up-regulated in rheumatoid arthritis synovial tissue by polymerized-collagen. *Clin Exp Immunol* 2002;130:140-9.

15. Furuzawa-Carballeda J, Cabral AR, Zapata-Zúñiga M, Alcocer-Varela J. Subcutaneous administration of polymerized-type I collagen for the treatment of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003;30:256-9. Página 30.

16. Furuzawa-Carballeda J, Rojas E, Valverde M, Castillo I, Díaz de León L, Kröttsch-Gómez FE. Cellular and humoral responses to collagen-polyvinylpyrrolidone administered during short and long periods in humans. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:1029-35.

17. Furuzawa-Carballeda J, Kröttsch-Gómez FE, Espinosa-Morales R, Alcalá M, Barile-Fabris L. Subcutaneous administration of collagen-polyvinylpyrrolidone down-regulates IL-1beta, TNF- alpha, TGF-beta1, ELAM-1 and VCAM-1 expression in scleroderma skin lesions. *Clin Exp Dermatol* 2005;30:83-6.

18. Furuzawa-Carballeda J, Fenutria-Ausmequet R, Gil-Espinosa V, Lozano-Soto F, Teliz-Meneses MA, Romero-Trejo C, Alcocer-Varela J. Polymerized-type I collagen for the treatment of patients with rheumatoid arthritis. Effect of intramuscular administration in a double blind placebo-controlled clinical trial. *Clin Exp Rheumatol* 2006;24:521-8.

19. Furuzawa-Carballeda J, Macip-Rodríguez PM, Cabral AR. Osteoarthritis and rheumatoid arthritis pannus have similar qualitative metabolic characteristics and pro-inflammatory cytokine response. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:554-60.

20. Furuzawa-Carballeda J, Muñoz-Chable OA, Barrios-Payán J, Hernández-Pando R. Effect of Polymerized-Type I Collagen in knee osteoarthritis. I. In vitro Study. *Eur J Clin Invest* 2009;39:591-7.

21. Furuzawa-Carballeda J, Muñoz-Chable OA, Macías-Hernández SI, Agualimpia-Jannig A. Effect of Polymerized-Type I Collagen in knee osteoarthritis. II. In vivo Study. *Eur J Clin Invest* 2009;39:598-606.

22. Furuzawa-Carballeda J, Lima G, Uribe-Uribe N, Ávila-Casado C, Mancilla E, Morales-Buenrostro LE, Pérez-Garrido J, Pérez M, Cárdenas G, Llorente L, Alberú J. High levels of IDO-expressing CD16+ peripheral cells, and Tregs in graft biopsies from kidney transplant recipients under Belatacept treatment. *Transplantation Proceedings*, 2010;42:3489-96.

23. Furuzawa-Carballeda J, Lima G, Jakez-Ocampo J, Llorente L. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-expressing peripheral cells in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. *Eur J Clin Invest*, 2011;41:1037-46.

24. Furuzawa-Carballeda J, Macip-Rodríguez P, Galindo-Feria AS, Cruz-Robles D, Soto-Abraham V, Escobar-Hernández S, Aguilar D, Alpizar-Rodríguez D, Férrez-Blando K, Llorente L. Polymerized-Type I Collagen induces Up-Regulation of Foxp3-expressing CD4 regulatory T cells and Down-Regulation of IL-17-producing CD4+ T cells (Th17) cells in collagen-induced arthritis. *Clin Develop Immunol*, 2012;2012:618608, 11 pages.

25. Furuzawa-Carballeda J, Macip-Rodríguez PM, Cruz-Robles D, Soto-Abraham V, Vargas-Rojas MI, Díaz-Zamudio M, Godina-González S, Alpizar-Rodríguez D, Limón-Camacho L, Escobar-Hernández S. Anti Inflammatory effect of polymerized type I Collagen (Polymerized-IClg) vs. other modified extracellular matrix proteins (MECMPs) in CIA. *Int Proc Div Immunol*, 2007;269-75. ISBN 978-88-7587-380-6.

26. Griffiths MM, Eichwald EJ, Martin JG, Smith CB, De Witt CW. Immunogenetic control of experimental type II collagen-induced-arthritis. I. Susceptibility and resistance among inbred strains of rats. *Arthritis Rheum* 1988;24:781-9.

27. Holmdahl R, Andersson M, Goldschmidt TJ, Gustafsson K et al. Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis. *Immunol Rev* 1990;118:193-232. Página 31.

28. Kourí-Flores JB, Abbud-Lozoya KA. Kinetics of the ultrastructural changes in apoptotic chondrocytes from an Osteoarthrosis rat model: a window of comparison to the cellular mechanism of apoptosis in human chondrocytes. *Ultrastructural Pathol* 2002;26:33-40.

29. Kourí JB, Rosales-Encinas JL, Chaudhuri PP, Luna J, Mena R. Apoptosis in human osteoarthritic cartilage: a microscopy report. *Med Sci Res* 1997;25:245-248.

30. Kwoh C, Anderson LG, Greene MJ. Guidelines for Management of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:328-46.

GUÍA PARA LA PRESENTACIÓN DEL REPORTE
FINAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



31. Kremers HM, Nicola P, Crowson CS. Therapeutic Strategies in Rheumatoid Arthritis Over a 40- year period. *J Rheumatol* 2004;31: 2366-73.
 32. Krötzsch-Gómez FE, Furuzawa-Carballeda J, Reyes Márquez R, et al. Cytokine expression is down regulated by collagen-polyvinilpyrrolidone in hypertrophic scars. *J Invest Dermatol* 1998;111:828-34.
 33. Lange F, Bajtner E, Rintisch C. Methotrexate ameliorates T cell dependent autoimmune arthritis and encephalomyelitis but not antibody induced or fibroblast induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:599-605.
 34. Maquart FX, Pasco S, Ramont L, Hornebeck W, Monboisse J-C. An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity implication in tumor invasion. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:199-202.
 35. Maquart FX, Bellon G, Pasco S. Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie* 2004;87:353-9.
 36. May E, Dorris ML, Satumtira N, Iqbal I, Rehman MI, Lightfoot E, Taurog JD. CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats. *J Immunol* 2003;170:1099-105.
 37. Norma Oficial Mexicana -NOM-062-Z00-199. Especificaciones de técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
 38. Pasco S, Ramont L, Maquart FX, Monboisse JC. Control of melanoma progresión by various matrikines from basement membrane macromolecules. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:221-33.
 39. Robinet A, Fahem A, Cauchard J-H, Huet E, Vincent L, Lorimier S, Antonicelli F, Sorie C, Crepin M, Hornebeck W, Bellon G. Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP. *J Cell Sci* 2005;118:343-56.
 40. Robinet A, Millart H, Oszust F, Hornebeck W, Bellon G. Binding of elastin peptides to S-Gal protects the heart against ischemia/reperfusion injury by triggering the RISK pathway. *FASEB J* 2007;21:1968-78.
 41. Solinger AM, Stobo JD. Regulation of immune reactivity to collagen in human beings. *Arthritis Rheum* 1981;24:1057-64.
 42. Shultz GS, Wysocki A. interactions between extracellular matrix and growth factor in wound healing. *Wound Rep Reg* 2009;17:153-62.
 43. Sukar S, Tesmer LA, Fox A et al. Interleukin-17 as a Moleculat Target in Immune- Mediated Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 2007;56:89-100.
 44. Stuart JM, Watson WC, Kang AH. Collagen autoimmunity and arthritis. *FASEB J* 1988;2:2950-6.
 45. Thompson HSG, Staines NA. Gastric Administration of Type II Collagen Delays the Onset and Severity of Collagen-Induced Arthritis in Rats. *Clin Exp Immunol* 1985;64:581-6.
- Página 32
46. Tran KT, Lamb P, Deng JS. Matrikines and matricryptins: Implications for cutaneous cancers and skin repair. *J Dermatol Scie* 2005;40:11-20.
 47. Trentham DE, Dynesius-Trentham RA, Orav EJ, et al. Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. *Science* 1993;261:1727-30.
 48. Tyagi SC, Simon SR. Regulation of neutrophil elastasa activity by elastin-derived peptide. *J Biol Chem* 1993;268:16513-8.

4.3 **Apéndices** (se podrán adjuntar archivos de instrumentos, fotografías o cualquier documento importante en la investigación y/o de las actividades desarrolladas por el alumno)

GUÍA PARA LA PRESENTACIÓN DEL REPORTE
FINAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



(incluya aquí los apéndices correspondientes –si se requiere texto– conserve el formato, con letra arial 10 puntos, justificado)

V. PRODUCTOS DERIVADOS DE LA INVESTIGACIÓN

5.1 Documentos elaborados (anotar las citas completas)	
5.1.1	
5.1.2	
5.1.3	
5.1.4	
5.1.5	

5.2 Actividades de capacitación recibidas (anotar el nombre de la actividad, la duración, el lugar donde se realizó y la fecha)	
5.2.1	
5.2.2	
5.2.3	
5.2.4	
5.2.5	

5.3 Presentación en Congresos (anotar los datos completos del trabajo, el nombre del Congreso, el lugar donde se realizó y la fecha)	
5.3.1	
5.3.2	
5.3.3	
5.3.4	
5.3.5	

VI. FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS DERIVADOS DE LA INVESTIGACIÓN

6.1 Tesis concluidas:	
------------------------------	--

GUÍA PARA LA PRESENTACIÓN DEL REPORTE
FINAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD



Título		Nivel académico
6.1.1		<input type="checkbox"/> Licenciatura <input type="checkbox"/> Especialidad <input type="checkbox"/> Maestría <input type="checkbox"/> Doctorado <input type="checkbox"/> Otra (especificar)
6.1.2		<input type="checkbox"/> Licenciatura <input type="checkbox"/> Especialidad <input type="checkbox"/> Maestría <input type="checkbox"/> Doctorado <input type="checkbox"/> Otra (especificar)
6.1.3		<input type="checkbox"/> Licenciatura <input type="checkbox"/> Especialidad <input type="checkbox"/> Maestría <input type="checkbox"/> Doctorado <input type="checkbox"/> Otra (especificar)

6.2	Número de otros pasantes:	1
-----	---------------------------	---

6.3	Número de otros becarios:	0
-----	---------------------------	---

Vo. Bo.

Yeraldín Esquivel Alvarez

(Nombre y firma del alumno)

Guadalupe Janette Furuzawa Carballeda

(Nombre y firma del tutor responsable)

GUÍA PARA LA PRESENTACIÓN DEL REPORTE
FINAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

México, D.F., 19 de junio de 2015

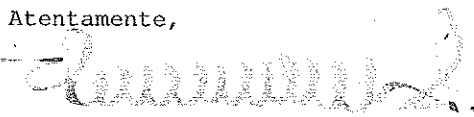
DE/RA/252/15

A quien corresponda:

Por este conducto hago constar que la Pasante de Servicio Social **Yeraldín Esquivel Alvarez** de la Licenciatura en Medicina, se encuentra llevando a cabo el **Curso de Metodología en Investigación** en este Instituto, el cual cubrirá un total de 40 horas.

Se extiende la presente a petición de la interesada, y para los fines que estime convenientes.

Atentamente,


Dr. Rodolfo Rincón Pedrero
Jefe del Depto. de Educación Médica
Dirección de Enseñanza



INCIMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
DR. "SALVADOR ZUBIRÁN"
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA
México, D.F.

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Dominguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incimnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

25 de Abril de 2017

A quien corresponda,

Por medio de la presente certifico que entrego:

La forma única de registro completa con firmas del proyecto con Núm. De
Ref: **CINVA- IRE-585-12**

1. Protocolo en extenso
2. Forma única de registro con firmas
3. Carta de Cierre
4. Informe final
5. **FAEP (no se anexa pues no existe)**

Saludos cordiales,

Dra. Janette Furuzawa Carballada

Departamento de Inmunología y Reumatología.



FICHA PÚBLICA DEL PROYECTO

PROGRAMA DE ESTÍMULOS A LA INNOVACIÓN



CONACYT
CONACYT

NUMERO DE PROYECTO: 178005

TÍTULO DEL PROYECTO: Determinación del mecanismo y posología del Matrikel en un modelo de CIA



FICHA PÚBLICA DEL PROYECTO



CONACYT
40 AÑOS

PROGRAMA DE ESTÍMULOS A LA INNOVACIÓN

OBJETIVO DEL PROYECTO: Evaluar si la aplicación subcutánea dorsal del Matrikel era capaz de modificar la progresión de la artritis inducida por inyección de colágena en roedores. El efecto se determinó a nivel clínico, histológico y molecular comparando los resultados con el tratamiento estándar de oro: el Metotrexato.

PRINCIPALES ACTIVIDADES REALIZADAS: Se determinó la proporción de matrices con colágena polimerizada tipo I (Matrikel) que tuvo el mejor efecto terapéutico para modificar la progresión de la artritis inducida por inyección de colágena a través de la evaluación: (a) Clínica (disminución en el grosor de la pata, peso, temperatura, grado de artritis, etc.), (b) la arquitectura tisular de la cavidad articular y las modificaciones de la matriz extracelular de los ratones con CIA, (c) la disminución de la IL-17A, y el incremento de IL-10, Foxp3 e IDO, en el tejido articular y (d) la disminución de la frecuencia de células Th1, Th2, Th17 totales, Tregs en el bazo de los ratones.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO: Los ratones tratados con Matrikel o con colágena polimerizada mostraron una mejoría clínica importante. El análisis clínico-morfológico mostró que el mejor tratamiento fue el del Matrikel, seguido de la colágena polimerizada tipo I, después el de colágena polimerizada tipo I con metotrexato y finalmente el de metotrexato como monoterapia ($p \leq 0.05$). El Matrikel indujo la regulación negativa de células Th17 y positiva de las Treg. El mecanismo de acción parece estar directamente relacionado con la regulación del factor de transcripción NF- κ B.

RESULTADOS DEL PROYECTO: El Matrikel ejerció un efecto regulador de la inflamación inhibiendo el daño articular en el modelo de CIA sin producir eventos adversos. Los resultados anteriores sugieren que esta molécula podría actuar como tolerígeno a nivel periférico.

IMPACTOS DEL PROYECTO:
Impacto científico: Se determinó la eficacia de un compuesto biotecnológico nuevo y su posible participación como un tolerígeno periférico.
Impacto tecnológico: Se obtuvo un fármaco de molécula nueva derivado del desarrollo biotecnológico, de composición y propiedades farmacológicas únicas, potencialmente benéfico para el tratamiento de AR y otras enfermedades inflamatorias.
Impacto económico: El Matrikel podría ser administrado a toda la población que lo requiriese, sin menoscabar el presupuesto destinado al sector salud para el tratamiento de la AR y otras enfermedades inflamatorias.
Impacto social: La administración de Matrikel produciría un impacto social al evitar la discapacidad física que afecta a los pacientes con AR y en consecuencia repercutiría favorablemente en el mercado laboral y productivo del país.

México D.F., 30 de Agosto de 2012

Estimado Dr. Hernández González,

En respuesta a su carta recibida el 06 de Agosto y para dar curso al registro del protocolo se enumeran a continuación las justificaciones a las cuestiones solicitadas:

1. Explicar y justificar por métodos estadísticos el tamaño de la muestra

Éste se calculo en función de la fórmula de razón de proporciones, tomando en cuenta los resultados obtenidos en el trabajo previo.

Hindawi Publishing Corporation
Clinical and Developmental Immunology
Volume 2012, Article ID 618608, 11 pages
doi:10.1155/2012/618608

Research Article

Polymerized-Type I Collagen Induces Upregulation of Foxp3-Expressing CD4 Regulatory T Cells and Downregulation of IL-17-Producing CD4⁺ T Cells (Th17) Cells in Collagen-Induced Arthritis

Janette Furuzawa-Carballeda,¹ Perla Macip-Rodríguez,¹ Angeles S. Galindo-Peria,¹
David Cruz-Robles,² Virginia Soto-Abraham,² Sergio Escobar-Hernández,² Diana Aguilar,³
Deshiré Alpizar-Rodríguez,¹ Karen Férrez-Blando,¹ and Luis Llorente¹

¹Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, Colonia Sección XVI, Tlalpan, 14000 Mexico City, DF, Mexico

²Department of Pathology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano No. 1, Colonia Sección XVI, Tlalpan, 14080 Mexico City, DF, Mexico

³Department of Experimental Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, Colonia Sección XVI, Tlalpan, 14000 Mexico City, DF, Mexico

$$N = \left[\sqrt{\{pq(1 + 1/k)\} \times z_{1-\alpha/2}} + \sqrt{\{p_1q_1 + p_2q_2/k\} \times z_{1-\beta}} \right]^2 / \Delta^2$$

Donde $\alpha = 0.05$ y $1-\beta = 0.80$

La *N* obtenida fue de 7 animales por grupo y se incluyeron 3 más considerando un 25% de pérdidas.

