



Localizador: 17007

Desmogleína1, CD44, Sindecan-1, Galectina-3 y EGFR en la epidermis normal e hiperplásica

Desmoglein1, CD44, Syndecan-1, Galectin-3 and EGFR in the normal and hyperplastic epidermis

Luz Marina Carrillo,* Enrique Arciniegas Cotadira,† Héctor Rojas,§ Richard Ramírez,* Oscar Reyes,* William Ortiz*

Palabras clave:

Barrera epidérmica, epidermis hiperplásica, desmogleína1, N-terminal, red galectina-glicano.

Key words:

Epidermal barrier, hyperplastic epidermis, desmoglein1, N-terminal, galectin-glycan lattice.

RESUMEN

Introducción: La participación de algunas moléculas en la arquitectura y funcionamiento de la barrera epidérmica no ha sido completamente estudiada. Entre estas moléculas están desmogleína1, CD44, sindecan-1 y EGFR caracterizadas por presentar un N-terminal que posee cadenas laterales de glicanos, y galectina-3, un receptor de glicanos que contienen β -galactósidos. **Objetivo:** Examinar la distribución y localización de desmogleína1, CD44, sindecan-1, EGFR y galectina-3 en la epidermis normal y en la hiperplasia observada en liquen plano, placa psoriática y CBC. **Material y métodos:** Biopsias de pacientes diagnosticados con liquen plano, psoriasis vulgar y CBC (5 por cada patología) fueron seleccionadas. Seis muestras de piel normal también fueron examinadas. La distribución y localización de desmogleína1, CD44, sindecan-1, EGFR y galectina-3 fue examinada por inmunofluorescencia usando un microscopio confocal. **Resultados:** En la epidermis normal desmogleína1, CD44, sindecan-1 y galectina-3 fueron detectadas en las capas superiores delineando los márgenes celulares y puentes entre queratinocitos adyacentes con un gradiente de expresión que aumentaba desde la capa basal hasta las capas suprabasales, mientras que en las epidermis hiperplásicas estaban restringidas a las capas suprabasales, apareciendo interrumpidas en los puentes entre muchos queratinocitos. **Conclusiones:** Nuestras observaciones sugieren que desmogleína1, CD44, sindecan-1 y EGFR a través de sus cadenas laterales de N- y O-glicanos podrían establecer asociaciones facilitadas por galectina-3, dando lugar a una red molecular que contribuiría al ensamblaje y estabilidad de los desmosomas en las capas superiores de la epidermis y que la perturbación de esta red podría dar lugar a una hiperplasia epidérmica.

ABSTRACT

Introduction: The participation of some molecules in the architecture and functioning of the skin barrier has not been yet completely studied. Among these molecules are desmoglein1, CD44, syndecan-1, and EGFR which are characterized by exhibiting an N-terminal that possesses lateral chains of glycans, and the galectin-3, a receptor of glycans that contain β -galactoside residues. **Objective:** To examine the distribution and localization of desmoglein1, CD44, syndecan-1, EGFR and galectin-3 in the normal and hyperplastic epidermis. **Material and methods:** Biopsies of patients diagnosed with lichen planus, psoriasis vulgaris, and BCC (five per each) were selected. Six samples of normal human skin were also examined. The distribution and localization of desmoglein1, CD44, syndecan-1, EGFR and galectin-3 was examined by immunofluorescence staining using confocal laser scanning microscopy. **Results:** In the normal epidermis desmoglein1, CD44, syndecan-1, and galectin-3 were detected in the upper most cell layers delineating the cellular margins and intercellular bridges between adjacent keratinocytes with an expression gradient that increased from the basal layer until suprabasal layers, while in the hyperplastic epidermis they were restricted to suprabasal layers, appearing interrupted in the intercellular bridges of many keratinocytes. **Conclusions:** Our observations suggest that Dsg1, CD44, syndecan-1 and EGFR through their N- and O-glycans would establish associations facilitated by galectin-3 forming a molecular lattice that would contribute to the assembly and stability of desmosomes in the upper most cell layers of the epidermis and that perturbation of this lattice would lead to epidermal hyperplasia.

* Servicio Autónomo
Instituto de Biomedicina.
† Instituto de Biomedicina.
§ Instituto de Inmunología,
Universidad Central de
Venezuela, Caracas-
República Bolivariana de
Venezuela.

Conflict of interests:
Ninguno.

Received:
23/Febrero/2017.

Accepted:
04/Julio/2007.



INTRODUCCIÓN

La epidermis es un epitelio escamoso estratificado que tiene como función, entre otras, la de ser una barrera protectora para prevenir el daño celular. Esta función protectora depende de la adhesión célula-célula o uniones intercelulares complejas que incluyen a los desmosomas, uniones adherentes y uniones herméticas, cuya estabilidad involucra una programación bien

sincronizada de estratificación y diferenciación de los queratinocitos.¹⁻³ La alteración de la arquitectura de estas uniones complejas afecta sus funciones y puede resultar en hiperplasia epidérmica (acantosis), la cual se caracteriza por proliferación, diferenciación anormal y supervivencia de los queratinocitos, siendo por lo tanto considerado el evento inicial que conduce a la aparición de algunas lesiones cutáneas tales como liquen plano, psoriasis y carcinoma

basocelular (CBC).²⁻⁷ A nivel molecular, los desmosomas se caracterizan por poseer dos clases de glicoproteínas transmembrana: las desmogleínas (Dsgs) y las desmocolinas (Dscs), pertenecientes a la familia de las cadherinas desmosomales. En humanos cuatro isoformas de Dsg (Dsg1-4) son expresadas de manera específica.^{4,8-10} La Dsg1 posee una región extracelular o N-terminal y una región intracelular o C-terminal que son esenciales para la adhesión célula-célula en las capas superiores de la epidermis, y para la diferenciación terminal de los queratinocitos.^{2,4,8} Se ha sugerido que el N-terminal de la Dsg1 está organizado en cinco ectodomios o regiones extracelulares que al parecer median la adhesión célula-célula y son dependientes de Ca²⁺ para su función (EC1-EC5).^{4,9,10} Algunos contienen cadenas laterales de N-glicanos o carbohidratos, las cuales consisten de ácido siálico, N-acetil-lactosamina (LacNAc); esta última compuesta de β-galactosa (β-Gal) y N-acetil-glucosamina (GlcNAc), y manosa.¹¹

