

## Trabajo de Investigación

Medwave. Año XI, No. 5, Mayo 2011. Open Access, Creative Commons.

# TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ¿son los causantes del daño de la cicatriz patológica posquemadura al año de evolución?

**Autores:** Patricia Mercadillo<sup>(1)</sup>, Miguel Moreno<sup>(1)</sup>, Adriana Rodríguez-Mendoza<sup>(2)</sup>, Marco Cerbón<sup>(2)</sup>, Luz Alcántara<sup>(3)</sup>

**Filiación:**

<sup>(1)</sup>Hospital General de México

<sup>(2)</sup>Universidad Nacional Autónoma de México

<sup>(3)</sup>Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea de la Secretaría de Salud Federal, México

**Correspondencia:** luzalcantara@gmail.com

**doi:** 10.5867/medwave.2011.05.5035

### Comentario del Editor

La definición de investigación básica ha sido un tópico de discusión por años, y existe más de una acepción para el término en la comunidad científica. Se suele asimilar, entre otras, a la "ciencia pura", a la investigación "fundamental", a la investigación guiada por "curiosidad" (frente a aquella que nace "por necesidad"), y a la investigación de "cielos azules".

La OCDE la ha definido como "trabajo teórico o experimental desarrollado primariamente para adquirir nuevo conocimiento sobre los fundamentos subyacentes de los fenómenos y hechos observables, sin tener a la vista ninguna aplicación o uso en particular."

La realidad pone a prueba nuestras definiciones, este estudio es un ejemplo. ¿Usted qué opina?

### Ficha del Artículo

**Citación:** Mercadillo P, Moreno M, Rodríguez-Mendoza A, Cerbón M, Alcántara L. TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  ¿son los causantes del daño de la cicatriz patológica posquemadura al año de evolución? *Medwave* 2011 May;11(05). doi: 10.5867/medwave.2011.05.5035

**Fecha de envío:** 19/2/2011

**Fecha de aceptación:** 2/4/2011

**Fecha de publicación:** 1/5/2011

**Origen:** no solicitado, ingresado por FTS

**Tipo de revisión:** con revisión externa por un revisor, a doble ciego

## Resumen

**Introducción.** La cicatriz hipertrófica posquemadura se caracteriza por presentar un incremento en la síntesis de colágena, hiperplasia y un aumento en el intercambio celular. Sus aspectos clínicos muestran aspectos de una inflamación local crónica, pero el mecanismo de su patogénesis no ha sido claramente entendido. En la inflamación cutánea crónica, las citocinas proinflamatorias y profibrogénicas participan de manera importante para producir disfunción cutánea. El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios en la expresión de los ARN mensajeros de TNF- $\alpha$  y de IL-1 $\beta$ , así como su localización en cicatriz hipertrófica posquemadura. Se compararon los resultados obtenidos con cicatrices normotróficas y con piel normal. **Material y Métodos.** Las biopsias de piel fueron obtenidas de 15 pacientes con cicatriz hipertrófica posquemadura, que presentaron más del 10% de la superficie corporal quemada y más de un año de evolución. Las cicatrices normotróficas fueron obtenidas de 17 pacientes que cicatrizaron en condiciones óptimas. Y las pieles normales fueron obtenidas de 11 pacientes sometidos a cirugía plástica o reconstructiva. Se realizó un análisis histopatológico con procesamiento de rutina. Los niveles de expresión de los ARN mensajeros de TNF- $\alpha$  y de IL-1 $\beta$  en los tres tipos de biopsias fueron cuantificados por RT-PCR semicuantitativo y por hibridación *in situ*. **Resultados.** Por lo que respecta al análisis histopatológico, las células del infiltrado inflamatorio se diagnosticaron como leves; y nosotros no encontramos correlación entre el número de células del infiltrado inflamatorio presentes y la producción de citocinas. Al cuantificar la expresión de los ARN mensajeros por la técnica de RT-PCR semicuantitativo, se observó que el cociente TNF- $\alpha$ / $\beta$ -actina y el cociente IL-1 $\beta$ / $\beta$ -actina fue menor en cicatriz hipertrófica posquemadura en comparación con la cicatriz normal. Pero cuando se analizó la expresión de los ARN mensajeros de TNF- $\alpha$  y de IL-1 $\beta$  por hibridación *in situ*, se observaron diferencias significativas en la intensidad [ng/Ci] de hibridación para IL-1 $\beta$  localizada en la epidermis de la cicatriz hipertrófica al compararla contra la epidermis de la cicatriz normotrófica y de la piel normal. Para TNF- $\alpha$  no se encontraron diferencias en la intensidad [ng/Ci] de expresión entre epidermis y dermis de los tres tipos de muestras. **Conclusiones.** En

conjunto los resultados nos sugieren que no existe una sobreexpresión en el contenido de citocinas estudiadas en la cicatriz hipertrófica, al año de evolución. Sin embargo la cicatriz hipertrófica puede deber su formación a un mayor número de queratinocitos que expresan menor cantidad del mensajero de IL-1 $\beta$  al compararse con cicatriz normal.

## Abstract

**Introduction.** Post-burn hypertrophic scar tissue (H) is characterized by increased collagen synthesis, cellular growth and cell turnover. Its clinical characteristics exhibit aspects of chronic local inflammation, but the mechanism of its pathogenesis has not been clearly elucidated. In chronic skin inflammation, proinflammatory and profibrogenic cytokines play an important role in producing skin dysfunction. In this study, we examined changes in tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin (IL)-1 $\beta$  mRNA expression and its presence in post-burn hypertrophic scars. Results obtained in normotrophic scar tissue (N) were compared to results obtained in normal skin (NS). **Materials and Methods.** Skin biopsies were obtained from 15 patients with (H) who presented burns on over 10% of their skin surface, more than a year post-injury. N were obtained from 17 patients who experienced scarring in optimal conditions. NS were obtained from 11 patients who underwent cosmetic or reconstructive surgery. We performed histopathologic analysis with routine processing. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA expression levels on all three types of biopsy were obtained by RT-PCR and in situ hybridization. **Results.** TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA expression was highly coordinated and was very similar in all the tissues processed and our histopathologic analysis yielded relatively low inflammatory infiltrate cell. But according to a semiquantitative analysis RT-PCR, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA expression was significantly decreased in hypertrophic scars when they were compared to NS and N. **Conclusions.** These results suggest, that there not a differential expression TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA in hypertrophic scars a one year post injury. Interestingly, the keratinocytes showed minus expression of IL-1 $\beta$  mRNA compared to other cell types, which suggests that they may play an important role in post-burn skin repair processes.

**Palabras clave:** quemaduras, cicatriz, inflamación, colágena, fibroblastos, citocinas proinflamatorias

## Introducción

Las quemaduras son un campo de investigación de gran interés debido a la gran extensión de piel involucrada, además de que pueden generar las más grandes y significativas cicatrices en la patología humana. Las consecuencias psicológicas, funcionales y estéticas de las cicatrices posquemaduras pueden influenciar dramáticamente la calidad de vida del paciente<sup>1</sup>.

El examen clínico es el método común y mayormente utilizado para diagnosticar las cicatrices patológicas. Los análisis de laboratorio y los instrumentales no están disponibles para predecir la evolución, el tiempo y el resultado final de las cicatrices. Los estudios de ciencia básica (histología, inmunología, bioquímica, etc.) proveen nuevos conceptos en los diferentes aspectos de la patología de las cicatrices; y a futuro, la correlación de la información básica con las características clínicas puede resultar en un avance en la prevención, resolución y tratamiento de las cicatrices patológicas.

Anteriormente, debido a que no existían criterios estándar, resultaba difícil clasificar a las patologías cutáneas. Fue recién en 1990 cuando el grupo de Muir<sup>2</sup> propuso una clasificación específica para las cicatrices hipertróficas, principalmente se basaba en criterios clínicos y se relacionaban con el tiempo de evolución de la cicatriz. Nueve años después Magliacani y colaboradores<sup>3</sup>

propusieron una nueva clasificación basándose también en criterios clínicos, además de la contractura y atrofia tisular. Esta clasificación se continúa utilizando, y se sugiere categorizar a las cicatrices hipertróficas en activas (AHS: *Active Hypertrophic Scars*) o en remisión (RHS: *Remission Hypertrophic Scars*).