2. Se asegura que no se requiere restricción de los animales pero se indica que se realizará administración de sustancia por la vena lateral de la cola, corregir o explicar el procedimiento.

La aplicación de los medicamentos será vía subdorsal y no por la vena lateral de la cola, por lo que no se requiere de ninguna restricción, sin embargo la administración se llevará a cabo dentro de la campana de flujo laminar.

3. Se describe que los animales sufrirán dolor, presentar tipo de analgésico, dosis y vía de administración durante el estudio.

Los animales no recibirán analgésicos, ya que el estudio contempla evaluar la hiperalgesia por medios térmicos.

4. Se asegura que los animales no sufrirán dolor innecesario pero no se presentan parámetros claros para identificar caquexia, ni escalas de inmovilidad o indicadores de dolor.

Los animales serán sometidos a evaluaciones semanales de temperatura en las que se determinará la presencia de fiebre, la pérdida de peso mayor al 20%, la anquilosis evaluada con escalas clinimétricas y la hiperalgesia por métodos calóricos. Lo anterior permitirá definir el momento en el que deberá sacrificarse al animal para evitar el sufrimiento innecesario (fiebre, pérdida de peso mayor al 20%, anquilosis e hiperalgesia).

- [3] D. D. Brand, A. H. Kang, and E. F. Rosloniec, "The mouse model of collagen-induced arthritis," *Methods in molecular medicine*, vol. 102, pp. 295–312, 2004.

2.3. *Evaluation of Arthritis Severity in Mice with CIA.* The severity of arthritis was measured by scoring each limb from 0 to 4 grades and by summing up the scores of four limbs: 0 = normal; 1 = erythema or swelling of one or several digits; 2 = erythema and moderate swelling extending from the ankle to the mid-foot (tarsals); 3 = erythema and severe swelling extending from the ankle to the metatarsal joints; 4 = complete erythema and swelling encompassing the ankle, foot, and digits, resulting in deformity and/or ankylosis. The maximum score for each animal is thus 16 [3]. Paw edema in each animal was measured with a vernier (Mitutoyo America Co.). All the evaluations were made by the same observer.

5. No se indica el método de eutanasia.

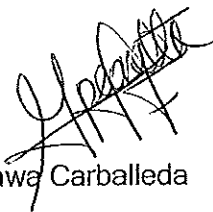
El método de la eutanasia será en cámara de CO₂.

6. La carta compromiso de los investigadores carece de firmal.

Se anexa documento.

De antemano agradezco la atención que se sirva prestar a la presente.

Saludos cordiales,



Dra. Janette Furuzawa Carballeda

Investigadora en Ciencias Médicas

Departamento de Inmunología y Reumatología

Ext. 2600

PS. Se anexa copia y original de la documentación requerida

Determinación del mecanismo y posología del Matrikel en un modelo de CIA

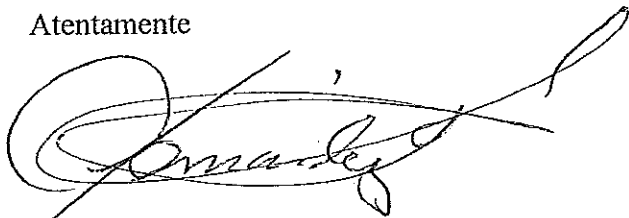
El protocolo fue evaluado en el mes de febrero y se encuentra como: PENDIENTE

Por las siguientes razones:

Material y método

1. Explicar y justificar por métodos estadísticos el tamaño de muestra.
2. Se asegura que no se requiere restricción de los animales pero se indica que se realizará administración de sustancias por la vena lateral de la cola, corregir o explicar procedimiento.
3. Se describe que los animales sufrirán dolor, presentar tipo de analgésico, dosis y vía de administración durante el estudio.
4. Se asegura que los animales no sufrirán dolor innecesario pero no se presentan parámetros claros para identificar caquexia, ni escalas de inmovilidad o indicadores de dolor.
Por ejemplo: Pérdida de peso mayor al 20% del peso corporal comparado con el inicio del estudio.
5. No se indica el método de eutanasia.
6. La carta compromiso de lo investigadores carece de firmas.

Atentamente



M.Sc. Rafael Hernández González
Coordinador de la Comisión de Investigación en Animales.

E-Villalobos

Fondo C0003
Solicitud 000000000178005
Convocatoria C0003-2012-01
Modalidad A1 INNOVAPYME



Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

PRODUCTOS E INDICADORES

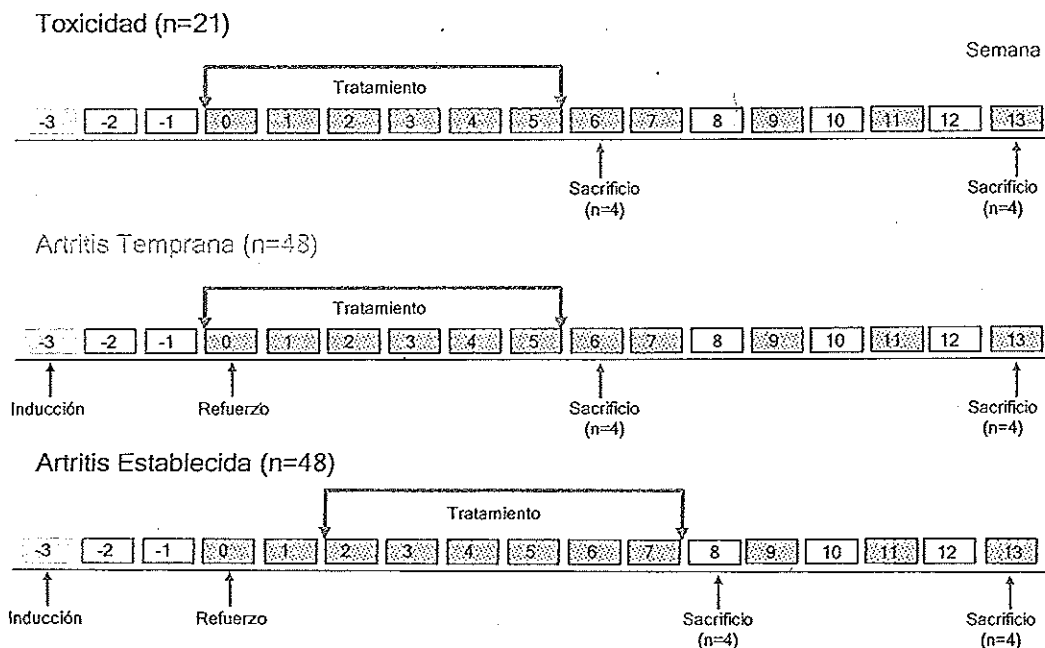
Objetivo Principal. Se evaluó si la aplicación subcutánea dorsal de la mezcla de matricinas (elastocinas y las colagenocinas) con la colágena polimerizada tipo I (Matrikel) era capaz de prevenir el establecimiento, o la progresión de la artritis inducida por inyección de colágena en roedores ratones machos de la cepa DBA1/OlaHsd de 8 semanas de edad (CIA). El efecto se determinó a nivel clínico, histológico y molecular comparando los resultados con el tratamiento estándar de oro: el Metotrexato.

Objetivos secundarios. Se determinó:

- Clínicamente, la eficacia terapéutica de la mezcla de matricinas con la colágena polimerizada tipo I (grosor de la patas, peso, temperatura, grado de artritis, etc).
- Histológicamente, la arquitectura tisular de la cavidad articular y las modificaciones de la matriz extracelular en la articulación de los ratones con CIA.
- Inmunoquímica, se determinó la presencia de IL-17A en el tejido de la cavidad articular.
- Citométricamente la presencia de células CD4⁺/IL-17A⁺, CD4⁺/IL-4⁺, CD4⁺/IFN- γ ⁺, CD4⁺/CD127⁺/FOXP3⁺ y CD4⁺/IFN- γ ⁺/IL-17⁺ en esplenocitos.

Metodología. El trabajo contempló tres modelos diferentes:

Metodología. Modelos de evaluación



- (a) Toxicidad, en la que se emplearon 21 animales sin CIA, los cuales se adquirieron con una edad de 7 semanas para que permanecieran 1 semana en adecuación. Los ratones se trataron con 100 μ L de la mezcla de matricinas y colágena polimerizada tipo I o el vehículo (amortiguadores de citratos) o Metotrexato por vía subcutánea dorsal semanalmente durante 4 semanas. Cuatro animales fueron sacrificados en la semana sexta y cuatro en la décimo tercera semana. Se obtuvieron el bazo, los ganglios, el tejido articular, hígado, pulmones, riñones y corazón con el fin de valorar infiltrado inflamatorio y las poblaciones celulares predominantes, expresión de citocinas y el recambio de la MEC.
- (b) Artritis temprana, en la que se emplearon 48 ratones, a los que se les indujo la artritis y se trataron con 100 μ L del Matrikel o el vehículo (amortiguadores de citratos) y Metotrexato por vía subcutánea dorsal semanalmente durante 6 semanas iniciando al mismo tiempo que la aplicación del refuerzo. Tres animales de cada uno de los grupos, fueron sacrificados en la sexta y la décimo tercera semanas con el fin de obtener el tejido articular y los esplenocitos, para valorar el infiltrado inflamatorio, las poblaciones celulares predominantes, la expresión de citocinas y el recambio de la MEC.
- (c) Artritis establecida, en la que se emplearon 48 ratones, a los que se les indujo la artritis y se trataron con 100 μ L de la mezcla de Matrikel o el vehículo (amortiguadores de citratos) y Metotrexato por vía subcutánea dorsal semanalmente durante 6 semanas iniciando los tratamientos dos semanas después de la aplicación del refuerzo. Tres animales de cada uno de los grupos, fueron sacrificados en la sexta y la décimo tercera semanas con el fin de obtener los, el tejido articular y los esplenocitos, para valorar infiltrado inflamatorio, las poblaciones celulares predominantes, la expresión de citocinas y el recambio de la MEC.

Para inducir la artritis se inyectó en la base de la cola una emulsión de 100 μ g de colágena tipo II de pollo diluida en 20 mL de ácido acético 5 mM y adyuvante completo de Freund (ACF). Tres semanas después se realizó un refuerzo con la misma cantidad de colágena disuelta en adyuvante incompleto de Freund (AIF).

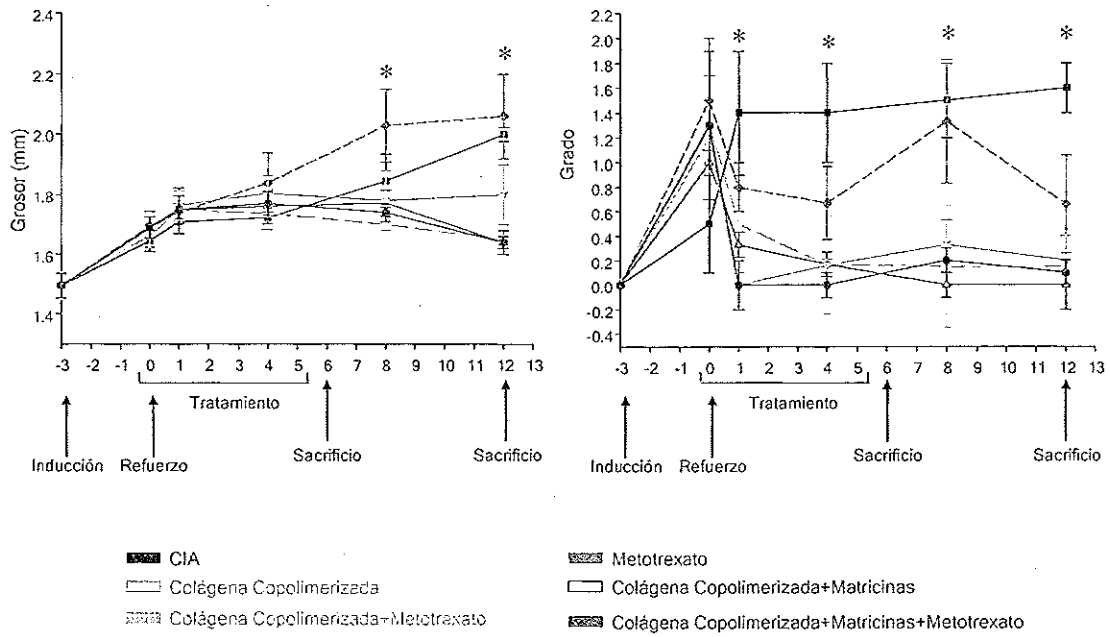
Los ratones se examinaron cada semana durante 12 semanas a partir de la primera inyección de colágena y se registró el desarrollo de artritis de acuerdo a la siguiente escala: 1.- Eritema de dedos, 2.- Eritema e inflamación de la pata, 3.- Edema de tobillos, 4.- Edema e incapacidad de movimiento en toda la extremidad. La evaluación se realizó en forma ciega, por un mismo observador.

Durante el transcurso de lo que comprende el experimento, se valoró la progresión inflamatoria en cada animal, midiendo el grosor de las 4 patas (vernier), temperatura, peso y tonicidad muscular.

Resultados. Con el modelo de toxicidad se pudo comprobar que no hubo daño a los órganos evaluados, ni toxicidad alguna.

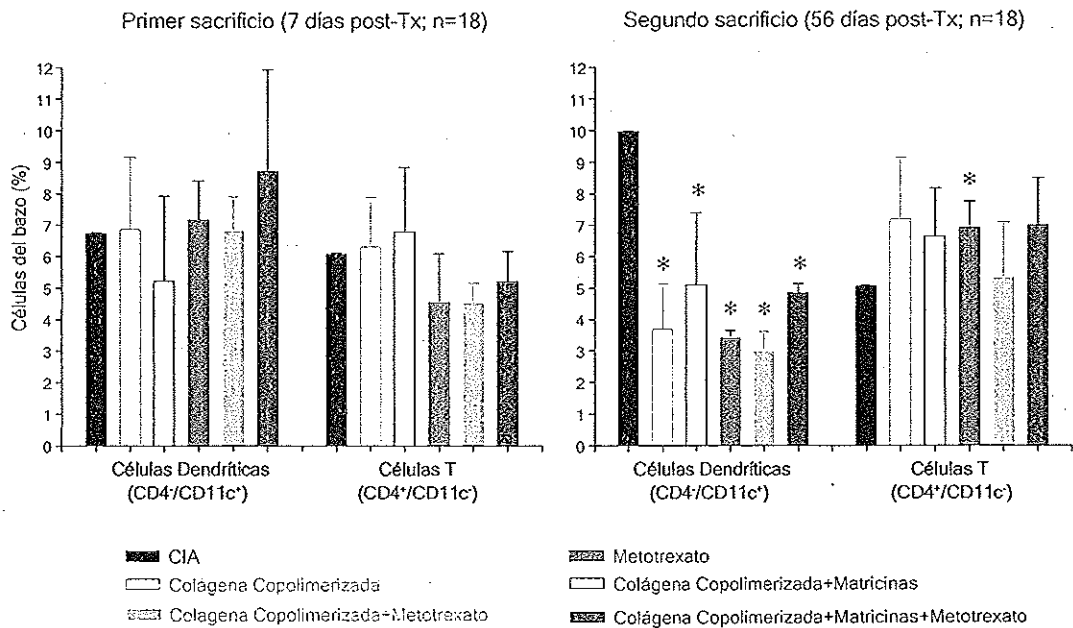
Con el modelo de artritis temprana se determinó que la incidencia de CIA fue del 100% al día 28. El análisis clínicomorfológico mostró que el mejor tratamiento fue el del Matrikel, seguido de la colágena polimerizada tipo I, después el de colágena polimerizada tipo I con metotrexato y finalmente el de metotrexato como monoterapia ($p \leq 0.05$).