Otra molécula, cuyo N-terminal también contiene cadenas laterales de glicanos, es CD44. Este proteoglicano, además de contener algunos N-glicanos, también posee cadenas laterales de O-glicanos, los cuales están representados por cadenas de heparán sulfato, el cual consiste en disacáridos compuestos de GlcNAc y ácido urónico y condroitín sulfato que consiste de N-acetil-galactosamina (GalNAc) y GlcA.^{12,13} Es importante destacar que los N- y O-glicanos son considerados como plataformas de señalización en muchos eventos fisiológicos y patológicos tales como adhesión célula-célula, crecimiento celular, motilidad, proliferación, diferenciación, endocitosis, autoinmunidad, angiogénesis, desarrollo tumoral y metástasis.¹⁴⁻¹⁶ En la piel, CD44 es expresado en la membrana plasmática de los queratinocitos siendo requerido para su estratificación y diferenciación determinando el funcionamiento normal de la epidermis como barrera.¹⁷⁻¹⁹ Además de estas funciones, se ha sugerido su posible papel en la inflamación cutánea²⁰ y en la hiperplasia epidérmica.^{21,22} No obstante, el papel de sus N- y O-glicanos en la epidermis aún no está definido.

En forma similar a CD44, el proteoglicano transmembrana sindecan-1 o CD138 (Sind-1) presenta un N-terminal con cadenas laterales de O-glicanos representadas por heparán sulfato y condroitín sulfato.^{23,24} En piel, Sind-1 es el proteoglicano más abundante en la epidermis, mayormente localizado en las capas suprabasales y es considerado como esencial para los procesos de adhesión intercelular, proliferación, estratificación y diferenciación de los queratinocitos.^{25,26} Así mismo, cambios en la expresión de Sind-1 han sido asociados con la psoriasis²⁷ y con el desarrollo de lesiones cutáneas malignas.²⁸ Sin embargo, al igual que CD44, el papel de sus O-glicanos en la epidermis tampoco ha sido definido.

Recientemente, se ha sugerido que galectina-3 (Gal-3), un receptor de glicanos, interviene en la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular. Gal-3, también conocida como Mac-2 o proteína de unión a IgE, es un miembro de la familia de las galectinas que se localiza intra- y extracelularmente y se enlaza preferiblemente a residuos de β-galactosa y lactosa (por ejemplo, el poli-N-Acetyl-lactosamina) presente en los N- y O-glicanos, a través de su dominio para el reconocimiento de carbohidratos (CRD). Por otra parte, su N-terminal puede formar pentámeros que le permiten actuar como puentes entre células y células-matriz extracelular al enlazarse simultáneamente a los glicanos de dos o más glicoproteínas generando una red molecular denominada red galectina-glicano (red Gal-glicano) (en inglés *Gal-glycan lattice*).²⁹⁻³² Estas redes moleculares pueden regular, utilizando rutas de señalización específicas, procesos celulares que incluyen la adhesión célula-célula, célula matriz extracelular, proliferación, crecimiento, diferenciación, inflamación, respuesta inmune, apoptosis y cáncer.²⁹⁻³² En piel normal, algunos estudios han mostrado que Gal-3 es expresada no sólo en queratinocitos, en el folículo piloso y en glándulas ecrinas, sino también por otras células residentes en la epidermis y dermis, incluyendo melanocitos, células dendríticas, fibroblastos y monocitos.³³ Otros estudios han sugerido que Gal-3 podría estar relacionada con procesos de crecimiento, apoptosis, motilidad, invasión y metástasis, siendo considerada por algunos como blanco terapéutico para una variedad de lesiones cutáneas.^{33,34} No obstante, la distribución y localización de Gal-3 y su relativa contribución, junto con Dsg1, CD44 y Sind-1 en el mantenimiento de la estructura y funcionamiento de la epidermis normal como barrera, así como también sus implicaciones en la hiperplasia epidérmica, no ha sido completamente elucidada. Por lo tanto, en este estudio examinamos la distribución y localización de Dsg1, CD44, Sind-1 y Gal-3 en la epidermis normal, así como en la epidermis engrosada o hiperplásica observada en algunas lesiones tales como liquen plano, placa psoriática y CBC para establecer si existe una relación entre la localización espacial molecular y las patologías. También en este estudio consideramos la posibilidad de que estas moléculas se organicen en redes reguladoras que contribuyen al mantenimiento de la arquitectura y funcionamiento de la barrera epidérmica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio observacional, descriptivo, de corte transversal se seleccionaron biopsias de piel de pacientes