Los diferentes perfiles de cicatrices hipertróficas pueden ayudarnos a comprender el origen de la patología. Dentro de las características<sup>4 5 6</sup> importantes para conocer el estado de activación de una cicatriz se ha propuesto que la cantidad de células T y macrófagos presentes en el infiltrado inflamatorio son determinantes para el desarrollo de la cicatriz<sup>7</sup>. Asimismo se ha planteado como hipótesis una relación entre la cantidad y función de las células inmunes del infiltrado inflamatorio, y la actividad y diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos a través de la producción y liberación de diferentes citocinas que estarían influenciando el desarrollo de las cicatrices patológicas<sup>8 9</sup> dando como resultado la alteración irreversible de la arquitectura tisular<sup>10 11</sup>.

La cicatriz hipertrófica posquemadura se caracteriza por presentar un incremento en la síntesis de colágena, un aumento celular (*hiperplasia*) y un aumento en el intercambio celular (*shedding*: reemplazar células muertas por jóvenes)<sup>1</sup>. Sus aspectos clínicos (eritema, dolor, disestesia, prurito, elevación) muestran una inflamación local crónica, pero el mecanismo de su patología no ha sido claramente entendido<sup>3</sup>.

La sobreproducción de las fibras de colágena es la característica más importante de esta variedad de desórdenes dérmicos, algunas citocinas bien documentadas como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PDGF, FGF y TGF- $\beta$ <sup>12</sup> activan directamente la proliferación de fibroblastos y/o estimulan la producción de tejido conjuntivo<sup>13 14</sup>. Estas citocinas se producen principalmente por macrófagos activados, pero algunos de estos mediadores también se producen por otros tipos celulares como linfocitos, células endoteliales y los mismos fibroblastos.

Particularmente el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) regula una gran variedad de respuestas celulares como la cicatrización, proliferación, diferenciación, inflamación y muerte. TNF- $\alpha$  se encuentra presente en dos formas: como una proteína membranal (mTNF) de 26-kDa y como una proteína soluble (sTNF) de 17-kDa, derivada de la forma membranal por liberación proteolítica, gracias a la enzima convertidora de TNF- $\alpha$  (TACE: *TNF Alfa Convertidora Enzime*)<sup>15</sup>. Para ejercer su función biológica, TNF- $\alpha$  se une a los receptores tipo I (TNFR1: 55-kDa) y tipo II (TNFR2: 75-kDa), los cuales reclutan a proteínas que permitan activar diferentes rutas de señalización<sup>16</sup>. A través de sus dominios de muerte citoplásmicos, TNFR1 recluta a TRADD (*TNFR1-Associated Death Domain protein*) y a TRAF-2 (*TNF Receptor-Associated Factor 2*), para finalmente activar a la vía de las MAP cinasas (MAPK's: *Mitogen-Activated Protein Kinase*)<sup>17</sup>.

Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) es una citocina mediadora de la regulación inmune y de la respuesta inflamatoria, incluyendo también la regulación de la cicatrización, crecimiento, diferenciación y varios procesos metabólicos; producida predominantemente por macrófagos activados, pero también se expresan en linfocitos B y T, células epiteliales, endoteliales y mesenquimáticas<sup>18 19</sup>. Pro-IL-1 $\beta$  se genera como un precursor, el cual se convierte en una forma madura por la enzima convertidora de IL-1 $\beta$  (caspasa 1 ó ICE). Se cree que IL-1 $\beta$  sólo es activa como proteína madura; se une al receptor tipo I (IL-1R1) y a la proteína IL-1RACp (IL-1R *Accessory protein*), quienes en

conjunto forman el complejo de señalización del receptor. IL-1R heterodimeriza y recluta a MyD88, subsecuentemente este complejo se une a TOLLIP (*Toll Interacting Protein*), IRAK (*IL-1R-Associated Kinase*) e IRAK4. La proximidad de estas moléculas y del receptor puede llevar a su interacción a través de la asociación de su dominio de muerte. La señalización involucra su unión a TRAF6 (*TNF Receptor Associated Factor 6*); activación de MAP cinasas, (TAK1, MKK6) y eventualmente desencadena la activación de NF $\kappa$ B, JNK y p38<sup>20</sup>.

Se ha demostrado que IL-1 $\beta$  coopera con TNF- $\alpha$  (a pesar de sus diferencias estructurales)<sup>21</sup> para ejecutar algunos efectos, entre los que se encuentra el control de la síntesis de colágena dependiente de concentración<sup>22 23</sup>.

En este trabajo se investigó el papel de los ARN mensajeros de TNF- $\alpha$  y de IL-1 $\beta$  en cicatrices hipertróficas posquemaduras (H). Se compararon los resultados obtenidos con cicatrices normotróficas (N), y con piel normal (NS) mediante las técnicas de RT-PCR semicuantitativo e hibridación *in situ*. También se correlacionó la expresión de los ARN mensajeros de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  con el número de células del infiltrado inflamatorio presentes y con el número de células positivas en el tejido.

## Métodos

### Pacientes

Separamos por histopatología a las cicatrices hipertróficas activas (AHS) de las cicatrices hipertróficas en remisión (RHS), de acuerdo al número de células inmunes infiltradas<sup>4 14 21</sup> y encontramos que no necesariamente correlacionaban con la clasificación de las características clínicas<sup>3</sup>.

Las cicatrices hipertróficas fueron obtenidas con el consentimiento de los pacientes, 15 presentaron cicatriz hipertrófica posquemadura (H), con 10% de la superficie corporal quemada (SCQ) y con más de un año de evolución (Tabla 1).

	No. Pacientes	%
Leve	11	100
Perivascular	5	45.45
Intersticial	5	45.45
No valorable	1	9.10

**Tabla 1:** Análisis histopatológico del infiltrado inflamatorio en cicatriz normotrófica.

Las cicatrices normotróficas se obtuvieron de 17 pacientes cuyas lesiones sanaron óptimamente, y finalmente las biopsias de piel normal se obtuvieron de 11 pacientes, sometidos a procesamientos quirúrgicos cosméticos. Los

pacientes no tuvieron evidencia de infección o de algún tipo de cáncer. Ninguno de ellos se trató con inmunomoduladores, al menos tres meses antes de la cirugía.

## Microscopía de luz en los tejidos de piel

Las biopsias fueron fijadas en safe fix por 24 horas, procesadas rutinariamente y embebidas en paraplast con una temperatura de 56°C. Las secciones de tejido (5 µm de grosor) se tiñeron con hematoxilina-eosina, y se examinaron por especialistas en dermatopatología en el Hospital General de México. Se analizó densidad, composición y localización del infiltrado inflamatorio (perivascular, perianexial, perineural o intersticial), presencia de hemorragia, cambios vasculares (dilatación, necrosis, trombosis), anexos cutáneos (folículos pilosos, glándulas sudoríparas), alteraciones (necrosis, espongiosis), edema dérmico, fibrosis y/o esclerosis.

## Preparación de ARN

El ARN fue extraído del tejido previamente almacenado en RNA later (AM7020, Applied Biosystems) con el método de Tripure (11667165001, Roche Applied Science). La calidad de las preparaciones de ARN fue analizada en Nanodrop y Bioanalizador (Agilent Technologies).

## Síntesis de ADN

El ARN total fue transcrito a ADN complementario (ADNc) de acuerdo al protocolo de *SuperScript First-Strand Synthesis System* para RT-PCR (Catalog No. 11904-018, Invitrogen). Brevemente 1 µg de ARN total, 1µl dNTPs mix, 1µl Oligo(dT)12-18 (0,5 µg/µl) se llevaron a un volumen final de 10µl con agua-DEPC, se preincubaron por 5 minutos a 65°C, se congelaron en hielo por 5 minutos. Se le agregó 2µl de buffer de RT 10x, 4µl de 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2µl 0,1 M DTT, 1µl de inhibidor de Rnasas, se incubó a 42°C por 2 minutos. Se le adicionó 1µl de SuperScript II RT a cada tubo, se mezcló e incubó a 42°C por 50 minutos. Se terminó la reacción a 70°C por 15 minutos. Se colocaron los tubos a 4°C; y se colectó la reacción con una breve centrifugación. Finalmente se le adicionó 1µl de RNasa H a cada tubo, y se incubó por 20 minutos a 37°C antes de proceder a la amplificación del ADN blanco.

## Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Cinco µl de ADN complementario se amplificaron con oligonucleótidos para TNF-α, IL-1β y β-actina en un termociclador, Palm cyler (Corbett Life Science CG1-96). En un volumen total de 50µl que contenía 5µl de buffer de PCR 10X, 1,5µl de 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1µl de 10 mM dNTP mix, 1µ del sense oligonucleótido a una concentración de 10 mM, 1µl de antisense oligonucleótido a una concentración de 10 mM, 0,3µl de Taq DNA Polimerasa (5 units/µl), 5µl de ADN complementario (de la primera reacción) y finalmente se agregaron 35,2µl de agua DEPC. Los oligonucleótidos para TNF-α (*Gen bank accession*: NM\_000594) fueron los siguientes: sense CCTGTAGCCCATGTTGTAGCAA y antisense CCTTGGTCTGGTAGGAGACG (TIB, MOL BIOL, LLC). Los ciclos de amplificación consistieron en 35 con las siguientes características: 94°C por 2 minutos (94°C por

30 segundos, 61°C por 1 minuto, 68°C por 1 minuto), 68°C por 7 minutos.

Los oligonucleótidos para IL-1β (*gen bank accession*: NM\_000576) fueron los siguientes: sense CTGTCCTGCGTGTGAAAGA y antisense GAAGTCAGTTATATCCTGGC, para β-actina (*Gen Bank accession*: NM\_001101) fueron: sense CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC y antisense AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC. Y las condiciones de PCR para IL-1β fueron 2 minutos a 94°C, (95°C por 1 minuto, 1 minuto a 50°C, 5 minutos a 72°C) y una post-extensión de 72°C por 10 minutos, también en ese caso se realizaron 35 ciclos de PCR.

Los ciclos de amplificación para β-actina fueron de 35 ciclos con las siguientes características: 2 minutos a 94°C, (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 66°C, 1 minuto a 68°C) y 7 minutos a 68°C. Las muestras amplificadas se corrieron por electroforesis, en geles de agarosa al 2%, los productos de PCR se tiñeron con 2,5µl de gel red (41002, Biotium).

Las fotografías de los geles se obtuvieron en un transiluminador de luz ultravioleta acoplado a una computadora con el programa Dolphin 1D (Wealtec). Se realizaron las densitometrías con los parámetros establecidos por el software.

## Hibridación *in situ* para detectar el ARN mensajero de TNF-α y de IL-1β

Secciones múltiples de las biopsias de piel fueron cortadas a 5µm en condiciones libres de dnasas y rnasa, colectadas en laminillas tratadas, y se hibridaron con cada sonda por separado. Se utilizaron sondas complementarias a los ARN mensajeros de TNF-α humano (*GeneDetec Company*, GD1177-OP), IL-1β humano (GD1104-OP) y controles (GD5000-OP). Ver los protocolos de hibridación *in situ* usando las sondas Gen Detec disponibles en la página web.

Brevemente el procedimiento fue el siguiente: las secciones de tejido fueron desparafinadas a través de xileno y alcoholes graduales (100, 95 y 50%), se colocaron en 0,2 N HCl (Merck 10114) a temperatura ambiente para remover las proteínas básicas. Se lavaron con agua destilada y se sometieron a una digestión enzimática con proteinasa K (1µg/ml, Sigma 2308) en 0,05M Tris-HCl, (Sigma, T1535), pH 7,4 por 5 minutos a temperatura ambiente y después se lavaron con agua destilada suplementada con 0,1% de dietil pirocarbonato (DEPC, Fluka, 32490) por 5 minutos<sup>28</sup>. Se transfirieron las laminillas a 0,1M de buffer de TEA (Sigma T1377) preparada en fresco con anhídrido acético (Sigma, A6404) por 5 minutos. La solución de equilibrio consistió en formamida 100% (Promega H5052), 2M NaCl, 1M Tris□]HCl, pH 7.4, 0.5M EDTA, 1.59M DTT (Sigma, D8906), 52µg/µl heparina (Biochemika, 51550) en agua DEPC (Invitrogen 750023), (Sigma D2532), ARN transferencia (Sigma, R5636), 10% dextran sulfato (Sigma, D8906) y 500µg/ml ADN de esperma de salmón

desnaturalizado (Sigma, 15632□J011). Finalmente, se le agregó el DTT a la solución de prehibridación a una concentración de 10mM. La temperatura de hibridación para todos los casos fue de 35°C.

Al día siguiente se lavaron en condiciones de alta astringencia para reducir el *background* o señales de hibridación no específicas (secuencialmente en buffer de citratos 2x y en 100mM Tris-HCl, 150mM NaCl pH 7,5)<sup>29</sup>.

La detección final se realizó de acuerdo con el proveedor (Cat. n° HKD47 Rembrandt). Brevemente a las laminillas se les agregó de 2 a 3 gotas del anticuerpo conjugado, se incubaron toda la noche a 4°C, se lavaron con agua desionizada y se les aplicó la solución de trabajo AEC 1X (aminoetilcarbazol, Sigma A6926) y se incubaron de 5 a 15 minutos. Se contratiñeron con hematoxilina de 5 a 10 minutos. Las secciones se montaron para su evaluación microscópica. Se tomaron las fotos con el microscopio Leica y cámara Nikon, se evaluaron con el programa MCID Imagine Research Inc.). El tejido control positivo usado fueron dos muestras de pacientes con gingivitis, donde su característica principal es el proceso inflamatorio agudo. Y en el caso del control negativo se utilizó la sonda sense.

### Análisis cuantitativo de la expresión de los ARN mensajero en epidermis y dermis humana

Las imágenes de epidermis y dermis se digitalizaron como TIFF (usando PhotoShop V9.0) y se analizaron cuantitativamente con el programa de análisis de imágenes MCID/M2 (Imaging Research). Brevemente, áreas rectangulares que contenían células epidermales lineales (10 células de ancho aproximadamente) fueron seleccionadas. Asimismo la dermis también fue seleccionada y seccionada por debajo de la epidermis. Se analizó la intensidad de hibridación [ng/Ci] a varios niveles desde la base a la altura del rectángulo; tomando el análisis de la sección completa de la piel.

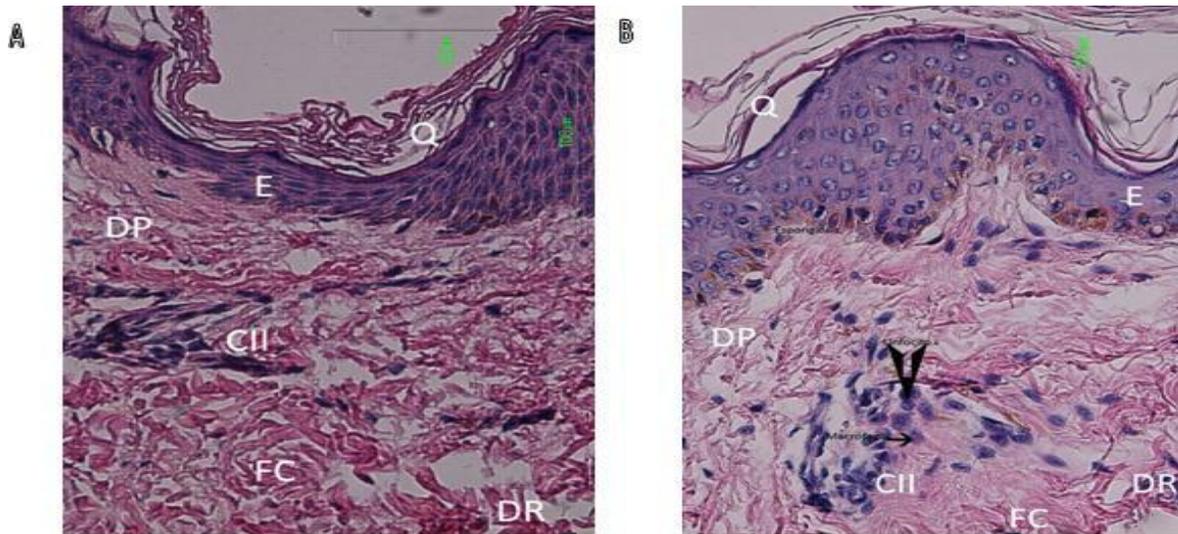
En el análisis también se incluyó el número de células positivas por  $\mu\text{m}^2$ . Cabe mencionar que se evitó el *background* al adquirirse la foto y también se tomó como control para cada tejido de piel el número de células negativas presentes en el corte.

