

INCREMENTO EN LA PRODUCCION DE COLAGENASA EN INCUBADO DE SINOVIOCITOS DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA Y OSTEOARTROSIS

Hilda L. Montrull, Nilda Y. Brizuela, Silvia L. Demurtas, Alberto M. Strusberg,
Luis S. Spitale, Carlos I. Meirovich

Departamento de Farmacología y II Cátedra de Anatomía Patológica.
Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba

Resumen

El cartílago articular es un tejido paucicelular, con colágeno y proteoglicanos en la matriz extracelular.

Su degradación es función de los sinoviocitos, que segregan metaloproteasas que catabolizan a los proteoglicanos. Se distinguen los sinoviocitos A o macrofágicos y los sinoviocitos B o fibroblásticos. La destrucción de proteoglicanos puede ser LT- dependiente o independiente.

Nuestro objetivo fue estudiar *ex vivo* el rol de los sinoviocitos, sin la influencia del sistema inmune. Líquido sinovial de pacientes de ambos sexos, 70±2 años, con OA(6) y AR(6), vírgenes de tratamiento, se centrifugó 30 minutos a 1500 g, para aislar sinoviocitos. El sedimento se incubó 6 hs en medio Dulbecco-Eagles, con 26 mM de HEPES Gibco, NaHCO₃ (0.5g/l), glutamina (2 mM), estreptomina (100mg/l), penicilina (1 U/ml) y anfotericina B (2.5mg/l). Identidad y viabilidad celulares se determinaron con técnicas citopatológicas. Las muestras control provinieron de artritis traumática o patología osteoarticular no-inflamatoria.

Con anticuerpos monoclonales anti-MMPs(10µg/ml), previo bloqueo de producción de proteínas inespecíficas con albúmina sérica bovina, se midió actividad colagenasa (MMP-1) antes y después de incubar con ELISA-doble-sandwich. Con streptavidin-peroxidasa se desarrolló color y por absorbancia a 410 nm, se leyó la complejación de los anticuerpos marcados.

La secreción de MMP-1 por sinoviocitos AR fue 1373±115 ng/ml. Con 6 hs de incubado aumentó hasta 2143±132ng/l

(-56%)(p<0.0001), probablemente por la hiper celularidad. Los sinoviocitos OA secretaron 276 ± 23 ng/ml, y 542 ± 47 ng/ml tras la incubación (96%)(p<0.001).

Hay paralelismo entre la producción de MMP-1 y la observación microscópica. Sinoviocitos con abundante citoplasma corresponden a altos niveles de enzima. La baja secreción de MMPs responde a escasa población celular y núcleos picnóticos. Aunque en AR la producción de MMPs fue 4.6 veces mayor que en OA, en cambio el incremento porcentual tras la incubación fue casi el doble en OA que en AR.

Esos resultados confirman que la producción enzimática varía con la inflamación, que es mayor en los procesos agudos, y que la incubación de sinoviocitos permite detectar cambios patológicos locales.

Palabras Clave: sinoviocitos incubados - MMPs colagenasa - líquido sinovial - artritis reumatoidea - osteoartrosis.

Abstract

Cartilage is a specialized connective tissue. It contains few cells into an extracellular matrix. The matrix mainly constituents are collagen and proteoglycans. Its degradation depends on synoviocytes activity, that secrete metalloproteases, agents to proteoglycans catabolism. There are two types of synoviocytes: macrophagic (type "A:") and fibroblastic (type "B"). The proteoglycan destruction can be LT-dependent or LT-independent.

The aim of this work is synoviocytes function *ex vivo* study, free immune system influence. In order to do it, heparinized synovial

fluid samples were obtained from 6 osteoarthritic (OA) and 6 arthritic (RA) both sex untreated patients, diagnosed according ACR criteria, which disease duration was longer than 6 months. Patients average age was 70 ± 2 years. Control samples were synovial fluid from traumatic arthritis or non inflammatory bone-muscle pathology.

Synovial fluid was centrifugated at 1500 g for 30 minutes to isolate synoviocytes. Sediment containing cells was 6 hs incubed with Dulbecco-Eagles media, that has HEPES Gibco (26mM); NaHCO_3 (0.5g/l); glutamine (2mM), streptomycin (100mg/l), G-penicilline (1 U/ml); anphotericine B (2.5mg/l). Cells calification and viability were cytopathologically determined.