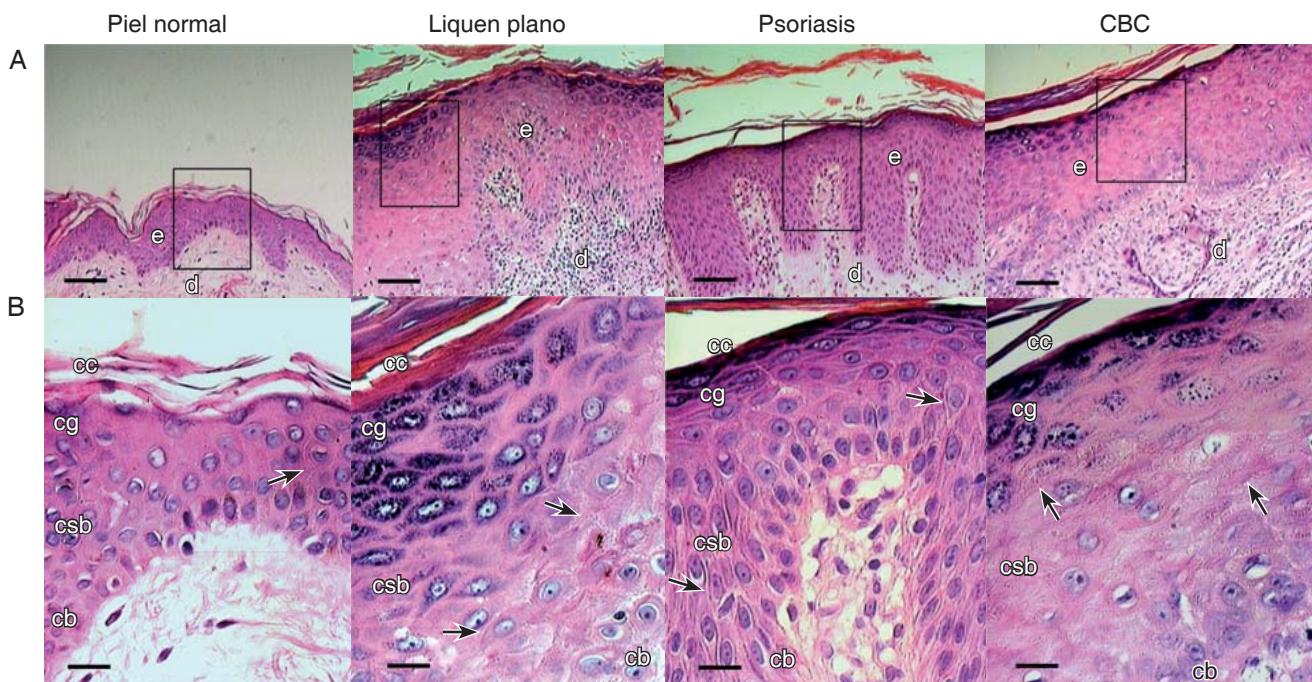


Figura 1. (A) Una serie representativa de fotomicrografías histológicas (H&E) de una biopsia de piel humana normal, liquen plano, placa psoriática y CBC que muestran engrosamientos en la epidermis con alargamiento de las crestas en redes (b-d). e, epidermis; d, dermis. Barra: 60 μ m. (B) Ampliación de la figura «A» que muestra las capas basal (cb), suprabasal (csb), granular (cg) y córnea (cc). Note la presencia de queratinocitos organizados en grupos cohesivos que parecen mantenerse juntos por medio de puentes intercelulares (flechas) (f-h). Queratinocitos conteniendo abundantes gránulos de queratoquialina son también observados (f-h). e, epidermis; d, dermis. Barra: 20 μ m.

humanos diagnosticados clínica e histopatológicamente con liquen plano, psoriasis vulgar y CBC (5 por cada patología). Todas obtenidas de los archivos de la Sección de Dermatopatología del Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina (SAIB). La edad de los pacientes estuvo comprendida entre 30 y 54 años (lichen plano), 23 y 43 años (psoriasis) y 35 y 62 años (CBC). Seis muestras de piel normal de humano de áreas no expuestas, obtenidas de pacientes que acudieron a un centro de cirugía estética para la realización de procedimientos reconstructivos y cuyas edades estaban comprendidas entre los 20 y 50 años, también fueron incluidas como controles. Este estudio fue llevado a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y con las normas del Comité de Ética del SAIB.

Inmunofluorescencia indirecta

Para la inmunoabsorción, secciones seriadas de 4 μ m de espesor obtenidas de cada tejido fueron desparafinadas en xilol, deshidratadas en una serie de concentraciones decrecientes de etanol (100% a 70%) y equilibradas en so-

lución amortiguadora de fosfato (PBS) por 10 minutos. Las inespecificidades del anticuerpo fueron bloqueadas incubando las secciones en PBS conteniendo 3% de albúmina de suero bovino (BSA) y 0.1% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, IL) por una hora a temperatura ambiente. Las secciones fueron incubadas toda la noche en una cámara húmeda a 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal anti-Desmoglein1 de humano (clon 27B2) producido en ratón (Abcam, Cambridge, UK), anticuerpo monoclonal anti-CD44 de humano (clone DF1485) producido en ratón (Dako Cytomation, Denmark), anticuerpo monoclonal anti-sindecan-1/CD138 de humano (clon MI15) producido en ratón (Dako Cytomation, CA), o anticuerpo monoclonal anti-Galectina-3 de humano (clon A3A12) producido en ratón (Santa Cruz Biotechnology, CA). Los controles negativos fueron producidos usando suero normal o PBS en lugar del anticuerpo primario. Intestino normal de humano fue usado como control positivo para Galectina-3. Después de lavados sucesivos en PBS, un anticuerpo secundario, Alexa Flúor 488 anti-ratón, preparado en cabra (Invitrogen, Molecular Probes,