### Resultados

Los cambios histopatológicos<sup>21</sup> observados en las biopsias de piel no tuvieron gran variación (Tabla I y Tabla II). En la secciones de las biopsias de piel normal se observó ocasionalmente un pequeño número de linfocitos alrededor de los vasos sanguíneos dérmicos, y la densidad del infiltrado fue leve (Figura 1A).

	No.	%		No.	%
	Pacientes			Pacientes	
Leve	8	88.8	Moderado	1	11.1
Perivascular	4	44.4	Perivascular	0	0
Perivascular, periadnexial	2	22.2	Perivascular, periadnexial	0	0
Perivascular, intersticial	1	11.1	Perivascular, intersticial	1	11.1
Intersticial	1	11.1	Intersticial	0	0

**Tabla 2:** Análisis histopatológico del infiltrado inflamatorio en cicatriz hipertrófica.

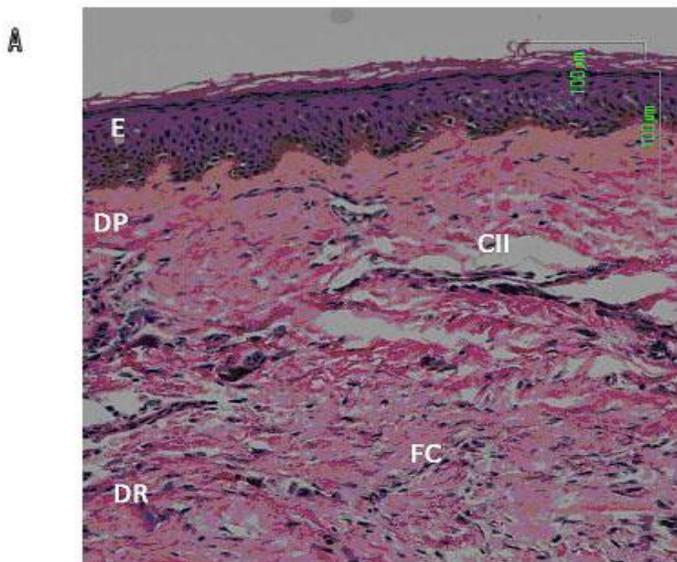


**Figura 1a:** Se observa una fotomicrografía de una piel normal donde la epidermis (E) no presenta cambios histológicos, en la capa más superficial de esta se encuentra la queratina (Q). Por debajo de la Epidermis (E) también puede observarse la dermis papilar (DP) y la reticular (DR) en donde las fibras de colágena (FC) están bien organizadas. Las células del infiltrado inflamatorio (CII) también presentes en una piel normal se caracteriza por escasos linfocitos.

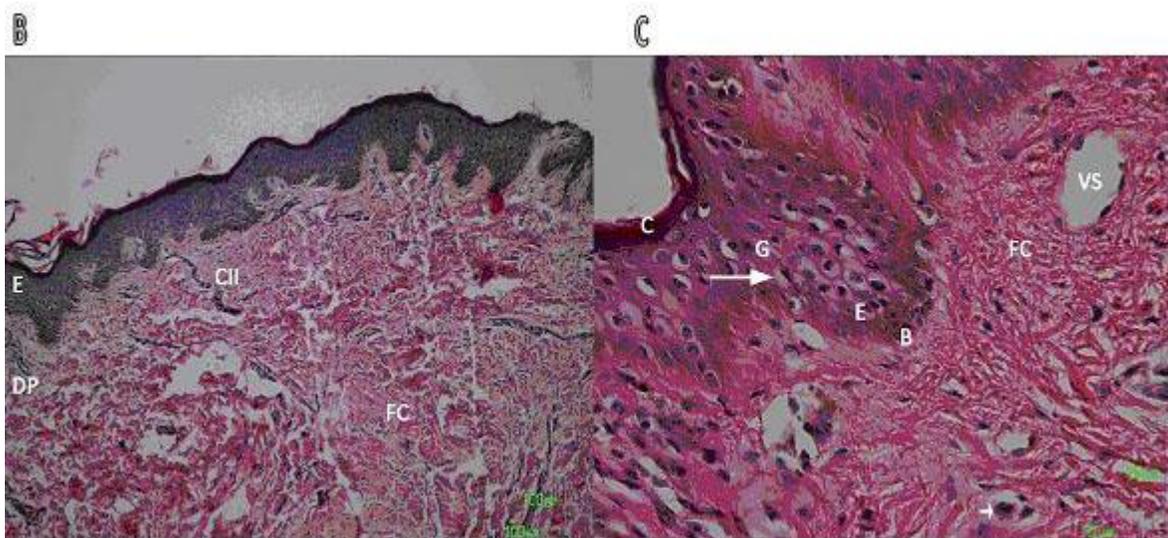
**Figura 1b:** biopsia de cicatriz normotrófica, en la epidermis (E) se observa una leve espongiosis y en la dermis un leve infiltrado inflamatorio (CII), donde predominan linfocitos y con ocasionales macrófagos en la unidad perivascular dérmica. Las fibras colágenicas (FC) en general bien orientadas. La barra representa 100µm, (40 X).

Particularmente en la cicatriz normotrófica (Figura 1B) el infiltrado fue predominantemente linfocítico, con ocasionales histiocitos o células tipo epiteloide entre las fibras de colágena. La epidermis en general no se vio afectada, aunque en ocasiones las papilas dérmicas fueron más pronunciadas y tuvieron signos de espongiosis. En las Figuras 2A y 2B, dos pacientes con cicatriz hipertrófica, presentaron reminiscencias de anexos cutáneos y

acantosis en la capa epidérmica, sólo una biopsia de cicatriz hipertrófica se caracterizó por un moderado infiltrado inflamatorio con linfocitos presentes alrededor de los vasos sanguíneos y células histiocíticas o macrófagos entre las fibras de colágena. La epidermis en general no se vio afectada excepto por un grado medio de excitosis o espongiosis, pero no contenían queratinocitos necróticos (Figura 2C).



**Figura 2:** En A, cicatriz hipertrófica predominan las células del infiltrado inflamatorio (CII) y la arquitectura tisular se pierde por las fibras de colágena (FC) localizadas en espiral en la dermis reticular (DR).



**Figura 2b:** La cicatriz hipertrófica de otro paciente presentó un leve infiltrado inflamatorio y la epidermis no mostró cambios contundentes.

**Figura 2c:** La epidermis de otro paciente con cicatriz hipertrófica se observan las capas normales de una epidermis (C) capa córnea, (G) capa granulosa, capa espinosa (E) y la capa basal (B), en la capa espinosa existen signos de vacuolización en los queratinocitos. En la dermis papilar se observan vasos sanguíneos (VS) y CII dentro de estos. La barra representa 100μm.

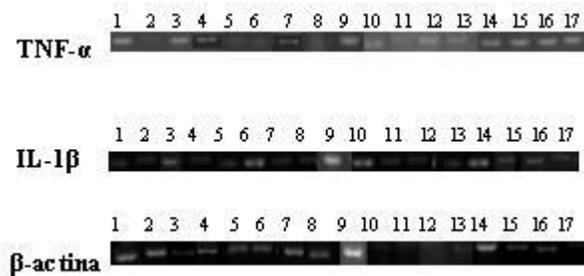
#### RT-PCR

La expresión específica de los ARN mensajeros para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y  $\beta$ -actina fueron determinadas por la técnica de RT-PCR semicuantitativa, en biopsias completas de piel

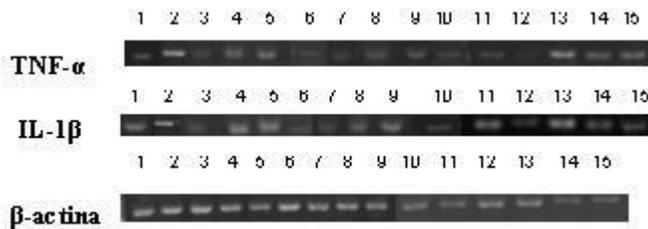
normal, cicatrices normotróficas e hipertróficas. El análisis se realizó en 43 biopsias, 11 piel normal (Figura 3), 17 fueron cicatrices normotróficas (Figura 4) y 15 fueron cicatrices hipertróficas posquemaduras (Figura 5).