Modelo de CIA Temprana Clinimetría



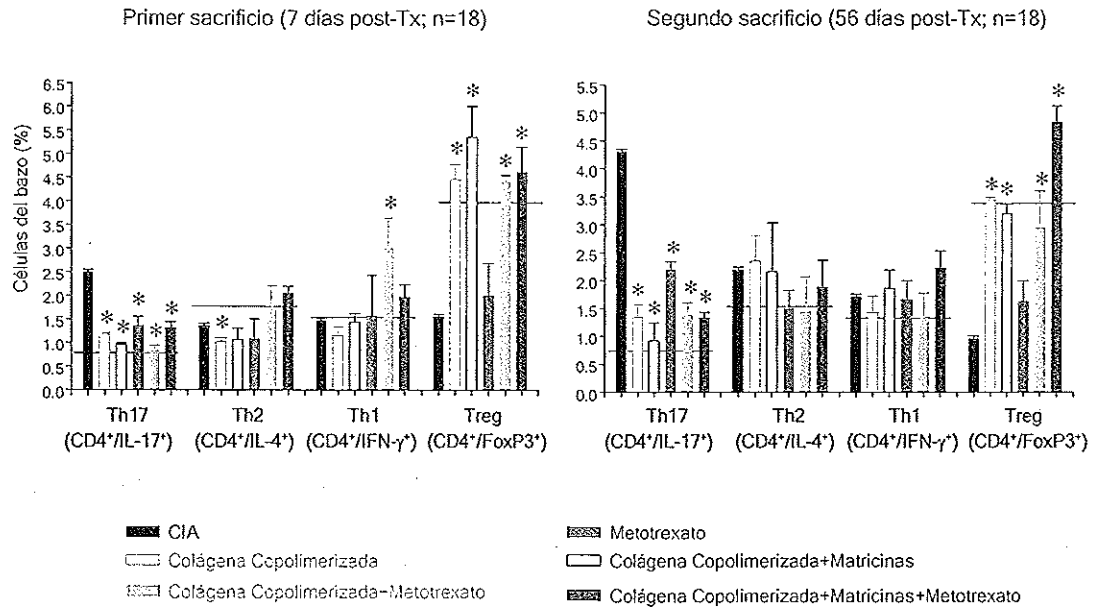
Se determinó una disminución de células dendríticas en el segundo sacrificio (56 días post-Tratamiento en los bazo de los ratones tratados con las bioterapias y el metotrexato vs. el placebo ($p < 0.05$).

Modelo de CIA Temprana FACS de Células dendríticas y Linfocitos T Esplénicos



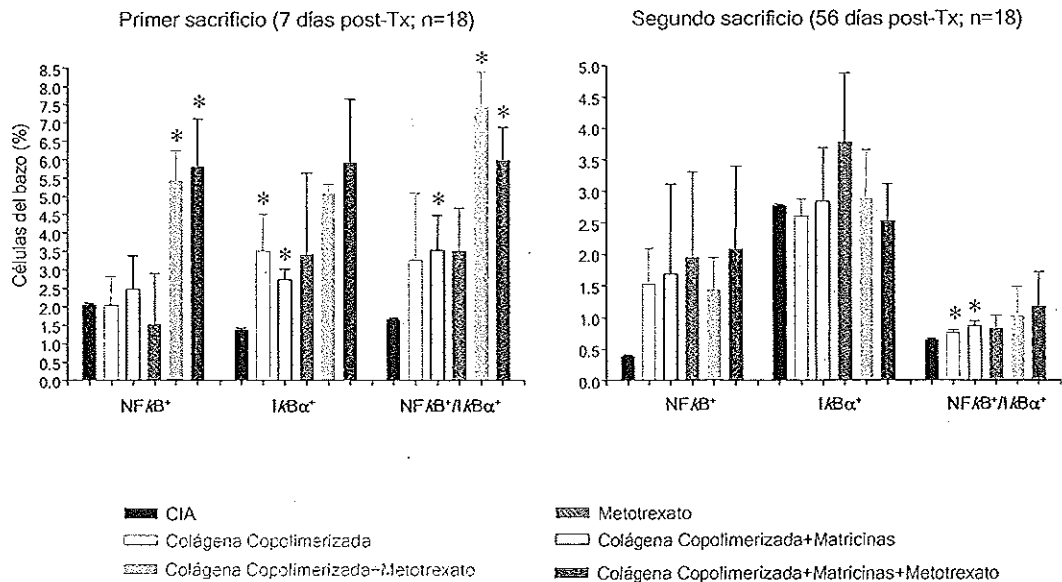
El Matrikel fue el tratamiento más efectivo para inducir la regulación de células Th17 y Treg. A éste le siguieron el de colágena polimerizada, colágena polimerizada con metotrexato y metotrexato.

Modelo de CIA Temprana FACS de Subpoblaciones de Linfocitos T Esplénicos



El mecanismo de acción parece estar directamente relacionado con la regulación del factor de transcripción NF-κB.

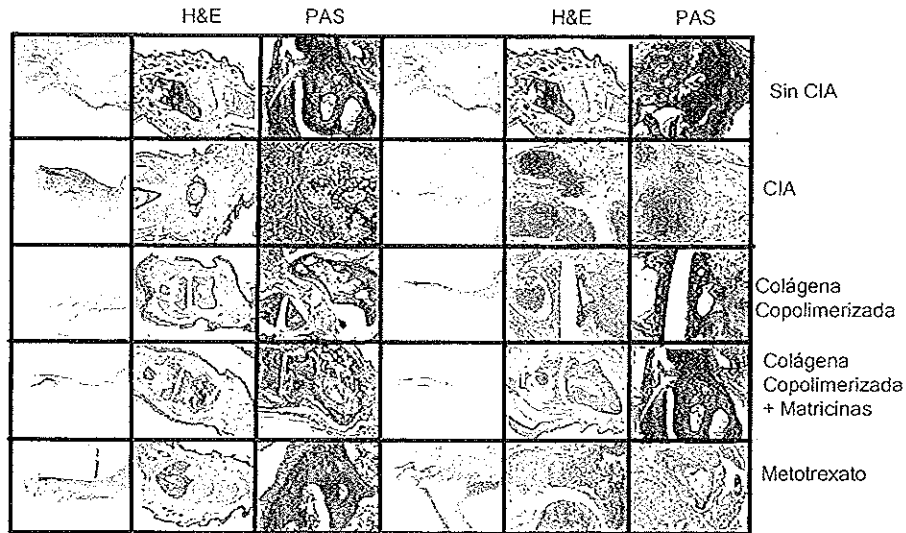
Modelo de CIA Temprana FACS de Células Mononucleares Esplénicas



Con el modelo de artritis establecida se determinó que la incidencia de CIA fue del 100% al día 28. El análisis histológico demostró que tanto el Matrikel, como la monoterapia con colágena polimerizada tipo I fueron efectivas en la preservación de la arquitectura tisular de la cavidad articular, no así con el tratamiento a base de metotrexato.

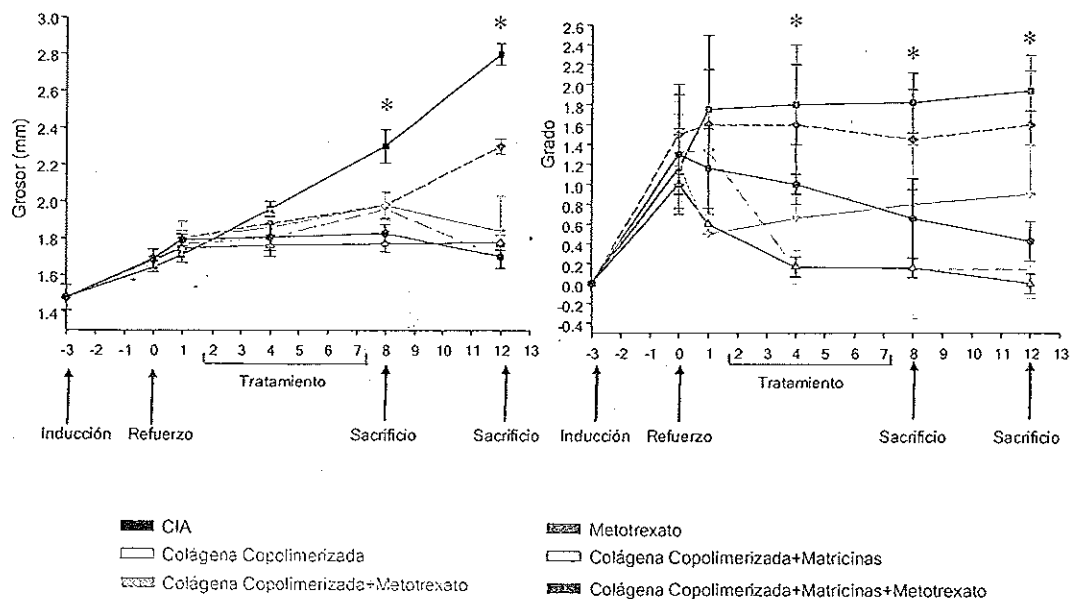
Modelo de CIA Avanzada Histología

Primer sacrificio (7 días post-Tx; n=18) Segundo sacrificio (56 días post-Tx; n=18)

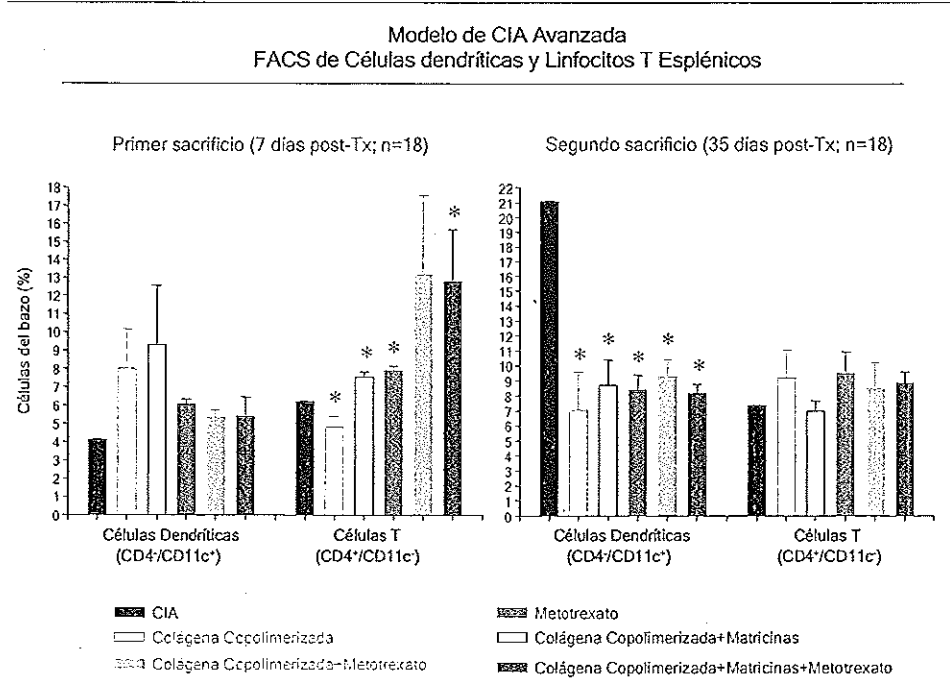


El análisis clínicomorfológico mostró que el mejor tratamiento fue el de la combinación del Matrikel, seguido del de colágena polimerizada tipo I, después colágena polimerizada tipo I y metotrexato, finalmente el de metotrexato ($p < 0.05$).

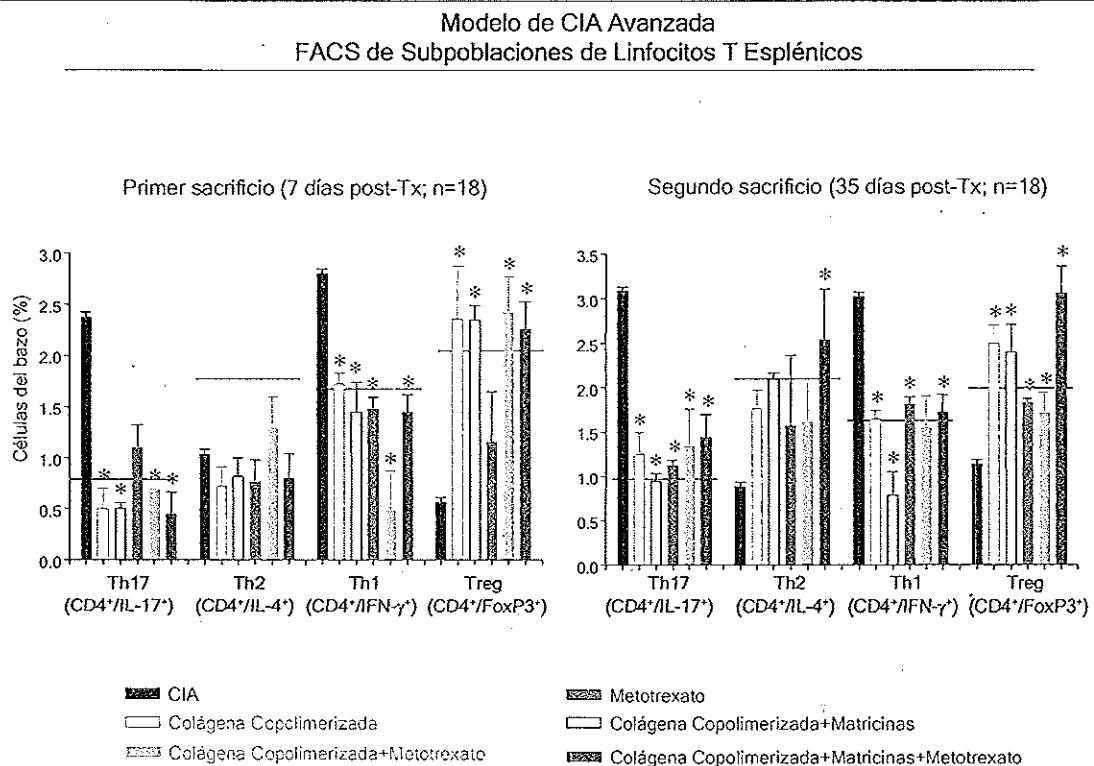
Modelo de CIA Avanzada Clínicometría



A diferencia del modelo de artritis temprana, en el de artritis establecida se determinaron diferencias estadísticamente significativas en el número de linfocitos a los 7 días post- tratamiento y en el número de células dendríticas a los 35 días post tratamiento.

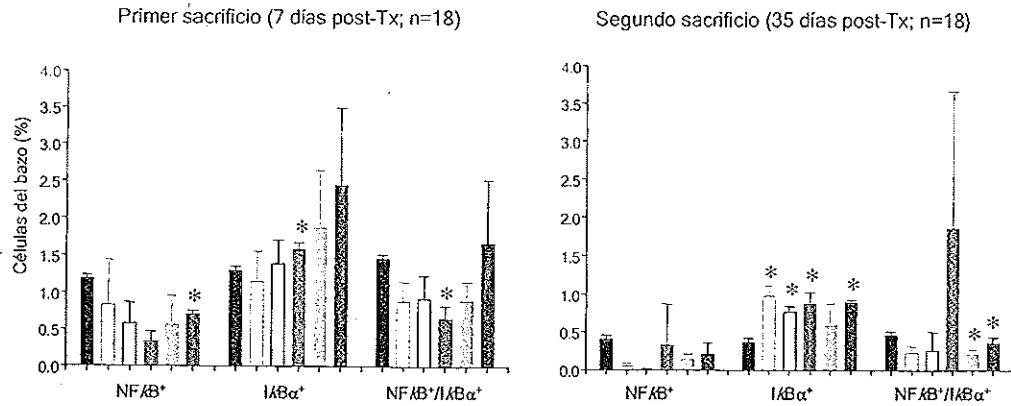


Nuevamente, los mejores resultados en la regulación de células Th17 y Treg se observaron con las bioterapias, especialmente el mejor efecto se determinó cuando se empleó el Matrikel.



El efecto de regulación negativa de la subpoblación de células inflamatorias mediadoras de autoinmunidad se relacionó con la regulación del factor NF- κ B.

Modelo de CIA Avanzada FACS de Células Mononucleares Esplénicas



CONCLUSIONES

- CIA
- Colágena Copolimerizada
- ▨ Colágena Copolimerizada+Metotrexato
- ▩ Metotrexato
- Colágena Copolimerizada+Matricinas
- ▩ Colágena Copolimerizada+Matricinas+Metotrexato

Conclusiones del Modelo de Toxicidad y CIA Temprana

- La mezcla de matricinas con colágena polimerizada tipo I:
- No induce efectos adversos
- Regula negativamente de 1.5-2X a las células Th17
- Incrementa 5-6X el número de células Treg
- Tiene un efecto sostenido
- Efecto sobre NF- κ B

Conclusiones del Modelo de CIA Avanzada

- La mezcla de matricinas con colágena polimerizada tipo I:
- No induce efectos adversos
- Regula negativamente de 3-4X a las células Th17
- Incrementa 5-6X el número de células Treg
- Tiene un efecto sostenido
- Efecto sobre NF- κ B

Logro de la meta: 90% ya que aún faltan de analizar un par de grupos del estudio.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 10 de Febrero del 2016

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: "DETERMINACION DEL MECANISMO
Y POSIOLOGIA DEL MATRIKEL EN UN MODELO DE CIA"
" con registro CINVA: IRE-585-12/12-1

debido a que el protocolo ha concluido.