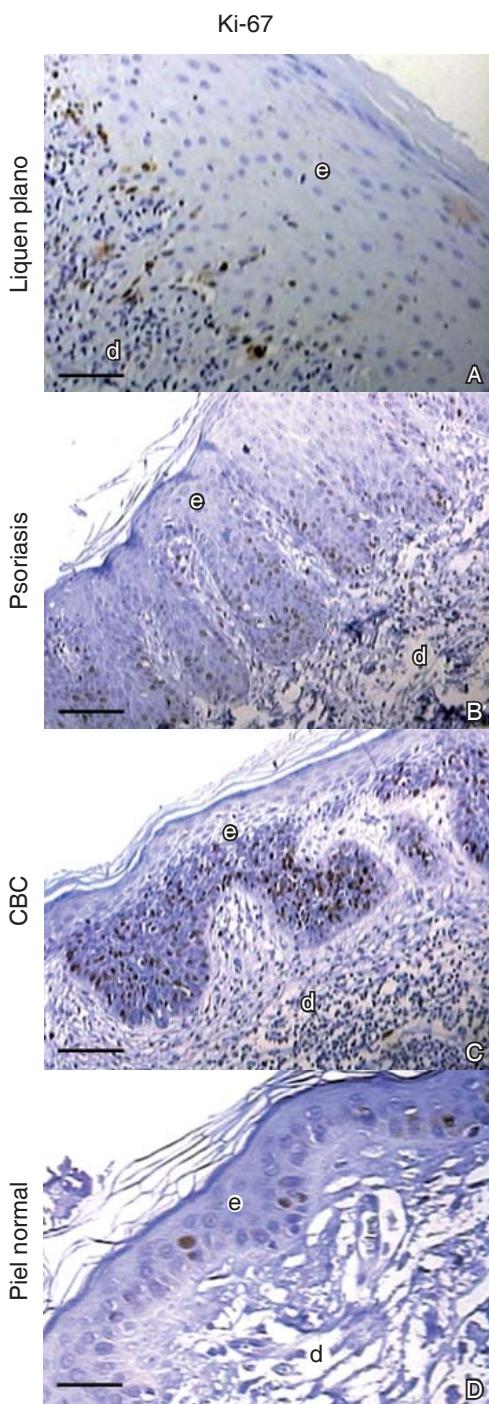


Figura 2. Inmunolocalización de Ki-67 en secciones de liquen plano, placa psoriática, CBC y piel normal. Inmunoreactividad nuclear para Ki-67 es observada en muchos queratinocitos basales y suprabasales en epidermis engrosadas (A-C), mientras que muy pocos núcleos positivos son detectados en los queratinocitos de la epidermis normal (D).

OR) o Alexa Fluor 594 anti-conejo preparado en cabra, fueron aplicados por 30 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. Luego las mismas muestras fueron lavadas nuevamente en PBS e incubadas con el DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol) (Invitrogen, Molecular Probes) por 15 minutos en la oscuridad, para la tinción de los núcleos. Finalmente, las láminas fueron lavadas otra vez en PBS y cubiertas con medio montante (Immuno-mount Shandon, Pittsburgh, PA).

Para la inmunodetección de EGFR, otras secciones fueron incubadas con un anticuerpo políclonal anti-fosfo-EGFR (pEGFR Tyr 845) producido en conejo (Santa Cruz Biotechnology).

Todas las imágenes fueron capturadas usando un microscopio invertido 1X81 Olympus Fluo-View con la configuración CLSM (confocal laser scanning microscope) equipado con el software de procesamiento FV10.ASW versión 02.01.01.04 (Olympus Corporation, Japan). El software Image J (NHS, Washington, DC) fue utilizado para el procesamiento de contraste y brillo.

Inmunoperoxidasa

Para el estudio de la proliferación epidérmica, las secciones fueron desparafinadas en xilol, deshidratadas en una serie de concentraciones decrecientes de etanol (100% a 70%) y equilibradas en PBS por 10 min. Luego tratadas con una solución recuperadora de antígenos (Dako Cytomation) e incubadas con un anticuerpo monoclonal Ki-67 de humano producido en ratón (clon MIB-1, Dako Cytomation) por 30 min a temperatura ambiente. Las secciones fueron reveladas usando el sistema EnVision Flex (Dako Cytomation) y contrastadas con hematoxilina de Mayer. Las secciones fueron examinadas con un microscopio invertido (IX70 Olympus, Olympus America Inc, Melville, NY). Las imágenes fueron capturadas usando el software Image Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

RESULTADOS

Análisis histopatológico

El análisis histopatológico de las biopsias de liquen plano, placa psoriática y CBC mostró engrosamientos en la epidermis (*Figura 1A*), así como queratinocitos organizados en grupos cohesivos que parecen mantenerse juntos por medio de puentes intercelulares, posiblemente cambiando de posición debido al crecimiento expansivo, una forma de movimiento celular (*Figura 1B*). Estos puentes intercelulares son considerados en la actualidad como uniones