**Figura 3:** Expresión del ARN mensajero de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en biopsias de piel normal. El cDNA se obtuvo de pacientes con piel normal (líneas 1 -11) y se amplificó con primers específicos para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y  $\beta$ -actina se utilizó como control positivo.



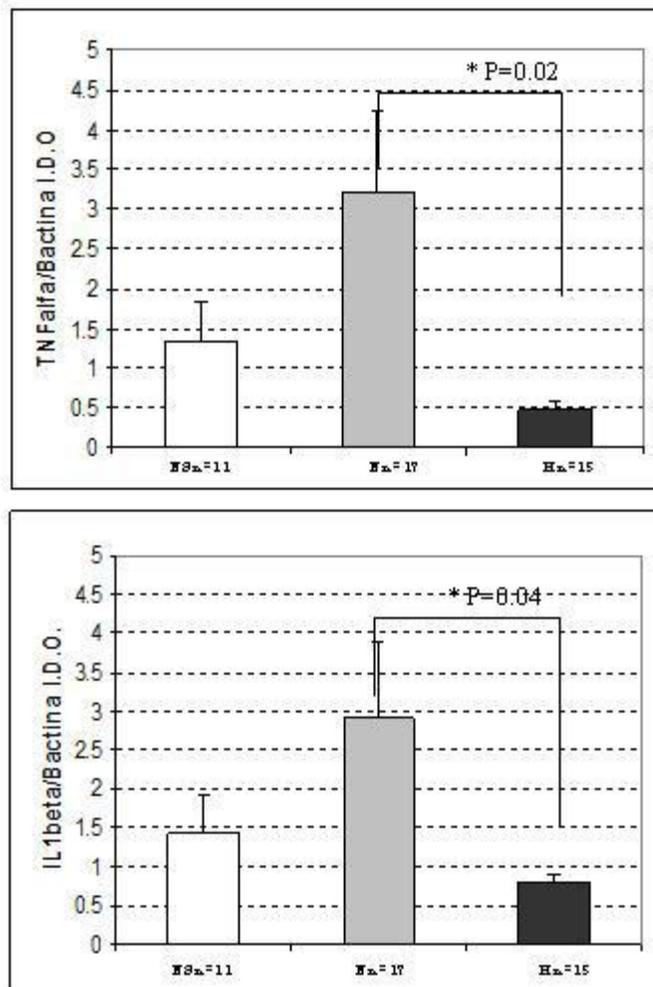
**Figura 4:** Expresión del ARN mensajero de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en biopsias de cicatriz normal. El cDNA se obtuvo de 17 pacientes con cicatriz normal (líneas 1 -17) y se amplificó con primers específicos para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y  $\beta$ -actina se utilizó como control positivo.



**Figura 5:** Expresión del ARN mensajero de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en biopsias de cicatriz hipertrófica. El cDNA se obtuvo de 15 pacientes (línea 1- línea 15) con cicatriz hipertrófica y se amplificó con primers específicos para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y  $\beta$ -actina se utilizó como control positivo.

Como se muestra en la Figura 3, aparentemente no hubo diferencia en la señal de los ARN mensajeros de TNF- $\alpha$  o de IL-1 $\beta$ . En la Figura 4, los valores de los ARN mensajeros son muy similares entre los diferentes pacientes. En el caso de los mensajeros obtenidos de las cicatrices hipertróficas, tampoco se observó gran diferencia entre estos (TNF- $\alpha$  ó IL-1 $\beta$ ), pero cuando comparamos el promedio de los pacientes de los ARN

mensajeros obtenidos de pacientes con cicatrices hipertróficas (Figura 5) con el de los pacientes de cicatrices normotróficas (Figura 4), los primeros valores son menores (Figura 6), y estadísticamente diferentes. TNF- $\alpha$  ( $p \leq 0,02$ ) y para IL-1 $\beta$  ( $p \leq 0,04$ ) cuando se comparan cicatrices hipertróficas versus cicatrices normotróficas.

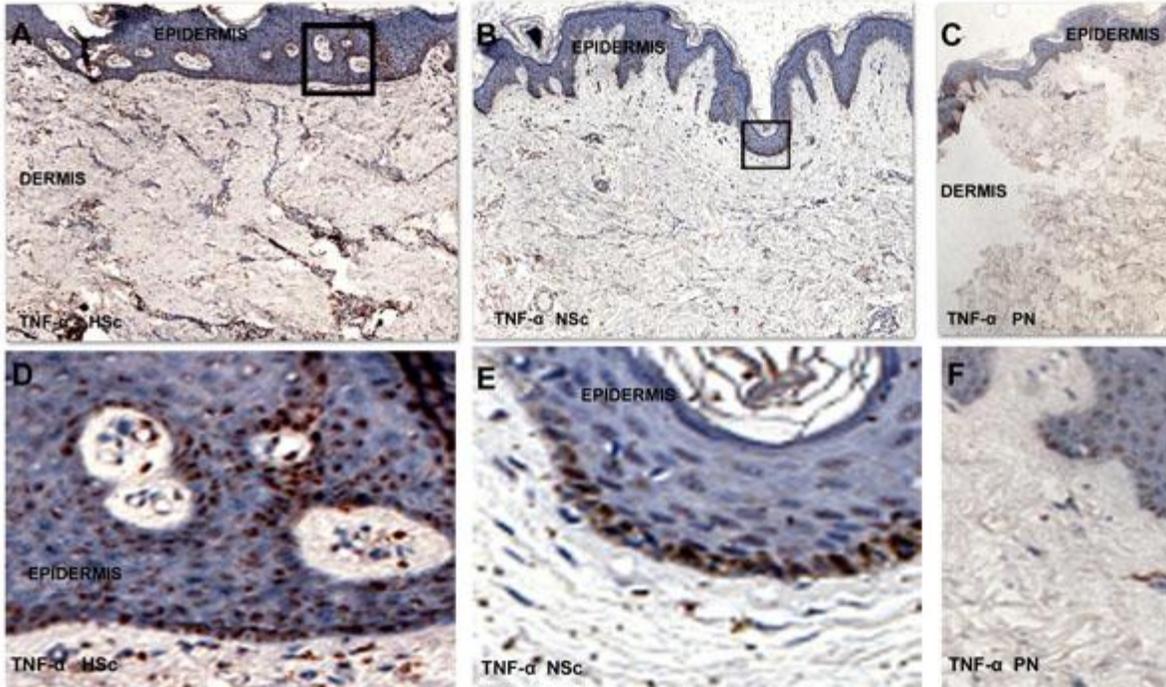


**Figura 6:** En A se observa la comparación de la expresión de los ARN mensajeros para IL-1 $\beta$  en los tres tipos de muestras, piel normal (PN), cicatriz normotrófica(N) y cicatriz hipertrófica (H). Observándose una diferencia significativa ( $p \leq 0.04$ ) al comparar la N vs la H. En B observa la comparación de la expresión de los ARN mensajeros para TNF- $\alpha$  en los tres tipos de muestras, piel normal (PN), cicatriz normotrófica(N) y cicatriz hipertrófica (H). Observándose una diferencia significativa ( $p \leq 0.02$ ) al comparar la N vs la H. I. D. O., se refiere a unidades arbitrarias de Intensidad de Densidad Óptica, al obtener el cociente del ARN mensajero problema/ARN mensajero de un gen housekeeping.

### El ARN mensajero de TNF- $\alpha$ se expresa en Epidermis y Dermis sin cambios en la cicatriz hipertrófica posquemadura

La expresión específica para cada una de las capas de la piel del ARN mensajero de TNF- $\alpha$  se determinó por hibridación in situ en 28 biopsias, incluyendo 5 de piel

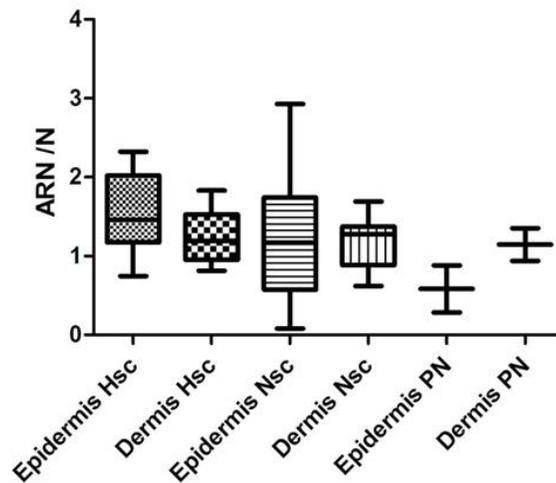
normal, 11 de cicatriz normotrófica y 12 de cicatriz hipertrófica. Se determinó la intensidad de hibridación y no se encontraron diferencias en la intensidad de la señal entre epidermis y dermis en los tres tipos de biopsias (Figura 7).