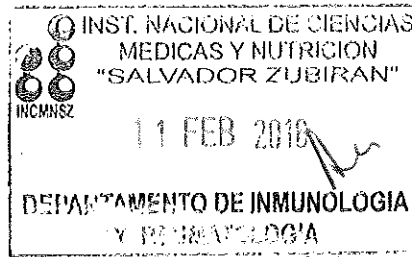
Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

DRA. G. JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA
Nombre y Firma del (a) Investigador (a)



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



Acuse

México, D.F. a 10 de Febrero de 2016

Dra. Guadalupe J. Furuzawa Carballeda
Depto. Reumatología e Inmunología
Presente

Estimada Dra. Furuzawa:

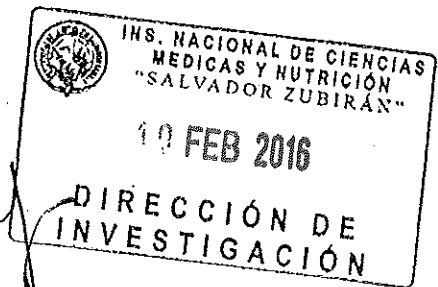
Por este conducto me permito solicitar el cierre del Protocolo: "DETERMINACIÓN DEL MECANISMO Y POSOLOGÍA DEL MATRIKEL EN UN MODELO DE CIA.", con registro CINVA IRE-585-12/12-1., debido a que el periodo de realización y la prórroga correspondiente autorizada por la CINVA ha concluido. Favor de llenar el formato de cierre del protocolo que se anexa a la presente. De no recibir el formato de su parte en el plazo de 30 días, el protocolo se dará por cerrado.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

[Handwritten signature]

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

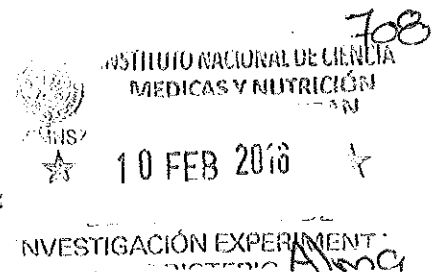


*Cerrado
10 marzo 2016
Margarita Ortiz...
M...*

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación
MVZ Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14030
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

NAB/nom





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México D.F., a 12 de noviembre de 2014

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval,
Coordinadora de la CINVA.

Por medio de la presente, solicito prórroga de un año a partir de la recepción de este documento, del proyecto: "Determinación del mecanismo y posología del matrikel en un modelo de CIA", con registro CINVA 585, debido a que por razones presupuestales no se habían logrado evaluar todos los grupos de investigación propuestos en el proyecto.

Para finiquitar este estudio se requerirán 80 ratones macho de la cepa DBA1/J con una edad promedio de siete a ocho semanas, para integrar los grupos de tratamiento con el matrikel [(b) colágena polimerizada tipo I (c) Matrikel, (d) metotrexato (2.5mg/kg) (e) b + d (vol:vol), (f) c + d].

De antemano agradezco la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dra Janette Furuzawa Carballeda,
Depto. de Inmunología y Reumatología

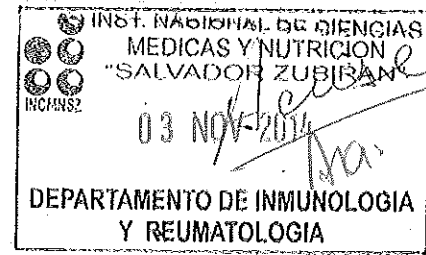
c.c.p. Dra. María Elena Flores Carrasco, Encargada del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio

Recibí:
Nayeli Ortega mtz
12-NOV-14
12:05



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

"2014, Año de Octavio Paz"



México, D.F. a 28 de Octubre del 2014

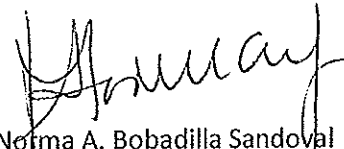
Dra. Guadalupe Janette Furuzawa Carballeda
Depto. de Reumatología e Inmunología
Presente

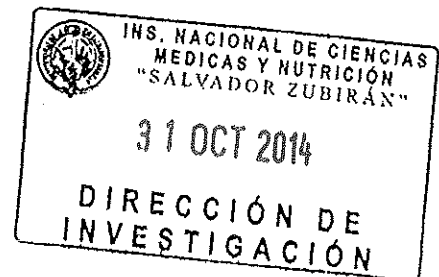
Estimado Dra. Furuzawa:

Por este conducto le informo que su proyecto: "DETERMINACIÓN DEL MECANISMO Y POSOLOGÍA DEL MATRIKEL EN UN MODELO DE CIA", con registro CINVA 585 finalizó en el mes de abril del año en curso. Por lo que le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar a la CINVA el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de llenar el formato de cierre del protocolo que se anexa a la presente.

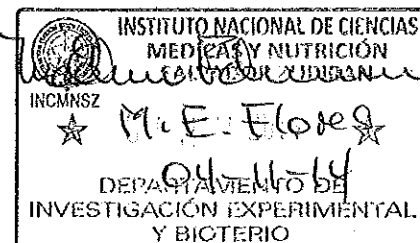
Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,


Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA



c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación.
c.c.p. Dra. María Elena Flores Carrasco, Encargada del Departamento de Investigación
Experimental y Bioterio.

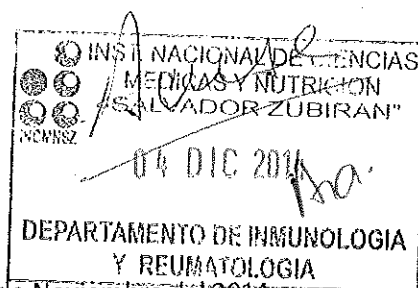


Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Sección XVI
Delegación Tlalpan
México, D. F. 14000
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

"2014, Año de Octavio Paz"



México, D. F., a 27 de Noviembre del 2014.

Dra. Guadalupe Janette Furuzawa Carballeda
Depto. de Reumatología e Inmunología
Presente.

REF.: CINVA 585, Clave: CLAVE: IRE-585-12/12-1

Estimado Dra. Furuzawa:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

"DETERMINACIÓN DEL MECANISMO Y POSOLOGÍA DEL MATRIKEL EN UN MODELO DE CIA."

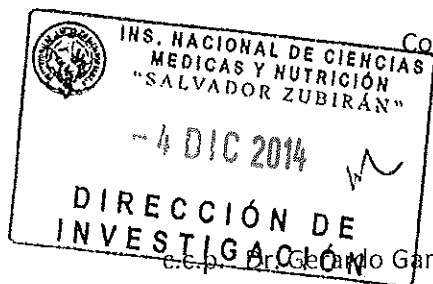
Este comité ha dictaminado **aprobar** la prórroga solicitada por un año a partir de esta fecha, sin embargo es importante comentarle que la colonia está sobrepoblada y la mayoría de los animales están por encima del peso y de las edades requeridas. Es importante que se dé seguimiento a este tipo de colonias para evitar tener sobrepoblación cuando no se están requiriendo de estos animales.

Por lo que le solicitamos que presente un calendario para la entrega de los animales después de ponerse en contacto con la Dra. María Elena Flores.

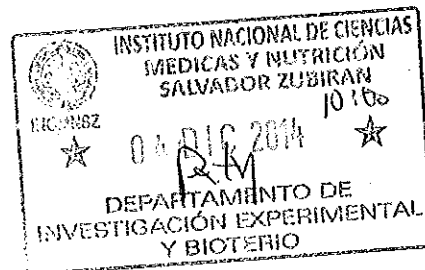
Sin más por el momento quedo de usted.

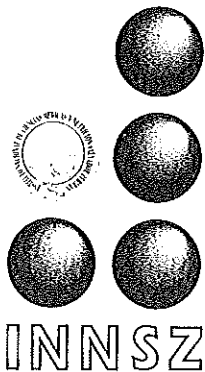
Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

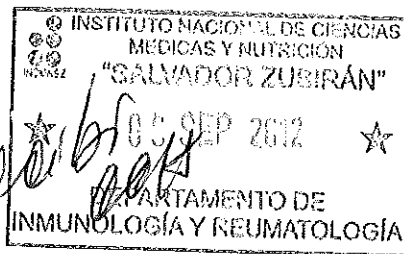


c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
Dra. Ma. Elena Flores, Jefe del Bioterio





Rubén Lisker
Octavio Villanueva
21/09/12



**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

Septiembre 05, 2012



[Signature]
**DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGÍA DE LA NUTRICIÓN**

Dra. Guadalupe Janette Furuzawa Carballada
Investigador Responsable del Proyecto
Departamento de Inmunología y Reumatología
Presente.

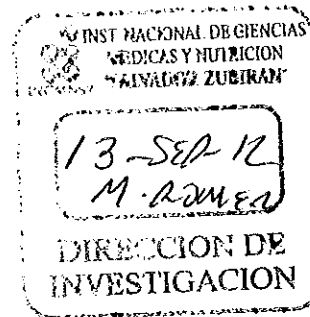
Con referencia al proyecto de investigación: "Determinación del mecanismo y posología del Matrikel en un modelo de CIA".

Registro CINVA: 585

Clave: IRE-585-12/12-1

La Comisión de Investigación en Animales (CINVA), revisó su respuesta a las observaciones emitidas por esta Comisión y se decidió **APROBARLO** para su desarrollo.

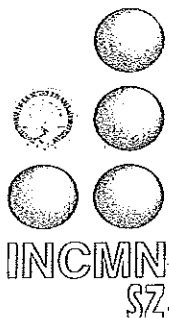
Atentamente
[Signature]
MVZ., M. Sc, Cert.L.A.M. Rafael Hernández González
Coordinador de la Comisión de Investigación en Animales



ccp. Dr. Rubén Lisker Y.- Director de Investigación
MVZ., M.en C. Octavio Villanueva Sánchez .Secretario de la Comisión de Investigación en Animales
Dra. Nimbe Torres y Torres.- Comisión de Investigación en Animales

Investigación
Tradición Servicio
Asistencia Docencia

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C. P. 14000 México, D. F.
- Tel. 54-87-09-00



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
"SALVADOR ZUBIRAN"

13 de Febrero de 2012

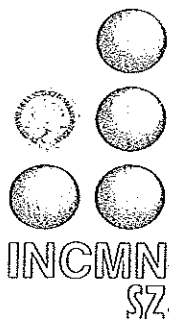
DECLARACIÓN DE LOS INVESTIGADORES

TÍTULO DEL PROYECTO: *"Determinación del mecanismo y de la posología del matrikel en un modelo de CIA"*

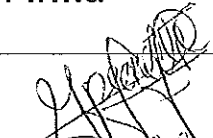
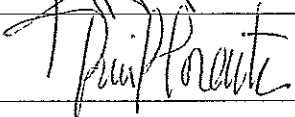
Número de Registro CINVA:

Los investigadores que participamos en el proyecto arriba mencionado sometemos voluntariamente a evaluación dicho proyecto ante el Comité de Investigación en Animales y declaramos libremente:

- *Que conocemos todos los aspectos del estudio y contamos con la capacidad de llevarlo a buen término.*
- *Que la revisión minuciosa de los antecedentes científicos del proyecto justifican su realización y nos comprometemos a mantener un estándar científico elevado que permita obtener información útil para la sociedad.*
- *Que conocemos los riesgos potenciales a los que exponemos al personal técnico, investigadores y los animales mismos involucrados en el proceso experimental, que se encuentran tanto en contacto directo como indirecto en el lugar donde se realiza la investigación. Por lo anterior, se establecen en el protocolo las medidas precautorias necesarias.*
- *Que pondremos el bienestar de los animales sujetos de investigación y la seguridad del personal en contacto con ellos por encima de cualquier otro objetivo.*
- *Que nos conduciremos de acuerdo con los estándares de comportamiento ético y científico aceptados nacional e internacionalmente según lo establecido por la Ley General de Salud y el Reglamento en Materia de Investigación para la Salud de México, La NOM 062-ZOO-1999: "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Publicada por SAGARPA en el Diario Oficial, 22 de agosto del 2001. Los lineamientos para el buen uso de los animales recopilados por el Consejo Internacional para La Ciencia de los Animales de Laboratorio en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (ICLAS-WHO).*



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
"SALVADOR ZUBIRAN"

Nombre del investigador	Firma
Janette Furuzawa-Carballeda	
Luis Llorente Peters	



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

(2174)

INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRAN

Dirección de Investigación

FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE
PROYECTOS

FECHA DE RECEPCIÓN: 17/02/2012

CLAVE: IRE-585-12/12-1

TÍTULO: Determinación del mecanismo y posología del Matrikel en un modelo de CIA

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Furuzawa Carballada Guadalupe Janette

DEPARTAMENTO O SERVICIO: DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA

TIPO DE INVESTIGACIÓN: Investigación Experimental

PATROCINADORES:

Patrocinador	Cantidad
CONACYT	\$ 1,150,000.00

VIGENCIA DEL PROYECTO: Del 02/05/2012 al 31/12/2013

Trimestre 1 Trimestre 2 Trimestre 3 Trimestre 4

Primer año

COSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN		INSTITUCIONES PARTICIPANTES	
Personal	\$ 0.00		
(sueldos y sobresueldos al personal)			
Equipos	\$ 988,800.00		
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)			
Materiales	\$ 116,200.00	FIRMAS	
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)		Investigador responsable	Jefe de Departamento
Animales	\$ 45,000.00	Comité de Investigación en Humanos	Comité de Investigación en Animales
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)		Director de Investigación	Director General
Estudios	\$ 0.00		
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)			
Viaticos	\$ 0.00		
(reuniones científicas y trabajo de campo)			
Publicaciones	\$ 0.00	Fecha de resolución	
		20-11-2012	

ANEXO B

“Determinación del mecanismo y posología del Matrikel en un modelo de CIA”

Departamento de Inmunología y Reumatología
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Dra. Janette Furuzawa Carballada y Dr. Luis Llorente Peters.

Introducción

Los modelos murinos de artritis inducida por colágena (CIA) son los más aceptados para valorar la patogenia y buscar blancos terapéuticos para la artritis reumatoide (AR), dado que las similitudes son de un 80 a un 90% con las condiciones humanas, incluyendo genes de histocompatibilidad, erosión del cartílago y el pannus sinovial. La AR es una enfermedad autoinmune de origen desconocido, se manifiesta por la inflamación de las articulaciones, hiperplasia sinovial, fibrosis, degradación del cartílago articular y erosión del hueso subcondral. Dentro de los diversos tratamientos para el control de la inflamación y la progresión de la sinovitis crónica en la AR se incluyen los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), los fármacos modificadores de la enfermedad (FARME) como el metotrexato y las inmunoterapias o terapias biológicas, todos ellos con efectos adversos importantes y en el caso de los biológicos además se debe considerar el costo del tratamiento el cual es excesivamente elevado para la población mexicana.

Debido a lo anterior, la búsqueda de fármacos y estrategias terapéuticas que puedan tener un impacto benéfico en el desarrollo y progresión de la enfermedad se ha convertido en una de las prioridades del sector salud a nivel mundial.

En la actualidad, el empleo de proteínas de matriz extracelular y de péptidos derivados de las anteriores, han demostrado tener eficacia terapéutica en el tratamiento de enfermedades tales como osteoartritis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, etc.

Antecedentes

Acerca de las matricinas...

Dentro de las terapias más novedosas como coadyuvantes en el tratamiento de AR se han propuesto el uso de agentes biológicos como las terapias orales o nasales de proteínas de matriz extracelular modificadas principalmente de colágena tipo I, II, III que inducen tolerancia inmune periférica. *In Vitro* se ha demostrado que la adición de colágena tipo I desnaturalizada de origen vacuno a cultivos de células mononucleares de sangre periférica induce la producción del factor inhibidor de los leucocitos (LIF) en individuos y pacientes con AR y con HLA-DR4⁺. Asimismo, los péptidos derivados de elastina y colágena (matricinas), inducen la regulación de la actividad de la elastasa de neutrófilos confiriendo así propiedades reguladoras de la inflamación.