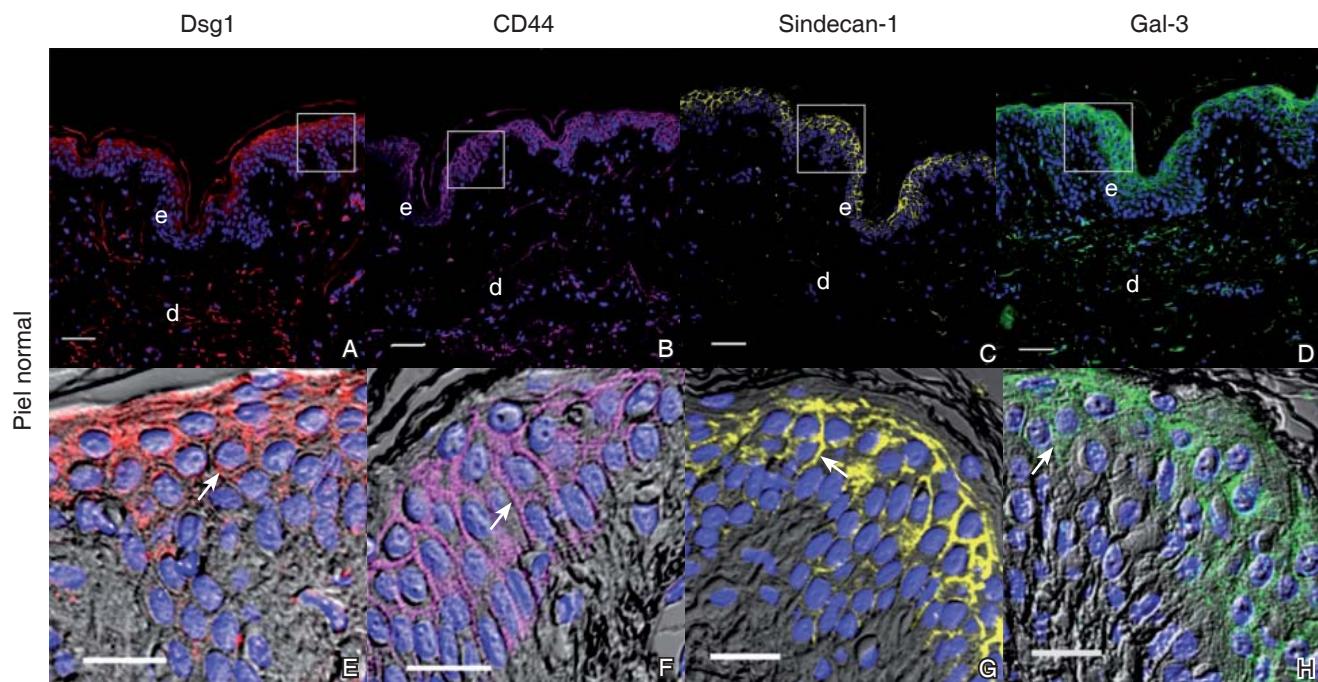


Figura 3. (A-D) Imágenes representativas de microscopía confocal láser (CLSM) de Dsg1, CD44, sind-1 y Gal-3 en secciones seriadas obtenidas de una misma muestra de piel normal donde se nota la presencia de ellas en las capas superiores de la epidermis. e, epidermis; d, dermis; azul, tinción nuclear con DAPI. (E-H) Superposición de imágenes de microscopía de interferencia diferencial (DIC) y fluorescencia. A mayor aumento Dsg1 (E), CD44 (F), sind-1 (G), y Gal-3 (H) son observadas en las capas superiores de la epidermis delineando los márgenes celulares y puentes intercelulares entre queratinocitos adyacentes en un patrón punteado y discontinuo (flechas). Azul, tinción nuclear con DAPI. Barra: 120 μ m (a-d); 30 μ m (E,F); 40 μ m (G,H).

transitorias o restos de complejos de uniones intercelulares.³⁵ Queratinocitos conteniendo abundantes gránulos de queratohialina fueron también observados (Figura 1B).

Inmunolocalización de Ki-67 *in vivo*

En este estudio, la presencia de Ki-67, una proteína nuclear expresada en células proliferativas, fue evaluada en las epidermis hiperplásicas. Como se esperaba, inmunotinción nuclear con el anti-Ki-67 fue detectada en muchos queratinocitos basales y suprabasales en la epidermis engrosadas (Figura 2A-C). En contraste, pocos núcleos positivos para Ki-67 fueron detectados en los queratinocitos de la epidermis normal (Figura 2D).

Inmunolocalización de Dsg1, CD44, Sindecan-1 y Gal-3 *in vivo*

La inmunotinción, analizada por microscopía confocal (CLSM) reveló que la distribución y localización de Dsg1,

CD44, Sind-1 y Gal-3 en la epidermis de liquen plano, placa psoriática y CBC fue distinta de aquella observada en la epidermis normal.

Como se esperaba, en la epidermis normal Dsg1 fue observada principalmente en las capas superiores en los sitios de adhesión célula-célula con un gradiente de expresión que parece aumentar desde la capa basal hasta las capas suprabasales (Figura 3A). Dsg1 aparecía delineando los márgenes celulares y los puentes intercelulares entre queratinocitos adyacentes en un patrón punteado y discontinuo (Figura 3E), mientras que en las epidermis engrosadas o hiperplásicas, Dsg1 estaba reducida, limitada a las capas suprabasales (Figuras 4 A, I, Q). La molécula aparecía interrumpida en los puentes intercelulares donde muchos queratinocitos estaban organizados como grupos cohesivos, reflejando una alteración en la adhesión célula-célula (Figuras 4 E, M, U).

Para CD44 y Sind-1, una fuerte inmunoreactividad fue observada en las capas superiores de la epidermis normal (Figuras 3 B y C). Ambos proteoglicanos fueron localizados