**Figura 7:** Microfotografías de la hibridación in situ para TNF- $\alpha$  en biopsias de Hsc, Nsc y PN. A, B y C son fotografías tomadas a 100X, D, E y F son aumentos de los recuadros señalados respectivamente para enfatizar la expresión del mensajero en los queratinocitos de las biopsias tomadas de pacientes con cicatriz hipertrófica.

Pero al comparar estadísticamente la dermis de la cicatriz normotrófica ( $133 \pm 2,6$ ) con la dermis de la cicatriz hipertrófica, se observaron más células positivas,

( $60 \pm 0,8$ ) en secciones de  $1.000 \mu\text{m}^2$ , aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas (Figura 8).

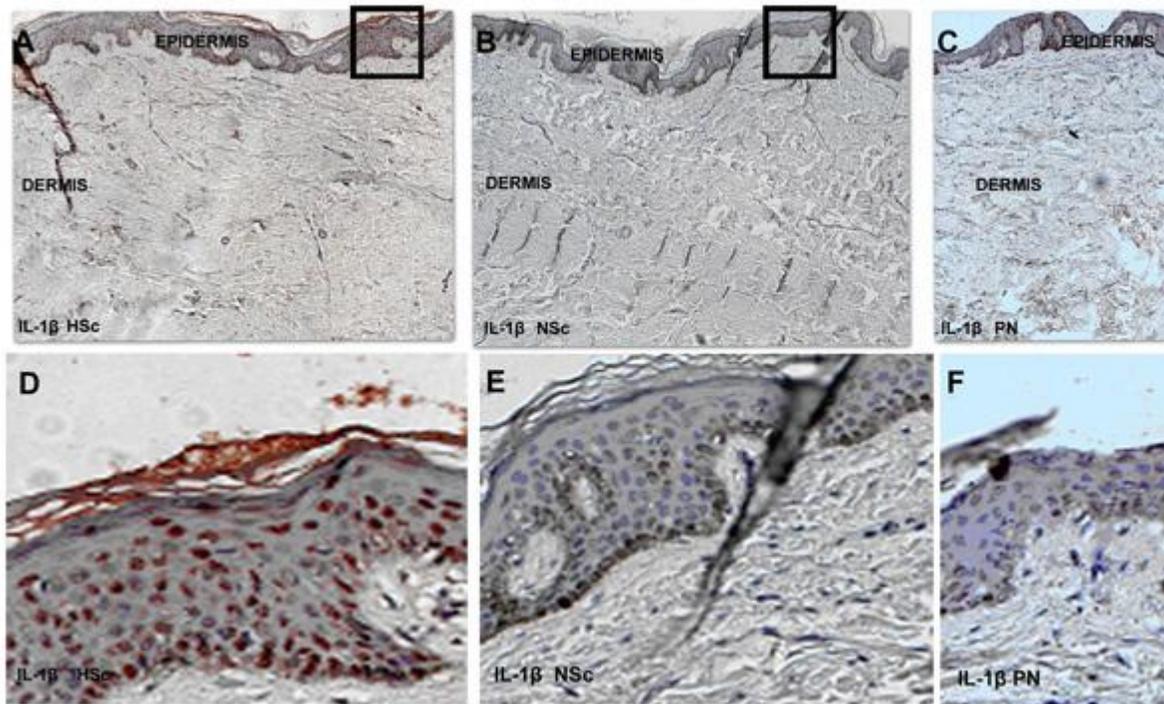


**Figura 8:** Cuantificación de las secciones de piel procesadas por ISH con sondas para TNF- $\alpha$  marcadas bioquímicamente con AEC. Muestran el cociente de la cantidad de ARN / N, donde N son los Núcleos. Las barras indican desviación estándar. No hubo diferencias significativas.

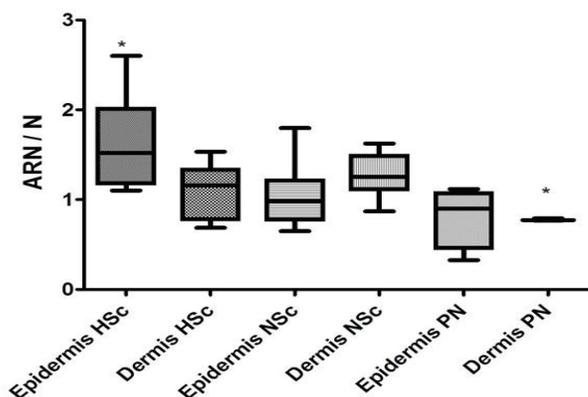
Respecto al patrón de distribución de células positivas, la expresión se observó en todas las capas de la epidermis (basal, espinosa, granulosa y córnea) y en diferentes tipos de queratinocitos e incluso algunos melanóforos. Las células del infiltrado dérmico también fueron positivas sobre todo aquellas que forman grupos pequeños de células perivasculares en la dermis papilar y reticular, algunas células también fueron positivas al encontrarse intersticialmente entre las fibras de colágena (Figura 7).

**El ARN mensajero de IL-1 $\beta$  se expresa en Epidermis y Dermis con cambios en la cicatriz hipertrófica posquemadura**

La expresión para el ARN mensajero de IL-1 $\beta$  se determinó en 24 biopsias incluyendo 4 de piel normal, 9 de cicatriz normotrófica y 11 de cicatriz hipertrófica (Figura 9). Se determinó la intensidad de hibridación y se encontraron diferencias significativas entre la intensidad de la señal en la epidermis de cicatriz hipertrófica, cuando se comparó con la dermis de piel normal (Figura 10).



**Figura 9:** Microfotografías de la hibridación in situ para IL-1 $\beta$  en biopsias de HSc, NSc y PN. A, B y C son fotografías tomadas a 100X, D, E y F son aumentos de los recuadros señalados respectivamente para enfatizar la expresión del mensajero de IL-1 $\beta$  en los queratinocitos en las biopsias tomadas de pacientes con cicatriz hipertrófica posquemadura.



**Figura 10.** Cuantificación de las secciones de piel procesadas por ISH con sondas para IL-1 $\beta$  marcadas bioquímicamente con AEC. Muestran el cociente de la cantidad de ARN / N, donde N son los Núcleos. Las barras indican desviación estándar. \* P  $\leq$  0.05 Epidermis HSc vs Dermis PN.

Pero en epidermis ( $184 \pm 6,5$ ) y dermis ( $109 \pm 1,5$ ) las cicatrices hipertróficas tuvieron más células positivas cuando se compararon con la epidermis ( $73 \pm 1,4$ ) y la dermis ( $21 \pm 2$ ) de cicatrices normotróficas, o bien incluso cuando se compararon con la epidermis ( $28 \pm 7,9$ ) y la dermis de piel normal ( $15 \pm 0,5$ ). Datos no mostrados.

Respecto al patrón de distribución de células positivas, todas las capas epidérmicas presentaron células positivas (queratinocitos en su gran mayoría) y en la dermis sólo escasas células del infiltrado inflamatorio tanto en la papilar como en la reticular también lo fueron, sobretodo alrededor de los vasos sanguíneos, en zonas perivasculares (Figura 9).

## Discusión

Durante este trabajo experimental se analizó el papel de los ARN mensajeros de IL-1 $\beta$  y de TNF- $\alpha$  en la cicatriz hipertrófica posquemadura, por considerarse citocinas proinflamatorias y profibrogénicas<sup>21</sup>.