Las matricinas o matricriptinas son pequeños péptidos o subdominios de secuencias repetidas, provenientes de la proteólisis de las proteínas de la matriz extracelular. En la mayoría de los casos, las matricinas emplean como receptores a las integrinas, los receptores de los factores de crecimiento, de las citocinas o de las quimiocinas. La unión de las matricinas a su ligando regula la proliferación, migración, producción de citocinas, de proteasas, de proteínas de matriz extracelular o apoptosis. Existen dos clases de matricinas, la "naturales", las cuales tienen dominios expuestos y generan señales directas en el milieu de la matriz extracelular y las "crípticas" o matricriptinas que requieren del procesamiento proteolítico para exponer el ligando. A diferencia de los factores de crecimiento solubles tradicionales, la mayoría de las matricinas poseen baja afinidad por sus receptores (intervalo micromolar) y presentan múltiples valencias para incrementar la avidéz.

Particularmente los péptidos de elastina con una secuencia XGXXPG, regulan la quimiotaxis, proliferación y liberación de proteasas en varias estirpes celulares tales como los fibroblastos y células endoteliales, la angiogénesis y la tubulogénesis y en consecuencia tienen un efecto directo sobre la reparación tisular o la invasión tumoral. Su receptor es el S-gal/EBP (spliced β -galactosidase/elastin binding protein) y se expresa en fibroblastos, células de músculo liso, endoteliales, macrófagos, neutrófilos, leucocitos, monocitos, linfocitos y células tumorales.

Los péptidos de colágena tienen varios receptores de adhesión tales como la proteína de unión a elastina (67 kDa), la L-selectina, las integrinas así como CXCR1 y CXCR2. Sus funciones fisiológicas incluyen la anti-angiogénesis, la inhibición de la proliferación celular y de la metástasis en el melanoma, la inhibición de la migración e incrementa la regeneración nerviosa.

Acerca de la colágena polimerizada tipo I...

La colágena polimerizada tipo I es la mezcla irradiada por rayos γ de colágena porcina ateloapéptica tipo I y la polivinilpirrolidona (PVP) en una solución amortiguadora de citratos, que estabiliza el pH. En condiciones de cultivo a 37°C y pH neutro el biofármaco no forma un gel, como la colágena, y sus propiedades electroforéticas, fisicoquímicas y farmacológicas se encuentran modificadas por la unión covalente entre la proteína y la PVP. Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que el compuesto actúa diferente de como lo hacen sus componentes por separado (colágena y PVP).

Este biofármaco tiene efectos moduladores sobre el metabolismo de la colágena y otras proteínas de matriz extracelular (elastina, proteoglicanos, proteína oligomérica del cartílago, osteopontina y osteonectina) y la expresión de citocinas pro-inflamatorias. La colágena polimerizada tipo I administrada por la vía intramuscular, cutánea o subcutánea se metaboliza de la misma manera que la colágena endógena, degradándose en el espacio extracelular principalmente por medio de la enzima colagenasa en un tiempo de al menos 15 min, los péptidos generados son rápidamente metabolizados por las enzimas gelatinasas y posteriormente por otras enzimas inespecíficas, dando como subproductos oligopéptidos y aminoácidos libres. Dada su antigenicidad característicamente baja, se considera un material inmunológicamente inocuo, excepto en pacientes que manifiestan hipersensibilidad a la proteína (IPP). Por su parte, la PVP ha sido ampliamente utilizada en muchas formulaciones farmacéuticas, de alimentos, cosméticos, etc. Debido a su naturaleza (homopolímero de N-vinil-2-pirrolidona) es un polímero biológicamente inerte. Existe un gran número de datos

experimentales que fundamente su seguridad e inocuidad. La PVP empleada para la fabricación de la colágena polimerizada tipo I es de bajo peso molecular, por lo que no induce la formación de granulomas y se excreta por vía renal (95%) en un periodo menor a 24 horas. No se han reportado efectos adversos por la administración intravenosa como expansor de plasma o post-administración de grandes cantidades vía oral, subcutánea o intramuscular.

Estudios de bioseguridad y farmacovigilancia

Los análisis clínicos y pruebas de laboratorio en voluntarios sanos y pacientes de cicatrices hipertróficas o escleroderma, muestran que la citología hemática, el examen general de orina y el perfil hepático permanecen sin alteraciones aun después de largos periodos de empleo de la colágena polimerizada tipo I. También, se ha demostrado que el biofármaco no produce fibroproliferación, ni linfoproliferación y no tiene efectos genotóxicos o mielotóxicos.

Anticuerpos anti-colágena o anti-colágena polimerizada tipo I, anti-ribonucleoproteínas o anti-ADN de doble cadena

No se ha observado la inducción de ninguno de estos autoanticuerpos por el uso de la colágena polimerizada tipo I aún por periodos mayores a 12 meses.

Experiencia clínica de la colágena polimerizada tipo I en enfermedades fibrosantes dérmicas asociadas a inflamación crónica recurrente

La eficacia del biofármaco se ha demostrado en la resolución de padecimientos fibrosantes dérmicos, como las cicatrices hipertróficas en humanos, donde la aplicación intralesional en dosis de 0.2 ml por cada 5 cm de cicatriz, de forma semanal durante un período máximo de 6 meses eliminó la sensación urente, el prurito, el dolor, el exceso de tejido fibroso en la cicatriz y restableció la normocromía. Histológicamente, se observó menor cantidad de haces gruesos de colágena tipo I, recuperación de colágena tipo III de la dermis papilar, arreglo de las fibras de tejido conjuntivo semejante al de la piel normal, disminución del infiltrado celular y corrección del contorno epidérmico. Esto incluye la presencia de anexos cutáneos (glándulas sebáceas y folículos pilosos) y rearreglo en la disposición de las fibras de colágena y elastina, el cual es similar al de la piel normal.

Inmunohistoquímicamente, se determinó que algunas citocinas pro-inflamatorias/fibrogénicas (IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1 y PDGF) y moléculas de adhesión (ELAM-1 y VCAM-1) se expresaban abundantemente en el tejido de las cicatrices hipertróficas sin tratamiento, no así en las tratadas con el biofármaco cuyos niveles fueron similares a los de la piel normal.

El efecto modulador de la inflamación por la colágena polimerizada tipo I también fue observado en las lesiones cutáneas de escleroderma, ya que las placas tratadas con 0.2 ml del biofármaco/semana durante 3 meses, mejoraron su textura y apariencia. Histológicamente, se observó la remodelación del tejido fibroso que permitió el restablecimiento de la proporción de las colágenas tipos I y III, la recuperación de la colágena tipo III de la dermis papilar, se conservó el contorno epidérmico y además, se presentaron anexos cutáneos. Inmunohistoquímicamente, se determinó que la colágena tipo I co-polimerizada reguló negativamente la expresión de IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1, ELAM-1 y VCAM-1.

Estudios pre-clínicos en fracturas y clínicos en pseudoartrosis

En las fracturas producidas en ratas la aplicación de colágena polimerizada tipo I induce la síntesis de osteopontina y osteonectina (proteínas que participan en la mineralización), mejorando la calidad de la reparación y acelerando la formación y consolidación ósea. La aplicación de colágena polimerizada tipo I durante 6 semanas a 31 pacientes con pseudoartrosis produjo consolidación ósea grado III en 16 pacientes, grado II en 12 y 3 continuaron con el tratamiento. La colágena polimerizada tipo I estimula rápidamente la formación del callo fibroso y disminuye el dolor de la extremidad lesionada. Mejora el tono y la fuerza muscular del miembro afectado.

Estudios *in vitro* en AR

En cultivos por duplicado de fragmentos de sinovial de 10 pacientes con AR y de 5 individuos sanos, tratados sin o con colágena polimerizada tipo I al 1% durante 7 días, el tratamiento con el principio activo incrementó 1.7 veces la colágena tipo III de forma tiempo dependiente. La expresión de IL-1 β , TNF- α , IL-8, así como de ICAM-1, VCAM-1 y Cox-1 fue regulada negativamente en un 40 a 50% con respecto a los controles, mientras que la del TIMP-1 y Fas/Apo95 se incrementó de 1.5 a 2 veces en la sinovial tratada con colágena polimerizada tipo I *versus* los cultivos de los controles. La apoptosis se aumentó 2.5 veces en los vasos sanguíneos de los cultivos tratados. En los sobrenadantes de los cultivos la actividad colagenolítica, la concentración del TIMP-1, así como de IL-1 β y TNF- α se encontró disminuida a niveles estadísticamente significativos. Lo anterior sugiere que la adición de colágena polimerizada tipo I a los cultivos de tejido sinovial de pacientes con AR induce la regulación negativa de algunas citocinas pro-inflamatorias e incrementa la apoptosis de las células sinoviales *in vitro*.

Estudio preclínico del efecto de la colágena polimerizada tipo I en un modelo de artritis inducida por colágena.

El objetivo del trabajo fue el de evaluar el efecto de la aplicación subdorsal de la colágena copolimerizada en un modelo murino de artritis inducida por colágena (CIA). Los ratones de la cepa DBA1 de 8 semanas de edad fueron inmunizados en la base de la cola con 100 μ g de colágena tipo II de pollo emulsificada en adyuvante completo de Freund. El refuerzo se aplicó en el día 21 en la base de la cola con 100 μ g de colágena tipo II emulsificada con el adyuvante incompleto de Freund. Los ratones fueron tratados dos semanas después de la inducción con 100 μ l de colágena copolimerizada, por semana durante un mes. *Mediciones clinimorfométricas.* Fueron hechas en condiciones basales y cada semana. El aumento del grosor de las patas se midió con un vernier electrónico. Se determinó el peso y la temperatura. El grado de inflamación se evaluó en cada pata de acuerdo a la siguiente escala: 0, sin inflamación; 1, eritematosa o edematizada (ligera); 2, eritematosa o edematizada en más de una articulación o con aumento ligero de volumen en una pata (moderada); 3, aumento importante de volumen, pérdida de la función o anquilosis (grave). El infiltrado inflamatorio se evaluó por H&E y tricrómica de Massón y el contenido de proteoglicanos, con la técnica de PAS. Mediante FACS se determinó el porcentaje de las poblaciones de células Th1, Th2, Treg y Th17. La incidencia de CIA fue de 100% al día 28. El análisis clinimorfométrico mostró que la colágena copolimerizada reguló negativamente la inflamación y la destrucción articular *vs.* Placebo ($p \leq 0.05$). El análisis histológico demostró que en el grupo con CIA la erosión ósea, el pannus y la degradación del

cartílago articular era intensa y correlacionaba con el grado de inflamación. Mientras que los ratones tratados con colágena polimerizada tipo I presentaban una arquitectura tisular normal. La colágena polimerizada tipo I moduló las proporciones de células Th1, Treg y Th17 sin producir modificación de las Th2. Conclusiones. La colágena polimerizada tipo I ejerció un efecto antiinflamatorio inhibiendo el daño articular en el modelo de CIA sin producir efectos adversos.

Estudio piloto de seguridad y eficacia del uso de Colágena Tipo I Co-polimerizada aplicada por vía subcutánea en pacientes con artritis reumatoide (No Ref del CIIBH: 981)

Basados en los resultados encontrados *in vitro* e *in vivo* en el modelo con la colágena polimerizada tipo I, se estudió si la aplicación del principio activo vía subcutánea tenía alguna eficacia clínica y si era seguro y bien tolerado por los pacientes con AR.

El estudio piloto fue prospectivo, longitudinal y aprobado por el comité de investigación biomédica en humanos. Incluyó a 10 pacientes con AR activa (de acuerdo a los criterios de clasificación y actividad del ACR), los cuales dieron su consentimiento informado. Los pacientes bajo dosis estables de metotrexato y/o AINES fueron tratados durante 3 meses con administración subcutánea semanal de 0.2 ml de colágena polimerizada tipo I (1.56 mg de colágena) en las 8 articulaciones más dolorosas. El análisis primario de la eficacia se evaluó mediante el índice de actividad de la enfermedad (DAS) y el cambio promedio en por lo menos 3 de las 5 mediciones siguientes (ACR20): índice de Ritchie (recuento de articulaciones dolorosas), recuento de articulaciones inflamadas, evaluación global del paciente acerca de la actividad de la enfermedad (HAQ-DI), evaluación de la escala visual análoga (EVA) de dolor y los reactantes de fase aguda. El análisis estadístico se llevó a cabo por U-Mann Whitney de doble cola.

Los resultados mostraron que los pacientes toleraron bien el tratamiento con colágena polimerizada tipo I. La respuesta a la terapéutica mostró una mejoría estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la rigidez matutina ($\Delta = -32.3$, $\cong -68.6\%$), índice de Ritchie ($\Delta = -10.2$, $\cong -46.4\%$), número de articulaciones inflamadas ($\Delta = -10.7$, $\cong -71.8\%$), EVA de dolor ($\Delta = -39.9$, $\cong -63.8\%$), HAQ-DI ($\Delta = -0.5$, $\cong -48.5\%$), DAS ($\Delta = -1.35$, $\cong -70.5\%$) y ACR20, 50 y 70 (80%; 60% y 20%). No hubo cambios en los parámetros serológicos ni sanguíneos. En conclusión, la colágena polimerizada tipo I mostró ser un biofármaco eficaz y seguro en el tratamiento a corto plazo de la AR, es decir, confirmamos *in vivo* los efectos anti-inflamatorios observados previamente *in vitro*. La colágena polimerizada tipo I coadyuva al tratamiento de la AR sin producir efectos adversos.

Estudio doble ciego del uso de Colágena Tipo I Co-polimerizada aplicada por vía intramuscular comparada con placebo en pacientes con artritis reumatoide (No. Ref. CIIBH: 1198, IRE 101-03/04-1, SALUD-2002-C01-7421)

Con el estudio anterior se demostró que la colágena polimerizada tipo I administrada por vía subcutánea (supracapsular) en la articulación en pacientes con AR era segura y clínicamente eficaz en el tratamiento a corto plazo. Por lo que el objetivo del proyecto fue determinar si la colágena polimerizada tipo I administrada por vía intramuscular también tenía eficacia clínica en los pacientes con AR *versus* el placebo a largo plazo. El estudio fue prospectivo, doble ciego, comparado con placebo. Incluyó a 30 pacientes con AR activa de acuerdo a los criterios del ACR.

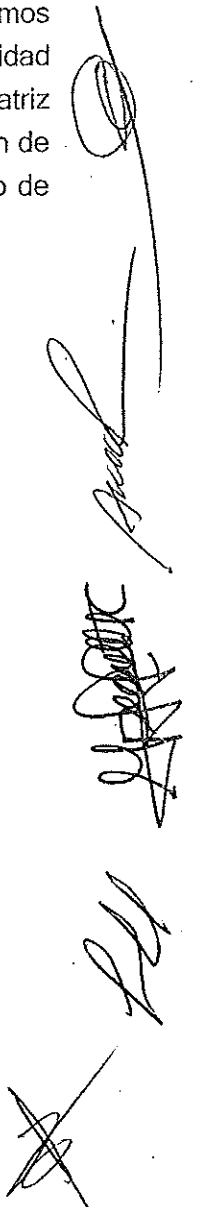
Los pacientes que en los 3 meses previos al estudio estuvieran bajo dosis estables de metotrexato fueron tratados durante 6 meses por vía intramuscular de acuerdo al esquema de Freyberg con 2.0 ml de colágena polimerizada tipo I (3.33 mg de colágena) ó 2.0 ml de placebo (fase de tratamiento). Posteriormente todos los pacientes fueron evaluados bimestralmente durante 6 meses (fase de farmacovigilancia), tiempo en el cual no se administró ni colágena polimerizada tipo I, ni placebo. El análisis primario de la eficacia se determinó mediante el DAS y el ACR20, 50 y 70. El análisis estadístico se llevó a cabo por U-Mann Withney de dos colas, *t*-Student pareada y por la prueba de Wilcoxon. El grupo de pacientes que recibió el principio activo toleró bien el tratamiento y mostró una mejoría estadísticamente significativa ($p < 0.05$) vs el placebo en el número de articulaciones inflamadas (7.1 ± 0.8 vs 16.0 ± 1.6 ; $\Delta = -15.2$, $\cong -68.2\%$ vs $\Delta = -9.3$, $\cong -36.8\%$), articulaciones dolorosas (8.1 ± 0.8 vs 15.2 ± 1.5 ; $\Delta = -20.6$, $\cong -71.8\%$ vs $\Delta = -13.7$, $\cong -47.4\%$), rigidez matutina (9.2 ± 3.1 vs 29.1 ± 5.9 min; $\Delta = -85.4$, $\cong -90.3\%$ vs $\Delta = -72.3$, $\cong -71.3\%$), HAQ-DI (50.0 ± 10.8 vs 22.9 ± 10.3 ; $\Delta = -0.69$, $\cong -50.0\%$ vs $\Delta = -0.24$, $\cong -22.9\%$), DAS (3.0 ± 0.2 vs 4.9 ± 0.3 ; $\Delta = -2.6$, $\cong -46.4\%$ vs $\Delta = -0.9$, $\cong -15.5\%$), ACR20 (78.6 vs 71.4%), ACR50 (57.1 vs 0%), ACR70 (7.1 vs 0%), PCR (1.1 ± 0.4 vs 2.5 ± 0.7 ; $\Delta = -0.8$, $\cong -42.1\%$ vs $\Delta = 0.6$, $\cong 31.6\%$) y factor reumatoide (243.9 ± 57.3 vs 490.4 ± 74.9 ; $\Delta = -128$, $\cong -34.4\%$ vs $\Delta = 19.8$, $\cong 4.2\%$). Los pacientes tratados con colágena polimerizada tipo I requirieron dosis menores de metotrexato durante el estudio vs el grupo placebo (12.3 ± 0.8 vs 15.4 ± 0.6 en el 12º mes; $p \leq 0.05$). No hubo cambios en los parámetros serológicos, sanguíneos o radiológicos. No se presentaron reacciones adversas en ningún paciente del grupo placebo o tratado con colágena polimerizada tipo I. Basados en los resultados anteriores se concluyó que, la colágena polimerizada tipo I es un biofármaco eficaz, seguro, de bajo costo y de fácil administración ya que no requiere de hospitalización por lo que podría ser de utilidad como un coadyuvante biológico en la terapia de la AR.