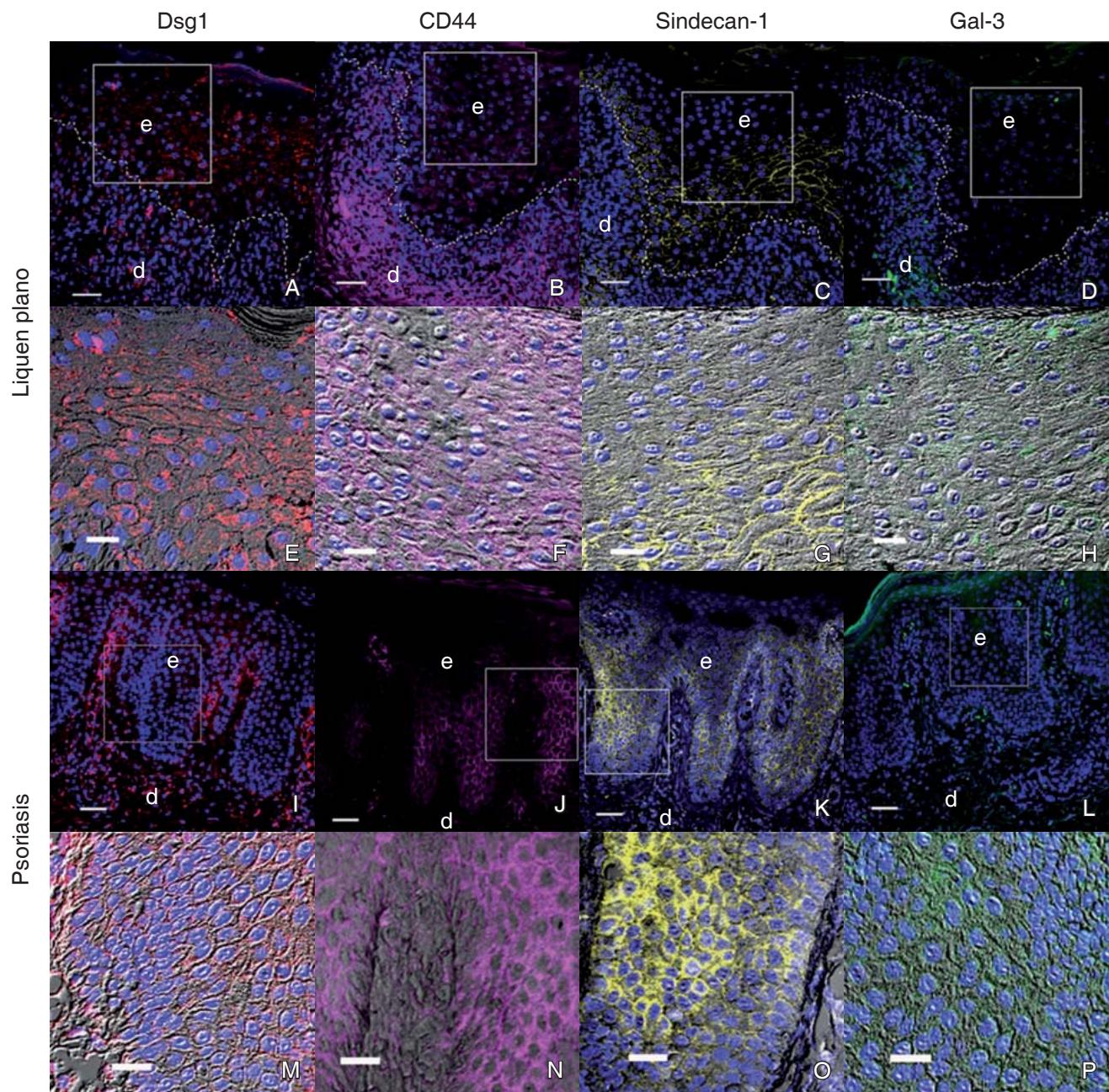
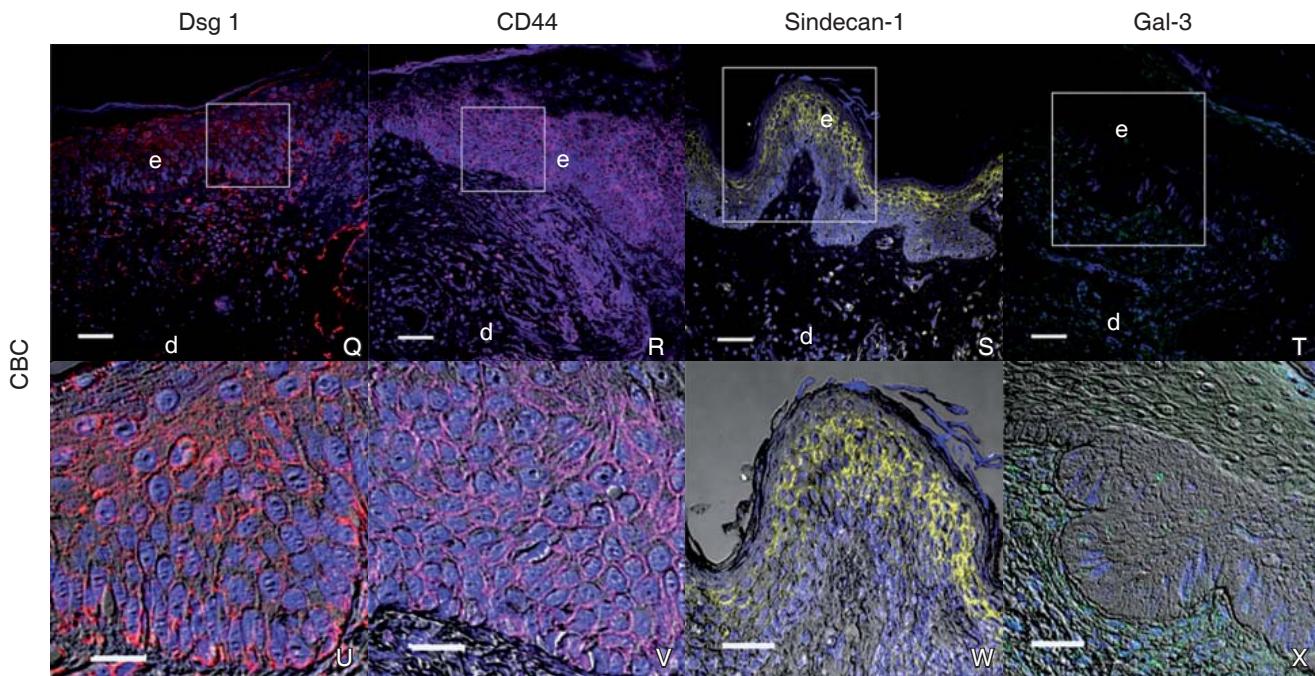


Figura 4. (A-D) Imágenes representativas de CLSM de Dsg1, CD44, Sind-1 y Gal-3 en secciones seriadas obtenidas de una misma biopsia de liquen plano. Note que la inmunoreactividad para estas moléculas en la epidermis aparece reducida y limitada a algunas células suprabasales. e, epidermis; d, dermis; azul, tinción nuclear con DAPI. Barra: 60 μ m. (E-H) Superposición de imágenes DIC y fluorescencia. A mayor aumento, la distribución y localización de Dsg1, CD44, Sind-1 y Gal-3 aparecen alteradas e interrumpidas en los puentes intercelulares. Azul, tinción nuclear con DAPI. Barra: 20 μ m. (I-L) Imágenes representativas de CLSM de Dsg1, CD44, Sind-1 y Gal-3 en secciones seriadas obtenidas de una misma biopsia de placa psoriática. Note que la inmunoreactividad para estas moléculas en la epidermis aparece reducida y limitada a algunas células suprabasales. e, epidermis; d, dermis; azul, tinción nuclear con DAPI. Barra: 60 μ m. (M-P) Superposición de imágenes DIC y fluorescencia. A mayor aumento, la distribución y localización de Dsg1, CD44, Sind-1 y Gal-3 se observan alteradas e interrumpidas en los puentes intercelulares. Azul, tinción nuclear con DAPI. Barra: 20 μ m.



Continúa Figura 4. (Q-T) Imágenes representativas de CLSM de Dsg1, CD44, Sind-1 y Gal-3 en secciones seriadas obtenidas de una misma biopsia de CBC. Note que la inmunoreactividad para estas moléculas en la epidermis aparece reducida y limitada a algunas células basales y suprabasales. e, epidermis; d, dermis; azul, tinción nuclear con DAPI. Barra: 60 μ m. (M-P) Superposición de imágenes DIC y fluorescencia. A mayor aumento, la distribución y localización de Dsg1, CD44, Sind-1 y Gal-3 se observan alteradas e interrumpidas en los puentes intercelulares. Azul, tinción nuclear con DAPI. Barra: 20 μ m.

delineando los márgenes y puentes intercelulares entre queratinocitos adyacentes en un patrón punteado y discontinuo con un gradiente de expresión que parece aumentar desde la capa basal hasta las suprabasales (*Figuras 3 F y G*), mientras que en los engrosamientos epidérmicos CD44 y Sind-1 estaban restringidos a las capas basal y suprabasales (*Figuras 4 B, C, J, K, R, S*). Éstos aparecían interrumpidos en los puentes intercelulares de muchos queratinocitos que estaban organizados como grupos cohesivos (*Figuras 4 F, G, N, O, V, W*).