Lo primero que encontramos al analizar histopatológicamente<sup>24</sup> las biopsias de piel normal (NS), cicatriz normotrófica (N) y cicatriz hipertrófica posquemadura (H), es que las muestras no presentaban un infiltrado inflamatorio abundante, es decir la cantidad de células del infiltrado inflamatorio presentes en las cicatrices hipertróficas era leve, muy similar a las muestras de cicatriz normal (N) e inclusive piel normal (NS). Estos hallazgos difieren del grupo de Castagnoli que menciona que las cicatrices hipertróficas son causa de un proceso inflamatorio crónico donde las células del sistema inmune presentes abundantemente serían las encargadas de secretar citocinas proinflamatorias y profibrogénicas que perpetuarían el proceso volviéndolo crónico. Nuestros hallazgos nos hacen suponer que es posible considerar la existencia de diferentes perfiles de cicatrices hipertróficas. Esta propuesta concuerda con Santucci en 2001.

A pesar de que nuestro primer hallazgo es morfológico: pocas células inflamatorias (linfocitos en su mayoría y algunos macrófagos en zonas perivasculares), nosotros no podemos afirmar nada acerca del grado de activación de estas células ya que no las marcamos con moléculas membranales como las del complejo mayor de histocompatibilidad MHCII o bien con moléculas accesorias CD3, CD4 o CD8 positivas.

Nuestro segundo hallazgo fue que se encontró una disminución en la expresión de las citocinas proinflamatorias propuestas como causantes de perpetuar el daño (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa en las cicatrices hipertróficas posquemadura (H). Estos datos encontrados coincidieron con los reportes de Peruccio<sup>25</sup> y de Zhang<sup>26</sup> para TNF- $\alpha$ , quienes también demostraron una disminución en el ARN mensajero de TNF- $\alpha$ . Zhang y colaboradores<sup>26</sup> proponen que a pesar de observar una disminución del cociente TNF- $\alpha$ / $\beta$ -actina en las cicatrices hipertróficas, el ARN mensajero de TNF- $\alpha$  aumenta conforme va madurando la cicatriz y se resuelve.

A la fecha no existen datos de la expresión génica de IL-1 $\beta$ , a pesar de conocerse que tiene propiedades biológicas similares a TNF- $\alpha$ <sup>27</sup>, y que inclusive presentan un efecto sinérgico para poder degradar matriz extracelular en procesos fibróticos<sup>27-28</sup>. Nosotros encontramos mediante la misma técnica, RT-PCR semicuantitativo, que el ARN mensajero de IL-1 $\beta$  también disminuye en las cicatrices hipertróficas posquemaduras (H). Por lo que suponemos que puede tener un efecto sinérgico con TNF- $\alpha$  (debido a las evidencias en la literatura) para degradar matriz extracelular, y que dicho proceso se encuentra alterado en la patología de las cicatrices hipertróficas posquemaduras (H).

In situ para la cicatriz hipertrófica posquemadura (H), TNF- $\alpha$  está presente en más células positivas dérmicas

que epidérmicas con un nivel constante en la intensidad de expresión, sin embargo en una cicatriz normal la presencia de células dérmicas positivas a TNF- $\alpha$  es mayor si se compara con la cicatriz hipertrófica. Por lo que la patología de la hipertrofia cutánea puede asociarse con menos células dérmicas que expresan niveles constantes de ARN mensajero.

Para IL1- $\beta$  disminuye la intensidad de expresión del ARN mensajero, pero tiene más células positivas en epidermis que en dermis. Este proceso no fue diferente a lo encontrado en las cicatrices normales, sino que se observó incrementado en las cicatrices hipertróficas. Esto último nos hace suponer que las secuelas hipertróficas pueden deber su formación a un mayor número de queratinocitos que expresan menor cantidad del ARN mensajero de IL-1 $\beta$ . Esto concuerda con Niessen<sup>29</sup> en darle un papel predominante a la epidermis en cuanto a la fisiopatogenia de la hipertrofia cutánea se refiere.

En este trabajo nosotros observamos un papel principal para los queratinocitos que conforman la epidermis, ya que suponemos que presentan una transcripción activa, debido a que la marca que localizamos se encuentra tanto en el citoplasma, como en el núcleo de nuestras células. Hoy día es bien demostrado que para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , existe una regulación transcripcional y traduccional regulada de manera excluyente, así que nuestros datos sugieren que in situ hay una transcripción de novo en las cicatrices hipertróficas y que estas citocinas pueden tener una regulación postranscripcional alterada en la patología, que no siempre concuerda con la proteína funcional resultante<sup>30</sup>.

Por otro lado se ha propuesto que TNF- $\alpha$  regula el proceso de cicatrización participando en la degradación y remodelación adecuada de las fibras de colágena, y nuestros datos en conjunto muestran una disminución en la expresión del gen de TNF- $\alpha$  para la cicatriz hipertrófica, por lo que inferimos que efectivamente el mensajero de TNF- $\alpha$  participa en el proceso de cicatrización normal, y una alteración en éste puede provocar disfunción cutánea.

Para IL1- $\beta$ , se ha reportado que participa en la primera fase de la cicatrización<sup>31</sup>. Lo que nos lleva a suponer que la liberación de citocinas en las primeras fases de cicatrización no sólo amplifica la reacción inflamatoria, sino que media la pleiotropía del tejido dañado activando la inmunidad humoral<sup>32</sup>. Nosotros consideramos que es necesario evaluar a nivel sistémico la producción de estas citocinas ya sea en suero o en células de sangre periférica, y monitorear a los pacientes conforme la cicatriz va madurando.

En general existe una variabilidad de los pacientes para producir citocinas debido a que intervienen procesos no sólo de transcripción de la citocina, sino también la regulación post-transcripcional, intercambio del proteosoma mediado por citocinas, el procesamiento de las citocinas por sus enzimas convertidoras, la regulación del receptor de citocinas, receptores solubles de citocinas,

receptores accesorios, antagonistas naturales de las citocinas, todos estos procesos participan en concierto para determinar la disponibilidad funcional de una citocina cualquiera.

IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  tienen efectos inhibitorios sobre el gen de la colágena I, sin embargo no se conocen exactamente los mecanismos de estos efectos, pero probablemente se encuentren mediados por segundos mensajeros como el AMP cíclico, el calcio intracelular y por proteínas reguladoras de la transcripción. O bien también se ha propuesto un lenguaje cruzado (*cross-talk*) entre IL 1- $\beta$  y TGF- $\beta$ <sup>33</sup>, y entre TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ <sup>34</sup>, por lo que es posible considerar que existe un control cruzado dosis-dependiente de la expresión de estos tres genes, los cuales al parecer tienen importantes efectos en sistemas biológicos. Finalmente, si se encontraran hallazgos relativos a los polimorfismos de la región promotora de ambos genes de IL-1 $\beta$  y de TNF- $\alpha$  que inciden directamente en los niveles de síntesis de estas citocinas, podríamos postular que una regulación postranscripcional podría ser de utilidad terapéutica.

## Conclusión

- El análisis histopatológico se caracterizó por un infiltrado inflamatorio leve en las cicatrices hipertróficas. Lo que nos hace suponer que los linfocitos no son las células encargadas de perpetuar el daño.
- Existe una disminución del mensajero de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en cicatriz hipertrófica posquemadura en biopsia de piel completa, mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativo.
- In situ sugerimos que existe una transcripción de novo o activa tanto para IL-1 $\beta$  como para TNF- $\alpha$  en epidermis de cicatrices hipertróficas.
- La cicatriz hipertrófica puede deber su formación a un mayor número de queratinocitos que expresan menor cantidad del mensajero de IL-1 $\beta$  al compararse con cicatriz normal.
- In situ para TNF- $\alpha$  no se muestran diferencias en la intensidad de expresión entre epidermis y dermis en la cicatriz hipertrófica.
- La cicatriz hipertrófica posquemadura no se atribuye a una sobreexpresión de los mensajeros de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$

## Referencias

1. Linares HA. From wound to scar. Burns. 1996 Aug;22(5):339-52. [↑](#) | [CrossRef](#) | [PubMed](#) |
2. Muir IF. On the nature of keloid and hypertrophic scars. Br J Plast Surg. 1990 Jan;43(1):61-9. [↑](#) | [CrossRef](#) | [PubMed](#) |
3. Magliacani G, Stella M, Castagnoli C. Classification of Pathological Burn Scars. Annals of Burns and Fire Disasters - vol. XII - n. 1 - March 1999 [↑](#) | [Link](#) |
4. Castagnoli C, Stella M, Magliacani G, Ferrone S, Richiardi PM. Similar ectopic expression of ICAM-1 and HLA class II molecules in hypertrophic scars following thermal injury. Burns. 1994 Oct;20(5):430-3. [↑](#) | [CrossRef](#) | [PubMed](#) |