Before and after incubation, collagenase activity was measured by ELISA-double sandwich, using $10\mu\text{g/ml}$ monoclonal anti-MMPs in phosphate-buffer-saline. The antigen-antibody complex production with inespecific proteins was blocked by bovine seric albumine. Streptavidin peroxidase was added and washed with 2,2,azin,di(3-ethyl-benzotazoilinsuiphonic) acid to develop color. The link of labeled antibody by absorbance at 410 nm was determined in ELISA-spectrophotometer.

RA patients earlier MMPs synoviocytes production was $1373 \pm 115\text{ng/ml}$. Then 6hs incubation $2143 \pm 132\text{ng/ml}$ was reached. The increase (56%) had high significance ($p < 0.0001$).

OA earlier MMPs celis production was $276 \pm 23\text{ng/ml}$, but after incubation it reached $542 \pm 47\text{ng/ml}$. (96% increased with highly significativa difference too: $p < 0.0001$)

Microscopic study was carried out before and after incubation, and shows a lot of synoviocytes with plenty of cytopiasme when the collagenase levels were highest. On the contrary, when low MMPs production by synovial fluid, as no incubated osteoarthritic material, a few cells containing picnotics nucleous were observed..

Significant quantitative differences in AR and OA enzymatic secretion were observed. Although in rheumatoid arthritic MMPs levels synoviocytes production were 4.6 times than OA levels, after 6 hs incubation percentage of increase in OA cells secretion was highest.

Described results confirm MMP-1 synthesis by synoviocytes, and these levels correlate with inflammation, more pronounced in acute (RA) than chronic pathology (OA). Synoviocyte incubation let us to test disease changes in synovial fluid according to cells number and phagocytic activity.

Authors agree to assert that synovial fluid may reflect what is happening in an articular cartilago, because SF provides markers of joint disease. MMPs are giving information about pathways involved in OA and RA cartilage degradation,

Key words: synoviocytes incubated — mmps — collagenase — synovial fluid - rheumatoid arthritis — osteoarthritis.

Introducción

El cartílago es un tejido conectivo especializado compuesto por pocas células distribuidas en una gran matriz extracelular que le sirve de esqueleto.(1)

Dicha matriz es sintetizada por los condrocitos. Sus más importantes componentes estructurales son el colágeno tipo II y los proteoglicanos constituidos por glicosaminoglicanos unidos a una proteína "core", determinantes de las propiedades bioquímicas del cartílago.

En la cavidad de la articulación hay fibroblastos y "sinoviocitos" que son las células que rigen la destrucción articular, merced a cambios funcionales que quiebran el equilibrio entre la proliferación de sinoviocitos y la apoptosis o muerte celular programada. (2)

De acuerdo a los marcadores de superficie se reconocen dos tipos fundamentales de sinoviocitos. Los tipo A se relacionan con los macrófagos y los tipo B con los fibroblastos. (3)

Caracteriza al tipo "A" su actividad fagocítica, responsable de remover los detritus de la cavidad articular (4). En cambio la producción de ácido hialurónico con funciones lubricantes para la articulación es la principal función del sinoviocito "B", que además sintetiza numerosos componentes de la matriz. (5)

La expresión de ciertos oncogenes deriva de la alteración funcional de estas células

que proliferan y atacan al cartílago articular.(6)(7)

Por otra parte los sinoviocitos promueven síntesis de productos proinflamatorios de la cascada del ácido araquidónico (8), con el consiguiente incremento de radicales libres (ión superóxido, etc.) y activación de las enzimas capaces de degradar al colágeno y a los proteoglicanos. (9)

El catabolismo de la matriz está alterado en varias patologías que cursan con aumento de interleukina-1- β , el FNT- α y otros factores (10) que mediante la acción de proteasas incrementan su metabolismo y la destrucción de la matriz. (11)

La colagenasa es una metaloproteasa (MMP-1) que se libera como proenzima (12), y está involucrada en la destrucción del tejido conectivo propia de enfermedades como la artritis reumatoidea y la osteoartritis. (13).

La actividad de esta proteasa resulta de la modulación entre su liberación y activación y responde a los niveles de inhibidores endógenos como el factor tisular inhibidor de metaloproteinasas (TIMP) y la α -2 macroglobulina.(14)(15).