De manera interesante, Gal-3 fue observada en las capas superiores de la epidermis normal (*Figuras 3D, H*) en el citoplasma de queratinocitos adyacentes, delineando los márgenes celulares y puentes intercelulares en un patrón punteado y discontinuo, con un gradiente de expresión que parece aumentar desde la capa basal hasta las capas suprabasales (*Figura 3 D, H*). En contraste, en las epidermis hiperplásicas Gal-3 estaba muy reducida o ausente (*Figuras 4 D, H, L, P, T, X*).

En ningún caso se detectó inmunoreactividad cuando el anticuerpo primario fue reemplazado por PBS o por un suero no específico (control negativo, no mostrado).

Inmunolocalización de CD44, Sind-1 y Gal-3 en la zona perilesional y zona lesionada de un liquen plano

Para comparar la distribución y localización de CD44, Sind-1 y Gal-3 en una misma biopsia de liquen plano que incluía una zona perilesional y una zona lesionada o hiperplásica, secciones seriadas fueron examinadas por inmunofluorescencia.

El examen de la zona perilesional reveló que CD44, Sind-1 y Gal-3 estaban localizadas en las capas superiores, en sitios de adhesión célula-célula (*Figura 5*), mientras que en la zona lesionada CD44 y Sind-1 aparecían limitadas a las capas basal y suprabasales estando reducida su expresión al compararla con la zona perilesional (*Figura 5*). Esta distribución y localización particular sugiere una alteración en la adhesión intercelular. En cuanto a Gal-3, ella aparecía muy reducida (*Figura 5*).

Inmunolocalización de EGFR *in vivo*

En este estudio también examinamos la distribución y localización de EGFR en epidermis engrosadas. Este receptor

tirosina quinasa modula la actividad de los queratinocitos³⁶ y posee un N-terminal con al menos ocho N-glicanos.^{14,16} Para ello, un anticuerpo que reconoce su forma activada (fosfo-EGFR) (Tyr845) fue utilizado. La inmunofluorescencia reveló que EGFR activado estaba limitado a las capas superiores de la epidermis normal, localizado en la membrana y citoplasma de los queratinocitos (*Figura 6A*), mientras que en las epidermis hiperplásicas la presencia de este receptor fue notable en el núcleo de muchos queratinocitos basales y suprabasales, sugiriendo su activación, internalización y eventual translocación (*Figuras 6 B y C*).

DISCUSIÓN

En este estudio reportamos que en la epidermis normal de humanos las moléculas Dsg1, CD44 y Sind-1 estaban inmunolocalizadas en las capas superiores delineando los márgenes celulares y puentes intercelulares entre los queratinocitos, con un gradiente de expresión que

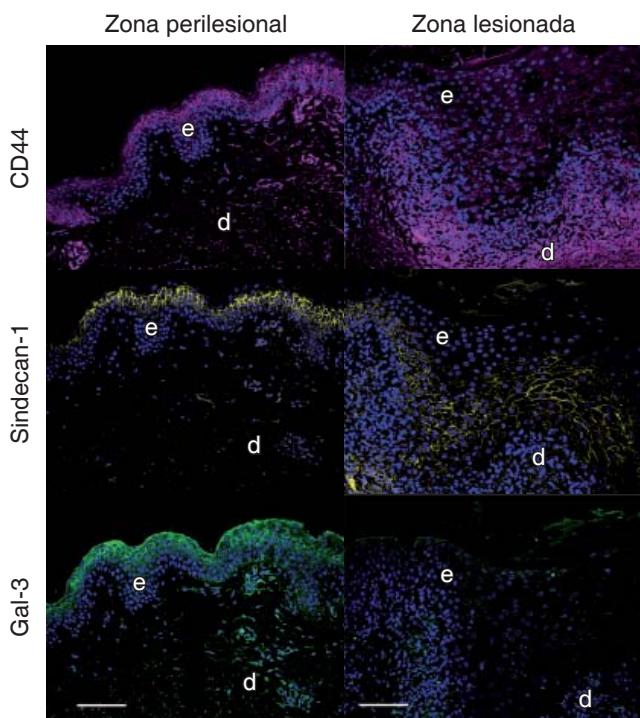
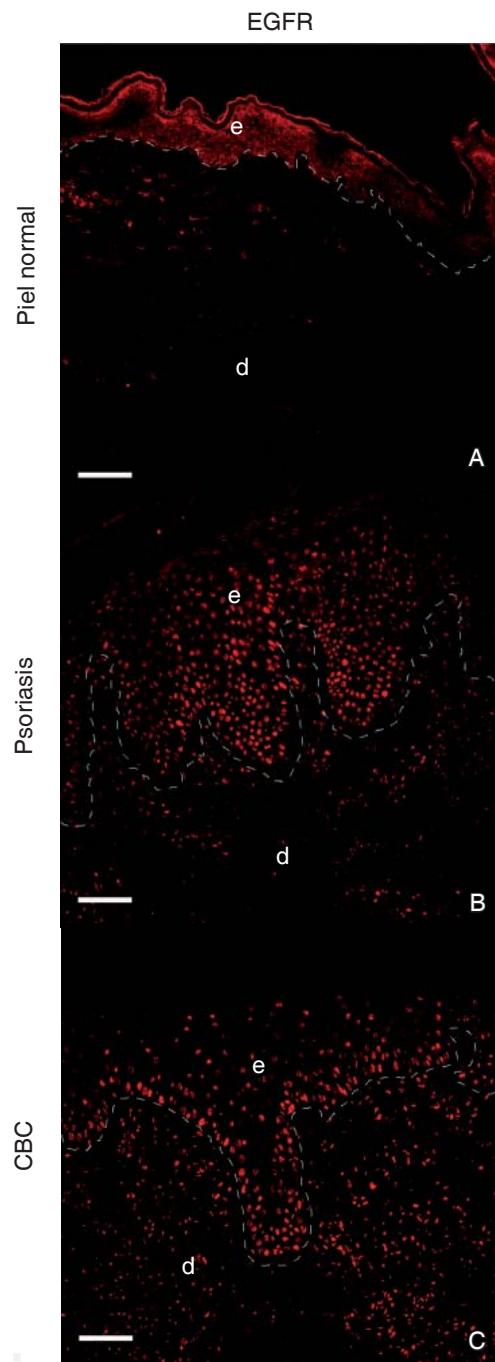