5. Castagnoli C, Trombotto C, Ondei S, Stella M, Calcagni M, Magliacani G, Alasia ST. Characterization of T-cell subsets infiltrating post-burn hypertrophic scar tissues. *Burns*. 1997 Nov-Dec;23(7-8):565-72. ↑ | [CrossRef](#) | [PubMed](#) |
6. Castagnoli C, Trombotto C, Ondei S, Stella M, Calcagni M, Magliacani G, Alasia ST. Characterization of T-cell subsets infiltrating post-burn hypertrophic scar tissues. *Burns*. 1997 Nov-Dec;23(7-8):565-72. ↑ | [CrossRef](#) | [PubMed](#) |
7. Castagnoli C, Stella M, Magliacani G, Alasia ST, Richiardi P. Anomalous expression of HLA class II molecules on keratinocytes and fibroblasts in hypertrophic scars consequent to thermal injury. *Clin Exp Immunol*. 1990 Nov;82(2):350-4. ↑ | [CrossRef](#) | [PubMed](#) | [PubMed Central](#) |
8. M. Stella, C. Castagnoli, C. Trombotto, M. Calcagni, G. Magliacani and S. Teich Alasia. Interrelationship between immunocompetent and structural cells in post-burn scars. *European Journal of Plastic Surgery*. Volume 21, Number 1. ↑ | [CrossRef](#) |
9. Santucci M, Borgognoni L, Reali UM, Gabbiani G. Keloids and hypertrophic scars of Caucasians show distinctive morphologic and immunophenotypic profiles. *Virchows Arch*. 2001 May;438(5):457-63. ↑ | [CrossRef](#) | [PubMed](#) |
10. Castagnoli C, Stella M, Berthod C, Magliacani G, Richiardi PM. TNF production and hypertrophic scarring. *Cell Immunol*. 1993 Mar;147(1):51-63. ↑ | [CrossRef](#) | [PubMed](#) |
11. Castagnoli W, Stella W, Magliacani W, Richiardi R. The role of TNF alpha and beta cytokines in scar hypertrophy in burn patients: an immunohistochemical study. *Ann. Medit. Burns Club - vol. VIII - n. I - March 1995*. ↑ | [Link](#) |
12. Kovacs EJ. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol Today*. 1991 Jan;12(1):17-23. ↑ | [CrossRef](#) | [PubMed](#) |
13. Sporn MB, Roberts AB. Peptide growth factors are multifunctional. *Nature*. 1988 Mar 17;332(6161):217-9. ↑ | [CrossRef](#) | [PubMed](#) |
14. Kovacs EJ, DiPietro LA. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J*. 1994 Aug;8(11):854-61. ↑ | [PubMed](#) |
15. Georgopoulos S, Plows D, Kollias G. Transmembrane TNF is sufficient to induce localized tissue toxicity and chronic inflammatory arthritis in transgenic mice. *J Inflamm*. 1996;46(2):86-97. ↑ | [PubMed](#) |
16. Rothe J, Gehr G, Loetscher H, Lesslauer W. Tumor necrosis factor receptors--structure and function. *Immunol Res*. 1992;11(2):81-90. ↑ | [CrossRef](#) | [PubMed](#) |
17. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*. 1996 Nov 1;87(3):565-76. ↑ | [CrossRef](#) | [PubMed](#) |
18. Oppenheim JJ, Kovacs EJ, Matsushima K, Durum SK. There is more than one interleukin 1. *Immunology Today*. Volume 7, Issue 2, February 1986, Pages 45-56. ↑ | [CrossRef](#) |
19. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996 Mar 15;87(6):2095-147. ↑ | [PubMed](#) |
20. O'Neill LA, Dinarello CA. The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today*. 2000 May;21(5):206-9. ↑ | [CrossRef](#) | [PubMed](#) |
21. Le J, Vilcek J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest*. 1987 Mar;56(3):234-48. ↑ | [PubMed](#) |
22. Dinarello CA. The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw*. 1994 Nov-Dec;5(6):517-31. ↑ | [PubMed](#) |
23. Solís-Herruzo JA. Bases moleculares de la fibrosis hepática. *Gastroent y Hepatol*. 1988. 11, 463-483. ↑
24. Kanitakis J, Petruzzo P, Jullien D, Badet L, Dezza MC, Claudy A, Lanzetta M, Hakim N, Owen E, Dubernard JM. Pathological score for the evaluation of allograft rejection in human hand (composite tissue) allotransplantation. *Eur J Dermatol*. 2005 Jul-Aug;15(4):235-8. ↑ | [PubMed](#) |
25. Peruccio D, Castagnoli C, Stella M, D'Alfonso S, Momigliano PR, Magliacani G, Alasia ST. Altered biosynthesis of tumour necrosis factor (TNF) alpha is involved in postburn hypertrophic scars. *Burns*. 1994 Apr;20(2):118-21. ↑ | [CrossRef](#) | [PubMed](#) |
26. Zhang JL, Lin ZH, Jiang H, Yuan XB, Zhao YZ, Wu JM, Zhu XH, Wu H. [The dynamic expression of TNF-alpha mRNA of hypertrophic scars and its roles]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2004 Jan;20(1):57-9. ↑ | [PubMed](#) |
27. Armendariz-Borunda J, Katayama K, Seyer JM. Transcriptional mechanisms of type I collagen gene expression are differentially regulated by interleukin-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and transforming growth factor beta in Ito cells. *J Biol Chem*. 1992 Jul 15;267(20):14316-21. ↑ | [PubMed](#) |
28. Tredget EE, Yang L, Delehanty M, Shankowsky H, Scott PG. Polarized Th2 cytokine production in patients with hypertrophic scar following thermal injury. *J Interferon Cytokine Res*. 2006 Mar;26(3):179-89. ↑ | [CrossRef](#) | [PubMed](#) |
29. Niessen FB, Schalkwijk J, Vos H, Timens W. Hypertrophic scar formation is associated with an increased number of epidermal Langerhans cells. *J Pathol*. 2004 Jan;202(1):121-9. ↑ | [CrossRef](#) | [PubMed](#) |
30. Hernández-Rodríguez J, Segarra M, Vilardell C, Sánchez M, García-Martínez A, Esteban MJ, Queralt C, Grau JM, Urbano-Márquez A, Palacín A, Colomer D, Cid MC. Tissue production of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, TNFalpha and IL-6) correlates with the intensity of the systemic inflammatory response and with corticosteroid requirements in giant-cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2004 Mar;43(3):294-301. *Epub* 2003 Dec 16. ↑ | [PubMed](#) |
31. Phillips R, Horsfield C, Mangan J, Laing K, Etuaful S, Awuah P, Nyarko K, Osei-Sarpong F, Butcher P, Lucas S, Wansbrough-Jones M. Cytokine mRNA expression in *Mycobacterium ulcerans*-infected human skin and

- correlation with local inflammatory response. Infect Immun. 2006 May;74(5):2917-24. ↑ | [CrossRef](#) | [PubMed](#) | [PubMed Central](#) |
32. Sun KH, Yu CL, Tang SJ, Sun GH. Monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody stimulates the expression and release of IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha from normal human mononuclear cells involving in the lupus pathogenesis. Immunology. 2000 Mar;99(3):352-60. ↑ | [CrossRef](#) | [PubMed](#) | [PubMed Central](#) |
33. Lu T, Tian L, Han Y, Vogelbaum M, Stark GR. Dose-dependent cross-talk between the transforming growth factor-beta and interleukin-1 signaling pathways. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Mar 13;104(11):4365-70. Epub 2007 Mar 5. ↑ | [CrossRef](#) | [PubMed](#) | [PubMed Central](#) |
34. Goldberg MT, Han YP, Yan C, Shaw MC, Garner WL. TNF-alpha suppresses alpha-smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. J Invest Dermatol. 2007 Nov;127(11):2645-55. Epub 2007 May 31. ↑ | [CrossRef](#) | [PubMed](#) | [PubMed Central](#) |



Esta obra de Medwave está bajo una licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 3.0 Unported. Esta licencia permite el uso, distribución y reproducción del artículo en cualquier medio, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente al autor del artículo y al medio en que se publica, en este caso, Medwave.