Esta destrucción mediada por sinoviocitos puede ser linfocito-T dependiente o linfocito-T independiente.(16)(17)

Toda enfermedad que afecta a los sinoviocitos altera su morfología, proliferación y muerte celular programada (apoptosis).(2)

Las pruebas específicas por enzimo-inmuno-ensayo han permitido el estudio in vivo de los metabolitos de la matriz cartilaginosa en el líquido sinovial. Estas moléculas representan productos de degradación de keratan-sulfato.

El objeto del presente trabajo radicó en estudiar los niveles de MMPs en el líquido sinovial de pacientes con OA y AR, y relacionarlos con la citología.

Material y Métodos

Se procesó líquido sinovial de seis (6) pacientes con artritis reumatoidea y seis (6) con osteoartritis, diagnosticados según criterios clínico-radiológicos de ACR (American College of Rheumatology), seropositivos, con

poliartritis activa e historia natural de la enfermedad mayor de seis meses.

Sirvieron de control muestras de líquido sinovial obtenido de pacientes con artritis traumática o desórdenes músculo - esqueléticos no inflamatorios.

Incubado de sinoviocitos:

Líquido sinovial, obtenido por punción de articulación de rodilla con finalidad diagnóstica o terapéutica, heparinizado durante la extracción, se centrifugó de inmediato durante 30 minutos a 1500 g, con el objeto de aislar sinoviocitos.

Para reducir viscosidad y turbidez, las muestras se trataron con hialuronidasa bovina durante una hora a temperatura ambiente, con una concentración final de 30 UI / ml. Previo al ensayo se centrifugó nuevamente.

El sedimento se incubó a 37°C durante 6 horas bajo atmósfera de carbógeno (CO₂ al 5% en oxígeno) en medio de Dulbecco modificado por Eagle, conteniendo 26 mg / ml de HEPES, 100 mg / ml de estreptomina, 100 UI / ml de penicilina y 2,5 mg / ml de anfotericina B. (18)

Las incubaciones se duplicaron para estudio de la citología y del tenor enzimático. La viabilidad celular se definió por la técnica de exclusión del Tripán Blue.

Citología:

Mediante coloración con hematoxilina-eosina se estudió la citología del sedimento antes y después de la incubación.

El estudio histológico siguió técnicas estandarizadas en nuestro laboratorio, que incluyen sucesivamente fijación en solución acuosa de formaldehído al 10%; deshidratación en alcoholes ascendentes (50%, 70%, 95% y alcohol absoluto); inclusión en xileno; inclusión en parafina "blanda" -punto de fusión 54° C- y parafina "dura" -punto de fusión 58° C-; y posterior sección con micrótopo por deslizamiento en cortes de 3 a 5 μ .

Instalados en portaobjetos, se colocaron en estufa a 60° C. Luego de desparafinar en xilol; se hidrató en alcoholes descendentes y se lavó con agua destilada. Después se coloreó con hematoxilina, se efectuó viraje en agua; se coloreó con eosina y por último los cortes se prepararon para microscopía con bálsamo de Canadá y cubreobjeto.

Determinación de colagenasa :

La colagenasa (MMP-1) se determinó por ELISA "doble-sandwich", con anticuerpos monoclonales específicos, preparados en buffer fosfato-salina (PBS) a una concentración de 10 mg / ml.

En cada minicubeta de una placa múltiple se vertieron 50 ml del preparado, dejando reposar toda la noche a 4° C. Se lavó tres veces con PBS y se adicionaron 200 ml de albúmina sérica bovina (BSA) diluida en PBS al 0.2%, para bloquear la formación de complejos antígeno-anticuerpo con otras proteínas no específicas.

El siguiente paso consistió en agregar colagenasa standard o incubado de sinoviocitos diluidos al 1 % en PBS-BSA. Acto seguido, tras lavar con el buffer, se agregó el anticuerpo monoclonal (2 mg / ml) y se dejó reaccionar durante 30 minutos a 37°C.

Luego de triple lavado con buffer, se añadieron 50 ml de una dilución 1/4000 de streptavidin peroxidasa, iniciando una reacción que duró 30 minutos a 37°C. Al concluir esa reacción las minicubetas se lavaron otras tres veces con PBS, y una vez con el buffer de sustrato ácido 2,2,azino-di (3-etil-benzotazolin-sulfónico) para permitir el desarrollo de color en presencia de peroxidasa.