Acerca de la mezcla de matricinas (péptidos derivados de colágena y elastina) con colágena polimerizada tipo I (Matrikel)...

En el modelo de CIA se evaluó el efecto de la aplicación subdorsal de la colágena polimerizada tipo I, o su combinación con matricinas. **Metodología. Modelo de Toxicidad.** Veintiún ratones macho de la cepa DBA/1 de 8 semanas de edad fueron tratados con 100 μ l de (a) placebo (amortiguador de citratos), (b) colágena polimerizada tipo I (c) Matrikel, (d) metotrexato (2.5mg/kg) (e) b + d (vol:vol), (f) c + d, por semana durante un mes. **Modelo Artritis Temprana.** Cuarenta y ocho ratones con las mismas características, fueron inmunizados en la base de la cola con 100 μ g de colágena tipo II de pollo emulsificada en adyuvante completo de Freund. El refuerzo se aplicó en el día 21 en la base de la cola con 100 μ g de colágena tipo II emulsificada con el adyuvante incompleto de Freund. El mismo día se aplicaron los tratamientos a-f cada semana durante un mes. **Modelo Artritis.** Se indujo la artritis en 48 ratones como en el modelo anterior y los tratamientos se aplicaron después de 2 semanas del refuerzo y durante un mes. **Mediciones clinimorfológicas.** Fueron hechas en condiciones basales y cada semana. El aumento del grosor de las patas se midió con un vernier electrónico. Se determinó el peso y la temperatura. El grado de inflamación se evaluó en cada pata de acuerdo a la siguiente escala: 0, sin inflamación; 1, eritematosa o edematizada (ligera); 2, eritematosa

o edematizada en más de una articulación o con aumento ligero de volumen en una pata (moderada); 3, aumento importante de volumen, pérdida de la función o anquilosis (grave). El infiltrado inflamatorio se evaluó por H&E y tricrómica de Massón y el contenido de proteoglicanos, con la técnica de PAS. Mediante FACS se determinó el porcentaje de las poblaciones de células Th1, Th2, Treg y Th17. Resultados. La incidencia de CIA fue de 100% al día 28. El análisis clinimorfométrico mostró que los tratamientos b, c, e y f regularon negativamente la inflamación y la destrucción articular vs. Placebo ($p \leq 0.05$). El análisis histológico demostró que en el grupo con CIA la erosión ósea, el pannus y la degradación del cartílago articular era intensa y correlacionaba con el grado de inflamación. Mientras que los ratones tratados con b, c, e y f presentaban una arquitectura tisular normal. La colágena polimerizada tipo I y el Matrikel modularon las proporciones de células Th1, Treg y Th17 sin producir modificación de las Th2. Conclusiones. La colágena polimerizada tipo I y el Matrikel ejercieron un efecto antiinflamatorio inhibiendo el daño articular en el modelo de CIA sin producir eventos adversos. Los resultados anteriores sugieren que estas moléculas podrían estar actuando como tolerágenos.

Dado a las características clínicas de la AR y a las propiedades que han mostrado el uso de matricinas (derivados peptídicos de colágena y elastina) y colágena polimerizada tipo I podemos inferir que la mezcla de estas proteínas de matriz extracelular modificadas podría ser de gran utilidad modificando el curso y comportamiento de la inflamación así como el recambio de la matriz extracelular. Por lo tanto nuestro objetivo es evaluar el efecto regulador negativo de la inflamación de la mezcla de estas proteínas de matriz extracelular modificadas (Matrikel) en un modelo murino de CIA desde un punto de vista clínico, histológico y molecular.

A vertical column of handwritten signatures and initials on the right margin. From top to bottom, there is a large circular scribble, a signature that appears to be 'Gued', a signature that appears to be 'M. J. ...', a signature that appears to be 'P. J.', and a large 'X' mark.

Justificación

En la actualidad se requiere de terapias más efectivas, de menor costo y casi nulos o nulos efectos adversos para el tratamiento de la AR. Debido a lo anterior, sugerimos determinar la eficacia terapéutica, el mecanismo de acción de una molécula novedosa y la proporción de la mezcla de matricinas derivadas de péptidos de colágena y elastina con colágena polimerizada tipo I (Matrikel) en un modelo murino de CIA.

Los estudios previos sugieren que el Matrikel podría ser una molécula inductora de tolerancia periférica en enfermedades autoinmunes como la AR.

A vertical column of handwritten signatures and initials on the right side of the page. From top to bottom, there is a circular stamp, a signature that appears to be 'J. M. ...', another signature that appears to be 'M. ...', and a final signature that appears to be 'L. ...'.

Hipótesis

- Ho nula:

El Matrikel no tendrá ninguna eficacia terapéutica sobre la inflamación y las subpoblaciones de células T CD4⁺ (Th17, Th2 y Th1), células B reguladoras (IL-10⁺), T reguladoras (Tregs) T CD4⁺/Foxp3⁺, T CD8⁺/Foxp3⁺ y células dendríticas reguladoras (DCregs) CCR6⁺/CD123⁺ en los ratones con CIA. El Matrikel no modificará la progresión de la artritis inducida por inyección de colágena en roedores.

- Ho alternativa:

El Matrikel tendrá eficacia terapéutica sobre la inflamación y las subpoblaciones de células T CD4⁺ (Th17, Th2 y Th1), células B reguladoras (IL-10⁺), T reguladoras (Tregs) T CD4⁺/Foxp3⁺, T CD8⁺/Foxp3⁺ y células dendríticas reguladoras (DCregs) CCR6⁺/CD123⁺ en los ratones con CIA. El Matrikel modificará la progresión de la artritis inducida por inyección de colágena en roedores.

The right side of the page contains several handwritten signatures and initials. From top to bottom, there is a signature that appears to be 'García', followed by another signature that is partially obscured and looks like 'M. García', and finally a set of initials 'L. R.' with a large 'X' mark below them.

Objetivos

Objetivo general:

Evaluar si la aplicación subcutánea dorsal del Matrikel es capaz de modificar la progresión de la artritis inducida por inyección de colágena en roedores. El efecto se determinará a nivel clínico, histológico y molecular comparando los resultados con el tratamiento estándar de oro: el Metotrexato.

Objetivos secundarios

Determinar que proporción de matricinas con colágena polimerizada tipo I tendrá mejor efecto para modificar la progresión de la artritis inducida por inyección de colágena (Matricinas / Colágena polimerizada: 1.0 / 9.0, 1.5 / 8.5 y 3.0 / 7.0) a través de evaluar:

- Clínicamente la eficacia terapéutica del Matrikel (grosor de la patas, peso, temperatura, grado de artritis, etc.).
- Histológicamente la arquitectura tisular de la cavidad articular y si existen modificaciones de la matriz extracelular en la articulación de los ratones con CIA.
- Inmunohistoquímicamente la presencia de IL-17, IL-10, Foxp3 e IDO, en el tejido articular.
- Por citometría de flujo la presencia de células Th1 (CD4⁺/CD14⁻/IFN- γ ⁺); Th2 (CD4⁺/CD14⁻/IL-4⁺); Th17 totales (CD4⁺/CCR6⁺/IL-17⁺); Tregs (CD4⁺/CD127^{low}/FOXP3⁺); Tregs (CD8⁺/CD28⁻/Foxp3⁺), Bregs (CD19⁺/CD5⁺/IL-10⁺) y CDregs (CD123⁺/CCR6⁺/IDO⁺) las células del bazo de los ratones.

Alcance

Con el presente estudio se pretende evaluar el papel potencial que tiene este biofármaco como monoterapia o como adyuvante terapéutico en la modificación de la progresión de la AR. Esta molécula es inocua, es decir, no produce efectos adversos y podría restablecer la homeostasis de la articulación.

Handwritten signatures and initials on the right side of the page, including a large signature at the top, several smaller signatures in the middle, and a large 'X' mark at the bottom.

Metodología

El estudio contemplará la evaluación del Matrikel preparado en 3 proporciones distintas de derivados peptídicos de colágena y elastina (matricinas) / colágena polimerizada tipo I (vol/vol):

- a) 1.0 / 9.0
- b) 1.5 / 8.5
- c) 3.0 / 7.0

en tres modelos distintos,

- 1) Toxicidad, no se inducirá la artritis y se aplicarán los fármacos.
- 2) Artritis temprana, se iniciará la aplicación de los fármacos el mismo día del refuerzo.
- 3) Artritis de larga evolución, se iniciará la aplicación de los fármacos dos semanas después del refuerzo.

Por cada grupo se emplearan 55 ratones machos de la cepa DBA1/OlaHsd (Harlan México) de 8 semanas de edad.

Inducción de artritis por colágena en ratones

Ratones machos de la cepa DBA1/OlaHsd (Harlan México) con 8 semanas de edad (que incluye una semana de adecuación en el bioterio), se inyectarán en la base de la cola con 100µg de colágena tipo II de pollo (SIGMA St. Louis MO No. Cat. C9301-100mg) diluida en 20 mL de ácido acético 5 mM, emulsificada 1:1 en adyuvante completo de Freund (ACF) (SIGMA St. Louis MO No. Cat. F5881). Tres semanas después se hará un refuerzo con la misma cantidad de colágena disuelta en adyuvante incompleto de Freund (AIF) (SIGMA St. Louis MO No. Cat. F5506). Los ratones se examinarán cada semana durante 12 semanas a partir de la primera inyección de colágena y se registrará el desarrollo de artritis de acuerdo a la siguiente escala: 1.- Eritema de dedos, 2.- Eritema e inflamación de la pata, 3.- Edema de tobillos, 4.- Edema e incapacidad de movimiento en toda la extremidad. La evaluación se hará en forma ciega, por un mismo observador.

En lo referente a la reacción inflamatoria severa provocada por el adyuvante completo de Freund, se debe enfatizar que forma parte fundamental del desarrollo de la artropatía ya que es precisamente este mecanismo el que se encarga de montar una respuesta inflamatoria suficientemente agresiva y de tiempo prolongado como para generar clonas reactivas específicas para la colágena tipo II y con ello una robusta respuesta celular. Asimismo se requiere de un refuerzo con el adyuvante incompleto de Freund para generar una respuesta humoral. Ambos mecanismos son necesarios para semejar lo más posible el modelo murino con la enfermedad que se presenta en los humanos.

De acuerdo a la experiencia previa obtenida del protocolo intitulado "Efecto del pentapéptido antiinflamatorio producido por *E. histolytica* en un modelo murino de artritis por inyección de colágena" con número de registro CINVA: 177 nuestro grupo no encontró efectos adversos detectables.

Durante el transcurso de las 15 semanas que comprende el experimento, se valorará la progresión inflamatoria en cada animal, midiendo el grosor de las 10 articulaciones (vernier), temperatura, peso y

tonicidad muscular. El dolor es uno de los parámetros que se presentaran en el modelo dado a la grave inflamación que se produce. En estudios de casuística se ha determinado que las P MEC tienen la propiedad de disminuir el dolor. Por lo tanto, éste se evaluará en los distintos tratamientos a través de método de hiperalgesia térmica. Este método consiste en colocar al ratón sobre una plancha a 40°C y se evalúa el tiempo en segundos en que retira las patas.

Los ratones se dividirán en 6 grupos:

- a) Grupo control negativo: constará de 5 ratones a los que no se inducirá la artritis y se tratarán con 100 µl de amortiguador de citratos vía subcutánea dorsal (vehículo del Matrikel).
- b) Grupo control positivo: constará de 10 ratones con artritis tratados con 100 µl de vehículo vía subcutánea dorsal.
- c) Grupo tratado con el estándar de oro: constará de 10 ratones tratados con 100 µl de metotrexato vía subcutánea dorsal.
- d) Grupo tratado con Matrikel (1.0/9.0): constará de 10 ratones tratados con 100 µl de Matrikel (1:9) vía subcutánea dorsal.
- e) Grupo tratado con Matrikel (1.5/8.5): constará de 10 ratones tratados con 100 µl de Matrikel (1.5/8.5) vía subcutánea dorsal.
- f) Grupo tratado con Matrikel (3.0/7.0): constará de 10 ratones tratados con 100 µl de Matrikel (3.0/7.0) vía subcutánea dorsal.

Las aplicaciones de los medicamentos serán semanales durante 6 semanas. Cinco animales de cada uno de los grupos, serán sacrificados en la sexta y la décimo tercera semanas con el fin de obtener, el tejido articular y las células del bazo, para valorar infiltrado inflamatorio, las poblaciones celulares predominantes, expresión de citocinas y el recambio de la matriz extracelular.

Se obtendrán las patas de cada sacrificio, se fijarán, cortarán y teñirán por la técnica de HyE y PAS.

En estos mismos tejidos se determinará la presencia de IL-17, IL-10, Foxp3 ó IDO por medio de la técnica de inmunoperoxidasa.

Se obtendrán los bazos de los ratones y de ellos se extraerán las células totales de las cuales se aislarán las células mononucleares por medio de un gradiente de densidad. Las células serán separadas por selección positiva en B y no B mediante perlas magnéticas con anticuerpos anti-CD19 (Miltenyi) y se teñirán con los anticuerpos mencionados anteriormente para ser evaluadas por citometría de flujo.

7.1 Tamaño de Muestra. Por ser un estudio con ratones singénicos, se requiere de al menos tres especímenes por grupo.






7.2 Mediciones Fisiológicas. Durante el transcurso de las 15 semanas que comprende cada experimento, se valorará la progresión inflamatoria en cada animal, midiendo el grosor de las 10 articulaciones, temperatura, peso y tonicidad muscular. El dolor es uno de los parámetros que se pretende evaluar en el modelo para lo que se empleará el método de hiperalgesia térmica.

7.3 Alimentación. Libre de patógenos, en pellets, *Ad libitum*.

7.4 Agua. Esterilizada por autoclave y acidificada, *Ad libitum*.

7.5 Maniobras Conductuales. Ninguna

7.6 Modificaciones Ambientales. Se emplearán cajas de policarbonato de piso sólido con microaislador. La cama será de álamo estéril, con una densidad poblacional de 2 a 5 ratones por caja, a condiciones de temperatura, humedad y ventilación estándar, iluminación y ciclos de luz/obscuridad normal.

Los ratones adquiridos son libres de patógenos y se manejarán en éstas condiciones. Se tienen cajas, camas, alimento y agua estéril. Además las cajas tienen microaisladores. Todo lo anterior reduce al mínimo las posibilidades de infección por *Mycoplasma arthritidis*.

7.7 Restricción Física y Ejercicio. Ninguna.

7.8 Inmunización. Se inyectarán en la base de la cola con 100µg de colágena tipo II emulsificada 1:1 en adyuvante completo de Freund. Tres semanas después se hará un refuerzo con la misma cantidad de colágena en adyuvante incompleto. Se empleará para ello jeringas de insulina.

7.9 Administración de Medicamentos. Para probar el efecto de las P MECM en la artritis inducida por colágena, se inyectarán 100 µl de los diferentes biofármacos en región subcutánea dorsal.

7.10 Inoculación de Agentes Biológicos. Ninguna.

7.11 Uso de Sustancias Peligrosas. Ninguna.

7.12 Radiaciones. Ninguna.

7.13 Trauma. Ninguno.

7.14 Cirugía. Ninguna.

7.15 Obtención de Muestras. Bazo, ganglio, articulación de las patas.

Handwritten signatures and initials on the right margin, including a large signature at the top, a signature in the middle, and initials at the bottom.