La unión al anticuerpo marcado se leyó por absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro automático titulador ELISA Metrolab, que corresponde a la longitud de onda de la streptavidin-peroxidasa. (7) (8) (16). Fue referido a un valor standard, deteniéndose la reacción de color mediante el agregado de ácido sulfúrico 2M.

Análisis estadístico :

Los datos obtenidos por ELISA fueron analizados utilizando el test-t de Student modificado.-(10)(16)

Resultados

Colagenasa producida por sinoviocitos:

En los sinoviocitos no incubados de pacientes con artritis reumatoidea se detectaron 1373 ± 115 ng / ml de MMP-1. Esa cifra

aumentó a 2143 ± 132 ng / ml luego de 6 horas de incubación (Gráfico 1), lo que implica un incremento del 56%.

En los sinoviocitos de pacientes con osteoartritis los niveles preincubación de MMP-1 fueron 276 ± 23 ng / ml. Luego de las 6 hs de incubación, esa concentración aumentó el 96%, alcanzando a 542 ± 47 ng / ml.(Gráfico 2),.

En ambos casos el incremento post-incubación fue altamente significativo, con una $p < 0.001$. (Gráfico 3)

Citología de sinoviocitos:

Las microfotografías que muestran placas de sinoviocitos con abundante citoplasma. (Fig. 1) se corresponden con los niveles mas altos de colagenasa observados.

Los líquidos sinoviales de pacientes osteoarthriticos que no fueron incubados, mostraron pequeños grupos de sinoviocitos con núcleos picnóticos y baja producción de MMP-1.(Fig. 2)

Discusión

La incubación de sinoviocitos permite constatar diferencias en la citología del líquido sinovial en función de la patología del paciente. Diversos autores han advertido previamente que esas diferencias no sólo guardan relación con el número y la calidad de las células, sino que se expresan en la actividad fagocítica propia de los sinoviocitos de tipo O^{A} o macrófago-like. (3)

Su producción enzimática, particularmente referida a MMP-1 (colagenasa), describe luego de la incubación una curva ascendente que refleja su viabilidad y capacidad secretante. (8)(9)(19). Se advierten diferencias cuantitativas de significación para sinovial de AR y de OA (10)(17). Si bien la producción enzimática de los preincubados de sinoviocitos AR fué 4,6 veces mayor que la de los OA, la incubación mostró un incremento mas notable en las células provenientes de OA (96%) que de los pacientes con AR (56%), aunque las cifras absolutas siguen siendo mayores en los sinoviocitos de artritis reumatoidea: 2143 ± 132 ng/ml, frente a 542 ± 47 ng/ml.

Gráfico 1

MMP-1 EN SINOVIOCIOS DE PACIENTES CON AR ANTES Y DESPUES DE 6 HS. DE INCUBACION

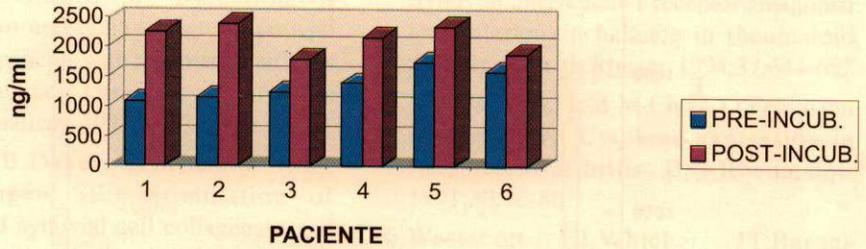


Gráfico 2

MMP-1 EN SINOVIOCIOS DE PACIENTES CON OA ANTES Y DESPUES DE 6 HS. DE INCUBACION

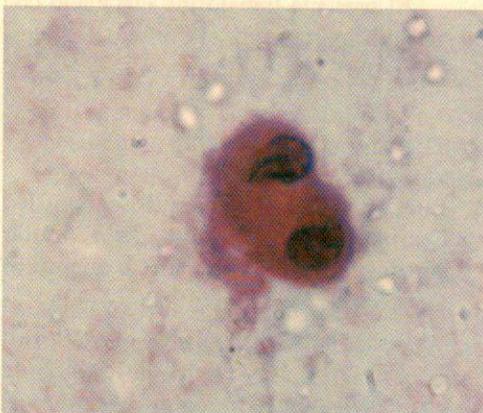
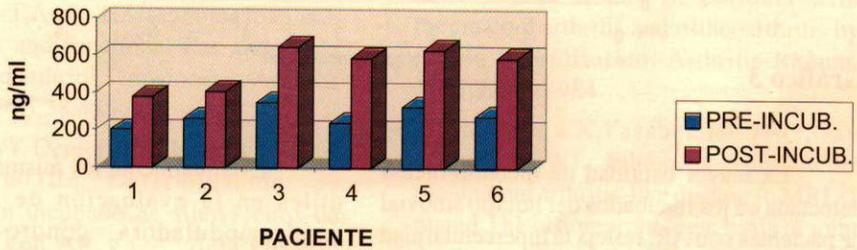


Fig. 1: Placas de sinoviocitos con abundante citoplasma. Coloración Hematoxilina Eosina X 40

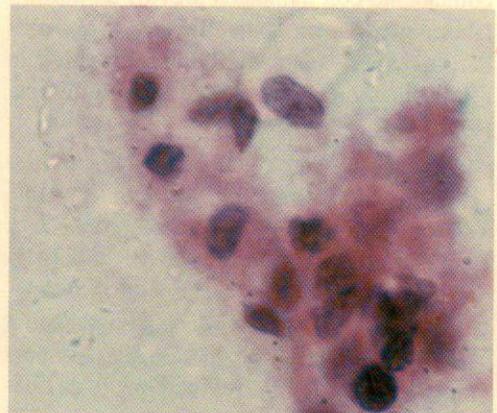


Fig. 2: Sinoviocitos en racimo con núcleos picnóticos. Coloración Hematoxilina Eosina X 40

MMP-1 en Sinoviocitos con Pacientes con AR y OA

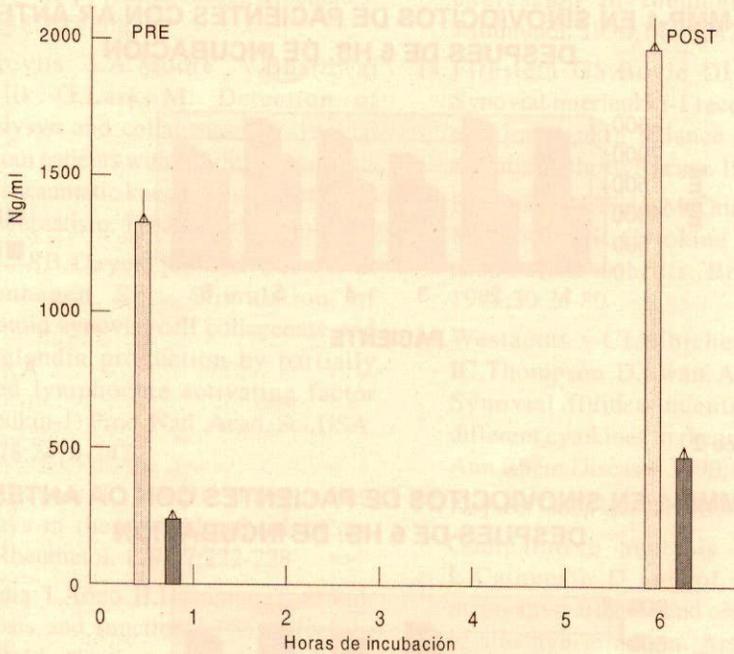


Gráfico 3

La mayor cantidad de metaloproteasa detectada en los incubados del líquido sinovial de pacientes con AR, refleja la hiperplasticidad característica de esta enfermedad.(19). Ello es coincidente con hallazgos previos de nuestro laboratorio y de otros investigadores, que probaron el incremento de radicales libres y la multiplicación de la cascada araquidónica. (8)(10)

En estas patologías los sinoviocitos desarrollan cambios hiperplásicos. Paralelamente se produce liberación activa de proteasas y eclosiona su capacidad para ejercer propiedades invasivas. (5)(20)(21). Esos hechos delatan la destrucción de la matriz por degradación colágena y proteoglicánica. De allí la importancia de haber definido el incremento de liberación enzimática por incubación en la osteoartritis, pues esa activación agrava los cambios degenerativos propios de la patología.