7.16 Obtención de Tejidos. Durante el transcurso de las 15 semanas que comprende el experimento, se valorará la progresión inflamatoria en cada animal, midiendo el grosor de las 10 articulaciones, temperatura y tonicidad muscular además se obtendrán los especímenes necesarios de bazo, los ganglios, el tejido articular, hígado, pulmones, riñones y corazón con el fin de valorar infiltrado inflamatorio y las poblaciones celulares predominantes en él, expresión de citocinas y el recambio de la MEC.

Se tomará la pata izquierda trasera y la delantera para aislar la articulación. Ésta se tratará con 1-2 mL de una solución de Colagenasa tipo II y/o IV de Clostridium diluida al 0.25% en medio de cultivo sin suero (ya que éste contiene inhibidores enzimáticos) o solución de Hanks (0.15 g de enzima se adicionan a 60 mL de medio o solución de Hanks). La enzima debe prepararse al momento del uso en condiciones no estériles, disolviéndola con la ayuda de un agitador magnético durante 5 min. Posteriormente la solución se filtra en una membrana de 0.22 μ m de poro. Se debe poner especial atención al pH del medio ya que en condiciones alcalinas la enzima se inactiva. De alcalinizarse el medio se sugiere acidificarlo burbujeando directamente con CO₂. El tejido se incubará durante 2 a 4 h a 37°C, agitando constantemente. La suspensión se centrifugará durante 10 min a 1500 rpm y el paquete se lavará dos veces con medio de cultivo suplementado con SFB el cual se eliminará en su totalidad. Las células se incubarán durante 1 h para que las adherentes se puedan pegar. Las no adherentes se tomarán y se lavarán 2 veces con PBS 0.05 M, pH 7.2-7.4.

7.17 Protocolo de selección positiva para células B CD19⁺

Los bazos obtenidos se perfundirán con PBS/EDTA al 2% y se resuspenderán 1X10⁷ céls en 40 μ l de buffer MACS (350-450 μ l). Se agregarán 10 μ l de CD19 MicroBeads por cada 1X10⁷ células (40-60 μ l), se mezclarán e incubarán por 30 mins en cama de hielo y en agitación. Las células se lavarán con 1 ml de buffer MACS por cada 1X10⁷ células (1 ml) y se centrifugarán a 1500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se eliminará mediante aspiración y el botón se resuspenderá en 500 μ l de buffer MACS. La columna MS se humectará dejando pasar 3 ml de buffer MACS y posteriormente se agregará la suspensión celular. Se recolectarán todas las células no-B CD19⁻ que salgan de la columna en un tubo estéril y se lavará la columna con 3 mL de buffer MACS, 3 veces. Finalmente se adicionarán 5 mL de buffer MACS, se separará la columna del magneto, se introducirá el émbolo en la columna presionando con fuerza y firmeza para recuperar las células B CD19⁺. Ambas poblaciones se lavarán con 6 ml de buffer MACS y se centrifugarán a 1500 rpm durante 10 minutos. Las células CD19⁺ se teñirán para fenotipificar las células B reguladoras productoras de IL-10, las células CD19⁻ se teñirán para inmunofenotipificar las células Tregs, Th17 y DCregs, por citometría de flujo.

7.18 Técnica de tinción para la fenotipificación de células B reguladoras

1. Las células B CD19⁺ se dividirán en 11 tubos:

1.1. Células permeabilizadas sin teñir (ST)

1.2. Ctl de isotipos (γ FITC, γ PE, CD45PeCy): 5 μ L de TriTEST Control (BD Biosciences, San Diego, CA)

1.3. Ctl de isotipo de IL-10: 3 μ L del anticuerpo anti-CD38-PECy5 (BD Biosciences)
3 μ L del anticuerpo anti-CD24-FITC (BD Biosciences)

- 1.4. Céls B CD19⁺: 3 μ L del anticuerpo anti-CD38-PECy5 (BD Biosciences)
3 μ L del anticuerpo anti-CD19-PE (eBioscience)
- 1.5. Céls B CD19⁺: 3 μ L del anticuerpo anti-CD38-PECy5 (BD Biosciences)
3 μ L del anticuerpo anti-CD19-PE (BD Biosciences)
- 1.6. Céls B CD19⁺: 3 μ L del anticuerpo anti-CD38-PE (BD Biosciences)
3 μ L del anticuerpo anti-IgG-PECy5 (BD Biosciences)
- 1.7. Céls B CD19⁺: 3 μ L del anticuerpo anti-CD38-PECy5 (BD Biosciences)
3 μ L del anticuerpo anti-IgM-APC (BD Biosciences)
- 1.8. Céls B CD19⁺: 3 μ L del anticuerpo anti-CD38-PECy5 (BD Biosciences)
3 μ L del anticuerpo anti-CD24-FITC (BD Biosciences)
3 μ L del anticuerpo anti-CD5-PE (BD Biosciences)
- 1.9. Céls B CD19⁺: 3 μ L del anticuerpo anti-CD38-PECy5 (BD Biosciences)
3 μ L del anticuerpo anti-CD24-FITC (BD Biosciences)
3 μ L del anticuerpo anti-CD20-APC (BD Biosciences)
- 1.10. Céls B CD19⁺: 3 μ L del anticuerpo anti-CD38-PECy5 (BD Biosciences)
3 μ L del anticuerpo anti-CD24-FITC (BD Biosciences)
3 μ L del anticuerpo anti-CD27-APC (BD Biosciences)
- 1.11. Céls B CD19⁺: 3 μ L del anticuerpo anti-CD38-PECy5 (BD Biosciences)
3 μ L del anticuerpo anti-CD1d-FITC (eBioscience)
2. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad
3. Lavar una vez con 1.0 mL de PBS 0.05. pH 7.2-7.4, centrifugar a 1500 rpm, durante 6 minutos y aspirar el sobrenadante
4. Adicionar a todos los tubos 200 μ L de la solución Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, San Diego, CA. No. Cat 554714) para permeabilizar las células e incubar durante 20 minutos en hielo y en oscuridad
5. Adicionar 1mL de solución de lavado (permwash diluida 1mL del concentrado en 9mL de agua destilada desionizada), centrifugar durante 6 min a 1500 rpm y aspirar totalmente el sobrenadante
6. Fijar con paraformaldehído al 1% en PBS, las células no teñidas (1.1) y las del control de isotipo (1.2).
7. Adicionar a los tubos
- 1.4-1.7: 50 μ L de solución de lavado (permwash)+ 5 μ L del anticuerpo anti-IL-10-FITC (Bender MedSystems)
- 1.8-1.14: 50 μ L de solución de lavado (permwash)+ 5 μ L del anticuerpo anti-IL-10-PE (BD Biosciences)
- 1.3: 50 μ L de solución de lavado (permwash)+ 5 μ L del anticuerpo de rata anti-IL-10-PE (BD Biosciences)
8. Incubar durante 30 minutos en hielo y en oscuridad
9. Lavar con 1.0mL de la solución de lavado (permwash), centrifugar durante 6 minutos a 1500rpm y aspirar el sobrenadante
10. Resuspender en 300 μ L de paraformaldehído al 1% en PBS.

7.19 Técnica de Tinción para IL-17 intracelular

1. Se tomarán 2×10^5 células no-BCD19⁻ para cada prueba.
2. Adicionar 5 μ L del anticuerpo anti-CD4⁺-PerCP y 5 μ L de anti-CD196⁺-FITC (BD Biosciences, San Diego, CA).
3. Incubar durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad.
4. Lavar dos veces con 1.0 mL de PBS 0.05 M, pH 7.2-7.4.
5. Centrifugar a 1500 rpm, durante 8 minutos y aspirar el sobrenadante.
6. Adicionar 200 μ L de la solución Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) para permeabilizar las células.
7. Incubar durante 20 min en hielo y en oscuridad.
8. Adicionar 1 mL de solución de lavado (permwash diluida 1 mL del concentrado en 9 mL de agua destilada).
9. Centrifugar durante 8 min a 1500 rpm.
10. Aspirar el sobrenadante totalmente y a las células teñidas con el anti-CD4-PerCP y anti-CD196-FITC adicionar 50 μ L de solución de lavado (permwash) y 5 μ L del anticuerpo anti-IL-17-PE.
11. Incubar durante 30 min en hielo y en oscuridad.
12. Lavar con 1.0 mL de la solución de lavado (permwash).
13. Centrifugar durante 8 min a 1500 rpm y aspirar el sobrenadante.
14. Resuspender en 0.5 mL de formaldehído al 3% en PBS.

7.20 Técnica de Tinción para IDO

1. Se tomarán 2×10^5 células no-BCD19⁻ para cada prueba.
2. Adicionar 5 μ L de los anticuerpos anti-CD123-PECy5 y anti-CD196-PE (BD Biosciences).
3. Incubar durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad.
4. Lavar una vez con 1.0 mL de PBS 0.05 M, pH 7.2-7.4.
5. Centrifugar a 1500 rpm, durante 8 minutos y aspirar el sobrenadante.
6. Adicionar 200 μ L de la solución Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) para permeabilizar las células.
7. Incubar durante 20 min en hielo y en oscuridad.
8. Adicionar 1 mL de solución de lavado (permwash diluida 1 mL del concentrado en 9 mL de agua destilada).
9. Centrifugar durante 8 min a 1500 rpm.
10. Aspirar el sobrenadante totalmente de las células teñidas con el anti-CD123-PECy5 y anti-CD196-PE.
11. Adicionar 50 μ L de solución de lavado (permwash) y 5 μ L del anticuerpo anti-IDO.
12. Incubar durante 30 min en hielo y en oscuridad.
13. Lavar con 1.0 mL de la solución de lavado (permwash).
14. Centrifugar durante 8 min a 1500 rpm y aspirar el sobrenadante.
15. Adicionar 50 μ L de solución de lavado (permwash) y 5 μ L del anticuerpo anti-sheep-FITC diluido 1:200 en PBS (preparar la dilución al momento del uso).

16. Incubar 15 min en hielo y oscuridad.
17. Lavar 3 veces con 1.0 mL de la solución de lavado (permwash), agitando en vortex después de cada lavado.
18. Centrifugar durante 8 min a 1500 rpm y aspirar el sobrenadante.
19. Resuspender en 350 μ L de paraformaldehído al 3% en PBS.

Las muestras se evaluarán en un citómetro (FACScanto) empleando el programa Cell Quest o FlowJo para su análisis. Se determinarán al menos 50000 eventos en cada ventada de la subpoblación analizada.

7.21 Técnica de inmunohistoquímica

1. Desparafinar durante 45 min a 54°C en el horno.
2. Hidratar el tejido sumergiendo las laminillas en:
 - Xileno durante 3 min y en agitación
 - Alcohol al 100% durante 3 min y en agitación
 - Alcohol al 96% durante 3 min y en agitación
 - Alcohol al 50% durante 3 min y en agitación
 - Agua destilada durante 3 min y en agitación
3. Posteriormente las laminillas se incuban con una solución de H₂O₂ al 3 % en metanol absoluto (1:9 vol/vol) durante 10 a 20 min, para eliminar la actividad de peroxidasa endógena.
4. Lavar las laminillas con PBS 0.1 M, PH 7.2-7.4, 1 vez durante tres min. Eliminar el exceso de amortiguador con un pedazo de papel higiénico, cuidando de no tocar el tejido y de que éste nunca se seque, en ninguno de los pasos, ya que esto produce pegado inespecífico.
5. Los sitios de pegado inespecífico se bloquean con albúmina de huevo al 3% (en PBS) o anticuerpos provenientes del Kit ABC staining (Vector Staining) durante 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda.
6. Eliminar el exceso de solución bloqueadora (no lavar).
7. Los tejidos se incuban durante 18 a 24 h a 4°C con el anticuerpo primario diluido a una concentración de 10 μ g/ml en albúmina al 3%.
8. Lavar las laminillas con PBS 0.1 M, PH 7.2-7.4, 3 veces durante tres min cada lavado. Eliminar el exceso de amortiguador con un pedazo de papel higiénico, cuidando de no tocar el tejido.
9. Se emplea el anticuerpo secundario biotinado correspondiente y los tejidos se incuban durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda (generalmente se utiliza la concentración sugerida en el inserto).
10. Lavar las laminillas con PBS 0.1 M, PH 7.2-7.4, 3 veces durante tres min cada lavado. Eliminar el exceso de amortiguador con un pedazo de papel higiénico, cuidando de no tocar el tejido.
11. A continuación se emplea el complejo avidina-peroxidasa diluido a la concentración sugerida, con el que se incuba durante 1 h a temperatura ambiente.

12. Lavar las laminillas con PBS 0.1 M, PH 7.2-7.4, 3 veces durante tres min cada lavado. Eliminar el exceso de amortiguador con un pedazo de papel higiénico, cuidando de no tocar el tejido.
13. La reacción se desarrolla empleando una solución de 6 mg de diaminobencidina en 10 ml de Tris-HCl 0.05 M, pH 7.6 y 10 μ l de H₂O₂ al 30% durante 10 min. Esta reacción produce un precipitado de color sepia en las células inmunorreactivas.
14. Las laminillas se lavan con agua destilada una vez.
15. Las muestras se contratiñen con hematoxilina de Harris durante 2 a 10 min. Se elimina el exceso de colorante con agua destilada.
16. Se vira la tinción con una solución saturada de carbonato de litio durante 10 segundos y se lavan las laminillas con agua destilada.
17. El tejido se deshidrata:
 - Con alcohol al 50% durante 5 min en agitación
 - Alcohol al 96% durante 5 min
 - Alcohol absoluto durante 5 min
 - Solución de alcohol absoluto/xileno (vol/vol) durante 5 min
 - Xileno y se montan con resina.
18. En el control negativo se sustituye el primer anticuerpo por uno no relacionado (suero normal de humano diluido 1:100 o suero normal del animal en el que esté preparado el anticuerpo primario).
19. Se requiere de un control positivo, un tejido en el que se conozca que se expresa el antígeno a buscar.
20. Se requiere un blanco de reactivos, en el que se reemplaza el anticuerpo primario por albúmina de huevo al 3% en PBS 0.01 M, pH 7.4.

El método de eutanasia se llevara acabo a través cámara de CO₂.

7.22 Disposición de los Cadáveres. Los cadáveres por ser biológicos no infecciosos se separarán en bolsas transparentes y se enviarán a incinerar.

Todos los animales se mantendrán bajo la norma 062-ZOO-1999.

El punto final del estudio será cuando el animal no pueda mover la extremidad debido a la artritis o cuando el estudio pudiera complicarse de tal forma que se produzca en el animal un sufrimiento innecesario por ejemplo, que deje de comer o beber, que presente automutilación de la parte afectada o bien produzca vocalizaciones. Además se revisara a los ratones dos veces por semana en el sitio de inyección para determinar que no se observe necrosis. Una vez por semana se tomara la temperatura corporal y se pesaran con una balanza electrónica para determinar el grado de la caquexia.

Resultados esperados

Se determinará la proporción más efectiva del Matrikel para la modificación de la progresión de la artritis. Se elucidará si esta nueva opción terapéutica induce la tolerancia periférica mediada por células Tregs, Bregs y/o DCregs y proporcionará resultados sólidos para la aprobación de protocolos clínicos de fase I.

Obtención de un biofármaco único en el mundo, para el tratamiento de la AR y otras enfermedades inflamatorias, que no produce efectos adversos y de costo menor, comparativamente a las bioterapias actuales.

Infraestructura disponible

Contamos con la infraestructura que proveen las instituciones participantes:

1. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición. El laboratorio de Inmunología Celular del Departamento de Inmunología y Reumatología, cuenta con un área designada para proyectos de investigación, así como el equipo necesario para el correcto procesamiento y almacenamiento de muestras. Se cuenta con un FACScan en el departamento cuyo tiempo de uso es de 20 años, por lo que se solicita presupuesto para la compra de un equipo de citometría nuevo. También se tiene bioterio para desarrollar el estudio, área de oficinas, computadora con internet, personal de limpieza y secretarías.