Los resultados del presente estudio sostienen hallazgos de otros autores sobre el papel que cumplen los sinoviocitos en la destrucción articular, y sugieren su participación en el desequilibrio funcional que conduce a la apoptosis. (2)

Eventualmente los mismos pueden ser útiles en la evaluación de las terapias condromoduladoras, condro-genéticas y sintomáticas.(10)

El presente trabajo fue efectuado con un subsidio aportado por el Consejo de Investigaciones de Córdoba (Conicor).

Referencias

1. Buckwalter J, Hunziker E, Rosenberg R, Coutts R, Adams M, Eyre D Articular cartilage: injury and repair Academy of Orthopaedic Surgeons. 1988;405-425
2. Wilkinson LS, Pitsillides AA, Worall JG, Edward JC Light microscopic characterization of fibroblast-like synovial intimal cell (synoviocyte). *Arthritis Rheum.* 1992;35:1179-1184
3. Graabeak PM, Ultrastructural evidence for two distinct types of synoviocytes in rat synovial membrane. *J.Ultras. Res.* 1982;78:321-339
4. Trabant A, Gay RE, Gay S, Oncogene activation in rheumatoid synovium. *APMIS* 1992;100:861-875

5. Murphy G, Cockett Mj, Stephens PE, Smith BJ, Docherty AJP Stromelysin is an activator of procollagenase. *Biochem.J.* 1987;248:265-268
6. Walakovits LA, Moore V, Bhardwaj N, Gallik G, Lark M: Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury. *Arthritis and Rheumatism*, 1992; Vol.35, N° 1:35-42
7. Mizel SB, Dayer J-M, Krane SM, Mergenhagen SE.: Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte activating factor (interleukin-1) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981; 78:2474-2477
8. Muller-Ladner U. T-cell independent pathways in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1995;7:222-228
9. Nakejima T, Aono H, Hasunuma T. et col. Apoptosis and functional Fas antigen in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum.* 1995;38:485-491
10. Brizuela NY, Demurtas S, Fonseca I, Spitale LS, Montrull HL: Determinación de MMP-1 en incubado de sinoviocitos de pacientes con AR y OA. *Acta Physiol. Pharmacol. et Therap. Latinoamer.* 1998. Vol. 48, N° 4, Suppl.1
11. Clark IM, Powell LK, Ramsey S, Hazleman BI, Cawston TE. The measurement of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagenase-TIMP complex in synovial fluid from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis *Arthritis and Rheumatism.* 1993; Vol.36, N° 3 :372-379
12. Maier R, Ganu B, Lotz M. Interleukin-11, an inducible cytokine in human articular chondrocytes and synoviocytes, stimulates the production of the tissue inhibitor of metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 21521-21532
13. Firestein GS, Alvaro-García JM, Maki R: Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 1990;144:3347-3353
14. Firestein GS, Boyle DL, Yu C et al.: Synovial interleukin-1 receptor antagonist and interleukin balance in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1994;37:644-652
15. Brennan FM, Field M, Chu CQ, Feldmann M, Maini RN: Cytokine expression in rheumatoid arthritis. *Br.J.Rheumatol.* 1991;30:76-80
16. Westacott CI, Whicher JT, Barnes IC, Thompson D, Swan AJ, Dieppe PA.: Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. *Ann.Rhem.Diseases* 1990;49:676-681
17. Keyszer GM, Heer AH, Kriegsmann J et al.: Comparative analysis of cathepsin L, Cathepsin D and of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis by in situ hybridization. *Arthritis Rheum.* 1995;38:976-984
18. O'Sullivan FX, Fassbender H-G, Gay S, Koopman WJ.: Ethiopathogenesis of the rheumatoid arthritis-like disease in MRL/1 mice. I The histomorphologic basis of joint destruction. *Arthritis Rheum.* 1985; 28: 529-536
19. Tanaka A, O'Sullivan, FX, Koopman WJ, Gay S.: Ethiopathogenesis of the rheumatoid arthritis-like diseases in MRL/1 mice. II Ultrastructural basis of joint destruction. *Arthritis Rheum.* 1988;15:10-16
20. Hamilton JA.: Hypothesis: in vitro evidence for the invasive and tumour-like properties of the rheumatoid pannus. *J.Rheumatol.* 1983;10:845-851
21. Bandara G, Mueller GM, Galea Lauri J et al. Intra-articular expression of biologically active interleukin-1-receptor-antagonist protein by ex vivo gene transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1993;90:10764-10768