Programa de actividades anual

1. Preparación del material. (Duración 2 meses). Durante esta etapa se solicitará los reactivos y animales necesarios para el desarrollo del modelo y procesamiento de las muestras y se estandarizarán los métodos de tinción celular. Se determinarán todas las evaluaciones clinimétricas.
2. Desarrollo del modelo (Duración 6 meses). En esta etapa se realizarán la tipificación de subpoblaciones celulares mediante FACS. Se obtendrán los tejidos que se teñirán con H&E y se realizarán las inmunohistoquímicas propuestas.
3. Análisis de resultados. (Duración 4 meses). En esta fase se reunirán todos los resultados de laboratorio y los datos clinimétricos y se presentarán para su discusión por los participantes del proyecto. También se prepararán informes y presentaciones de resultados preliminares en juntas y reuniones científicas.
4. Preparación del manuscrito para publicación (Duración 3 meses). Se discutirán los resultados finales entre los participantes del proyecto y se redactarán el/los manuscrito(s) que se deriven del proyecto. Se enviarán a publicación en revistas indizadas. Se llevará a cabo el trámite de las patentes.

Presupuesto

- a) Gasto corriente comprende los materiales y reactivos para el desarrollo del modelo de CIA (adquisición de ratones, adyuvantes y colágena tipo II, así como el mantenimiento de los mismos). Obtención y procesamiento de las muestras, tales como: Perlas MACS, magnetos,

columnas miniMACS, Anticuerpos (IL-4PE, IFN- γ PE, IFN- γ FITC, CD4PECy5, CD4PE, CCR6PE, CD127PE, CD14PE, IDOFITC, CD8FITC, CD8PeCy5, IL-17APE, FoxP3PE), Cytofix/Cytoperm, Golgi Plug, tubos de poliestireno de fondo redondo para citometría, BDFACSFlow Sheath Fluid 20l, lymphoprep Axis-Shield PoC AS Oslo, Norway, pipetas de 2, 5, 10 y 25 ml estériles empaquetadas individualmente, Tubos Falcon de 15 y 50 ml, cajas petri, jeringas de insulina, medio de cultivo RPMI-1640, albúmina micropipetas, puntas para micropipetas, guantes, placas, papelería, trámite de patente, medicamentos (matricinas y colágena polimerizada tipo I).

El monto aproximado de este rubro es de \$1'150,000.00

b) Gasto de inversión

En este protocolo se solicita apoyo financiero para la compra de un citómetro de flujo ya que con el que contamos en el departamento desde hace 20 años, se encuentra fallando. Actualmente este modelo ya salió del mercado por lo que no existen refacciones para repararlo. Asimismo se solicita apoyo para la compra de un crióstato para realizar los cortes de los tejidos para las tinciones.

El monto aproximado de este rubro es de \$2'500,000.00

Estrategia de apropiación de la propiedad intelectual de los resultados del proyecto tecnológico

Obtención de la patente de molécula y de uso del Matrikel (Patente PCT)

Descripción de los impactos y los beneficios del proyecto tecnológico

Obtención de un biofármaco único en el mundo para el tratamiento de la AR y otras enfermedades inflamatorias, que no produce efectos adversos y de costo menor comparativamente a los tratamientos actuales con biológicos.

- a) Publicación de artículo(s) original (es) en revistas científicas con arbitraje estricto. Esperamos publicar nuestros resultados en la revista Arthritis & Rheumatism, que cuenta con el mayor factor de impacto en el área de Reumatología.
- b) Graduados de doctorado y maestría.
El proyecto incorporará y permitirá la graduación de un alumno de doctorado.
- c) Presentación de trabajos arbitrados, en Congresos Científicos de reconocido prestigio.
Los resultados se presentarán en al menos una reunión internacional y una nacional del área de Reumatología y/o Inmunología.
- d) Se determinará la proporción más efectiva del Matrikel para la modificación de la progresión de la artritis inducida por colágena. Se elucidará si esta nueva opción terapéutica induce la tolerancia periférica por células Tregs, Bregs o DCregs .
- e) Se iniciará la apropiabilidad de los resultados obtenidos mediante el registro de la propiedad intelectual, el desarrollo de una patente mexicana y patentes PCT.

Acciones encaminadas a la explotación de los resultados del proyecto

Desarrollo de estudios clínicos fase I, II, III y IV, empleando el biofármaco de estudio (Matrikel) en el tratamiento de pacientes con AR.

Referencias bibliográficas

1. Almazán Díaz A, de la Cruz García JC, Lira Romero JM, et al. Investigación experimental de la regeneración ósea en fémures de rata después de la aplicación de colágena I polimerizada: Estudio radiológico, histológico e inmunohistoquímico. *Rev Méx. Ortop Traum* 1996;10:142-52.
2. Arroyo AG, Iruela-Arispe M. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovasc Res* 2010.
3. Bauer K, Knipper A, Tu-Rapp H, et al. Perforin deficiency attenuates collagen-induced arthritis. *Arthritis Research* 2005;7:877-84.
4. Bellon G, Martiny L, Robinet A. Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:203-20.
5. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nature protocols* 2007;2:1269-75.
6. Chimal-Monroy J, Bravo-Ruiz T, Krötzsch-Gómez FE, Díaz de León L. Implantes de Fibroquel aceleran la formación de hueso nuevo en defectos óseos inducidos experimentalmente en cráneos de rata: un estudio histológico. *Rev Biomed* 1997;8:81-8.
7. Chimal-Monroy J, Bravo-Ruiz T, Furuzawa-Carballeda GJ, et al. Collagen-PVP accelerates new bone formation of experimentally induced bone defects in rat skull and promotes the expression of osteopontin and SPARC during bone repair of rat femora fractures. *Ann NY Acad Sci* 1998;857:232-6.
8. Duca L, Debelle L, Debret R, Antonicelli F, Hornebec W, Haye B. The elastin peptides-mediated induction of pro-collagenase-1 production by human fibroblasts involves activation of MEK/ERK pathway via PKA- and PI(3)K-dependent signaling. *FEBS Lett* 2002;524:193-8.
9. Duca L, Floquet N, Alix AJ, Haye B, Debelle L. Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:235-44.
10. Dzhambazov B, Nadakumar K S, Kihlberg J. Therapeutic Vaccination of Active Arthritis with a Glycosylated Collagen Type II I Complex with MHC Class II Molecules. *J Immunol* 2006;176:1525-33.
11. Furuzawa-Carballeda J, Alcocer-Varela J. Interleukin-8, Interleukin-10, Intracellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression Levels are higher in Synovial Tissue from patients with Rheumatoid Arthritis than in Osteoarthritis. *Scand J Immunol* 1999;50:215-22.
12. Furuzawa-Carballeda J, Alcocer-Varela J, Diaz de León L. Collagen-PVP decreases collagen turnover in synovial tissue cultures from rheumatoid arthritis patients. *Ann NY Acad Sci* 1999;878:508-602.
13. Furuzawa-Carballeda J, Alcocer-Varela J, Díaz de León L. Mediators of inflammation are down-regulated meanwhile apoptosis is up-regulated in rheumatoid arthritis synovial tissue by polymerized-collagen. *Clin Exp Immunol* 2002;130:140-9.
14. Furuzawa-Carballeda J, Cabral AR, Zapata-Zúñiga M, Alcocer-Varela J. Subcutaneous administration of polymerized-type I collagen for the treatment of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003;30:256-9.
15. Furuzawa-Carballeda J, Rojas E, Valverde M, Castillo I, Díaz de León L, Krötzsch-Gómez FE. Cellular and humoral responses to collagen-polyvinylpyrrolidone administered during short and long periods in humans. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:1029-35.
16. Furuzawa-Carballeda J, Krötzsch-Gómez FE, Espinosa-Morales R, Alcalá M, Barile-Fabris L. Subcutaneous administration of collagen-polyvinylpyrrolidone down-regulates IL-1beta, TNF-alpha,

- TGF-beta1, ELAM-1 and VCAM-1 expression in scleroderma skin lesions. *Clin Exp Dermatol* 2005;30:83-6.
17. Furuzawa-Carballeda J, Fenutria-Ausmequet R, Gil-Espinosa V, Lozano-Soto F, Teliz-Meneses MA, Romero-Trejo C, Alcocer-Varela J. Polymerized-type I collagen for the treatment of patients with rheumatoid arthritis. Effect of intramuscular administration in a double blind placebo-controlled clinical trial. *Clin Exp Rheumatol* 2006;24:521-8.
 18. Furuzawa-Carballeda J, Macip-Rodríguez PM, Cabral AR. Osteoarthritis and rheumatoid arthritis pannus have similar qualitative metabolic characteristics and pro-inflammatory cytokine response. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:554-60.
 19. Furuzawa-Carballeda J, Muñoz-Chable OA, Barrios-Payán J, Hernández-Pando R. Effect of Polymerized-Type I Collagen in knee osteoarthritis. I. In vitro Study. *Eur J Clin Invest* 2009;39:591-7.
 20. Furuzawa-Carballeda J, Muñoz-Chable OA, Macías-Hernández SI, Agualimpia-Jannig A. Effect of Polymerized-Type I Collagen in knee osteoarthritis. II. In vivo Study. *Eur J Clin Invest* 2009;39:598-606.
 21. Furuzawa-Carballeda J, Lima G, Uribe-Uribe N, Ávila-Casado C, Mancilla E, Morales-Buenrostro LE, Pérez-Garrido J, Pérez M, Cárdenas G, Llorente L, Alberú J. High levels of IDO-expressing CD16+ peripheral cells, and Tregs in graft biopsies from kidney transplant recipients under Belatacept treatment. *Transplantation Proceedings*, 2010;42:3489-96.
 22. Furuzawa-Carballeda J, Lima G, Jakez-Ocampo J, Llorente L. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-expressing peripheral cells in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. *Eur J Clin Invest*, 2011;41:1037-46.
 23. Furuzawa-Carballeda J, Macip-Rodríguez P, Galindo-Fería AS, Cruz-Robles D, Soto-Abraham V, Escobar-Hernández S, Aguilar D, Alpizar-Rodríguez D, Férrez-Blando K, Llorente L. Polymerized-Type I Collagen induces Up-Regulation of Foxp3-expressing CD4 regulatory T cells and Down-Regulation of IL-17-producing CD4+ T cells (Th17) cells in collagen-induced arthritis. *Clin Develop Immunol*, 2012;2012:618608, 11 pages
 24. Furuzawa-Carballeda J, Macip-Rodríguez PM, Cruz-Robles D, Soto-Abraham V, Vargas-Rojas MI, Díaz-Zamudio M, Godina-González S, Alpizar-Rodríguez D, Limón-Camacho L, Escobar-Hernández S. Anti Inflammatory effect of polymerized type I Collagen (Polymerized-IClg) vs. other modified extracellular matrix proteins (MECMPs) in CIA. *Int Proc Div Immunol*, 2007;269-75. ISBN 978-88-7587-380-6
 25. Griffiths MM, Eichwald EJ, Martin JG, Smith CB, De Witt CW. Immunogenetic control of experimental type II collagen-induced-arthritis. I. Susceptibility and resistance among inbred strains of rats. *Arthritis Rheum* 1988;24:781-9.
 26. Holmdahl R, Andersson M, Goldschmidt TJ, Gustafsson K et al. Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis. *Immunol Rev* 1990;118:193-232.
 27. Kwoh C, Anderson LG, Greene MJ. Guidelines for Management of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:328-46.
 28. Kremers HM, Nicola P, Crowson CS. Therapeutic Strategies in Rheumatoid Arthritis Over a 40-year period. *J Rheumatol* 2004;31: 2366-73.
 29. Krötzsch-Gómez FE, Furuzawa-Carballeda J, Reyes Márquez R, et al. Cytokine expression is down regulated by collagen-polyvinilpyrrolidone in hypertrophic scars. *J Invest Dermatol* 1998;111:828-34.
 30. Lange F, Bajtner E, Rintisch C. Methotrexate ameliorates T cell dependent autoimmune arthritis and encephalomyelitis but not antibody induced or fibroblast induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:599-605.

31. Maquart FX, Pasco S, Ramont L, Hornebeck W, Monboisse J-C. An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity implication in tumor invasion. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:199-202.
32. Maquart FX, Bellon G, Pasco S. Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie* 2004;87:353-9.
33. May E, Dorris ML, Satumtira N, Iqbal I, Rehman MI, Lightfoot E, Taurog JD. CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats. *J Immunol* 2003;170:1099-105.
34. Norma Oficial Mexicana -NOM-062-Z00-199. Especificaciones de técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
35. Pasco S, Ramont L, Maquart FX, Monboisse JC. Control of melanoma progresión by various matrikines from basement membrane macromolecules. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:221-33.
36. Robinet A, Fahem A, Cauchard J-H, Huet E, Vincent L, Lorimier S, Antonicelli F, Sorie C, Crepin M, Hornebeck W, Bellon G. Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP. *J Cell Sci* 2005;118:343-56.
37. Robinet A, Millart H, Oszust F, Hornebeck W, Bellon G. Binding of elastin peptides to S-Gal protects the heart against ischemia/reperfusion injury by triggering the RISK pathway. *FASEB J* 2007;21:1968-78.
38. Solinger AM, Stobo JD. Regulation of immune reactivity to collagen in human beings. *Arthritis Rheum* 1981;24:1057-64.
39. Shultz GS, Wysocki A. interactions between extracellular matrix and growth factor in wound healing. *Wound Rep Reg* 2009;17:153-62.
40. Sukar S, Tesmer LA, Fox A et al. Interleukin-17 as a Molecular Target in Immune- Mediated Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 2007;56:89-100.
41. Stuart JM, Watson WC, Kang AH. Collagen autoimmunity and arthritis. *FASEB J* 1988;2:2950-6.
42. Thompson HSG, Staines NA. Gastric Administration of Type II Collagen Delays the Onset and Severity of Collagen-Induced Arthritis in Rats. *Clin Exp Immunol* 1985;64:581-6.
43. Tran KT, Lamb P, Deng JS. Matrikines and matricryptins: Implications for cutaneous cancers and skin repair. *J Dermatol Scie* 2005;40:11-20.
44. Trentham DE, Dynesius-Trentham RA, Orav EJ, et al. Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. *Science* 1993;261:1727-30.
45. Tyagi SC, Simon SR. Regulation of neutrophil elastasa activity by elastin-derived peptide. *J Biol Chem* 1993;268:16513-8.
46. Zhang ZJ, Lee ChSY, Lider O, Weiner HL. Suppression of Adjuvant Arthritis in Lewis Rats by Oral Administration of Type II Collagen. *J Immunol* 1990;145:2489-94.

ANEXO
DIAGRAMA DE GANTT

META	6 mese s	6 meses	9 meses	12 meses	RESULTADOS
Búsqueda bibliográfica	X	X	X	X	Establecer las características del modelo
Establecer un protocolo de CIA para evaluar las diferentes condiciones de tratamiento	X				Tener un modelo biológico de evaluación de diversas mezclas de Colágena-Polimerizada con matricinas
Evaluación de los tratamientos: Citometría de flujo		X	X		Obtención y análisis de resultados por citometría de flujo
Histología		X	X		Obtención y análisis de resultados a nivel histológico
Histoquímica		X	X		Obtención y análisis de resultados a nivel inmunohistoquímico
				X	Trámite de patente y manuscritos

Handwritten signatures and initials on the right side of the page, including a large signature at the top and several smaller ones below it.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

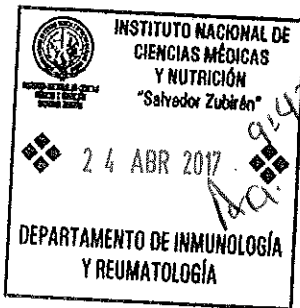
"2017, Año del centenario de la promulgación de la constitución política de los Estados Unidos Mexicanos"



INVESTIGACION EXPERIMENTAL Y
BIOTERIO

1375

INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS
Y NUTRUCION INCMYN "SZ"
México, D. F., a 21 de abril de 2017.



No. Oficio CINVA 008-17

Dra. Guadalupe Furuzawa Carballeda
Depto. Reumatología e Inmunología
Presente.

Estimada Dra. Furuzawa:

Derivado de la auditoria del Órgano Interno de Control (OIC) se realizó una revisión de los protocolos para subsanar las observaciones

"3. Establecer un mecanismo, para promover con los investigadores la importancia de la integración de los documentos que soporten o documenten cada una de las etapas del desarrollo de sus proyectos en los expedientes correspondientes a la aprobación de un proyecto, desarrollo, conclusión y cierre del mismo"

Por lo que su expediente con REF: CINVA IRE-585-12/12-1 le hace falta la siguiente información:

1. La forma única registro completa con firmas
2. Proyecto en extenso
3. FAEP
4. Informe final

Por lo que pido de su apoyo y me proporcione la información en calidad de URGENTE antes del 25 de abril, para poder realizar los trámites administrativos correspondientes.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión
de Investigación en Animales

Vº. Bo.

Dr. Gerardo Gamba Ayala
Presidente de la CINVA
Director de Investigación