Figura 5. Imágenes representativas de CLSM de CD44, Sind-1 y Gal-3 en una misma biopsia de liquen plano que exhiben una zona perilesional (A-C) y una zona lesionada (D-F). Note que la inmunoreactividad para estas moléculas en la epidermis lesionada aparece limitada a las capas basal y suprabasal y reducida en comparación con la zona perilesional. (E). Epidermis; d, dermis. Azul, tinción nuclear con DAPI. Barra: 80 μm.



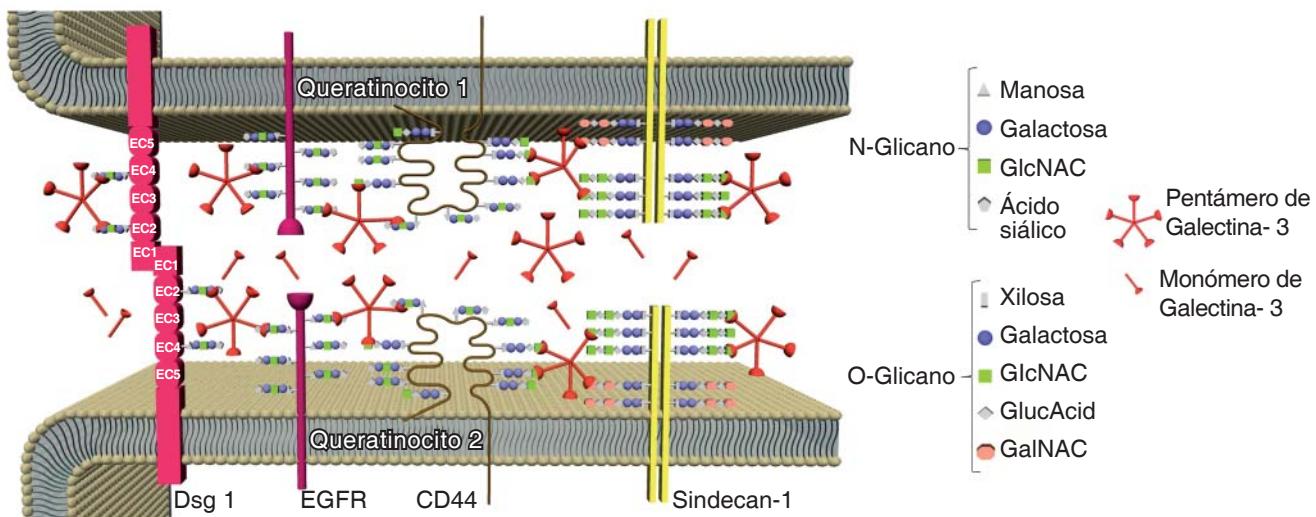


Figura 7. Red molecular hipotética de galectina-glicanos en la superficie de queratinocitos adyacentes involucrando a Dsg1, EGFR, CD44, Síndecan-1 y Gal-3.

parece aumentar desde la capa basal hasta las capas suprabasales, mientras que en las epidermis hiperplásicas o engrosadas Dsg1, CD44 y Sind-1 estaban restringidas a la capa basal y suprabasales sin un gradiente aparente, apareciendo interrumpidas en los puentes intercelulares de muchos queratinocitos. Creemos que la localización y distribución tan particular de Dsg1, CD44 y Sind-1, observada en la epidermis normal, podría estar asociada con el mantenimiento estructural de las adhesiones queratinocito-queratinocito y con la estratificación y diferenciación de los mismos, y que la alteración en la expresión, localización y distribución de esas moléculas observadas en las epidermis hiperplásicas podría afectar la proliferación, estratificación y diferenciación terminal de los queratinocitos, contribuyendo de esta manera al desarrollo de lesiones cutáneas como liquen plano, placa psoriática y CBC. Consistente con esto, estudios previos han indicado que Dsg1, CD44 y Sind-1, además de ser esenciales para la adhesión célula-célula en las capas superiores, también regulan la proliferación, estratificación y diferenciación terminal de los queratinocitos, así como la morfogénesis epidérmica, sugiriendo que las alteraciones en la expresión y localización de estas moléculas podrían contribuir al desarrollo de algunas lesiones de la piel tales como acantólisis, pénfigo, psoriasis y CBC.^{1-4,9,10,13,17,18,20-22,26,28} Adicionalmente, otros estudios han propuesto que el N-terminal de la Dsg1 está organizado en cinco ectodomios que median la adhesión célula-célula,^{4,9,10} algunos de ellos conteniendo N-glicanos formados de

β -galactosa y GlcNAc.¹¹ De manera interesante, estudios previos habían demostrado que la remoción de los N-glicanos de la Dsg1 resultaba en la pérdida de la adhesión entre los queratinocitos de las capas superiores, sugiriendo que los N-glicanos de la Dsg1 podrían ser cruciales para el mantenimiento de la epidermis y la prevención de la descamación prematura, protegiendo a los desmosomas y corneosomas de la proteólisis.³⁶

Para el caso de CD44 y Sind-1, considerados esenciales en la adhesión, proliferación, estratificación y diferenciación de los queratinocitos, éstos presentan un N-terminal que contiene glicanos que exhiben residuos de GlcNAc, β -galactosa y GalNAc.^{12,13,25,26} Sin embargo, la contribución de estos glicanos para el funcionamiento normal de la epidermis como barrera, así como en el desarrollo de algunas lesiones cutáneas, ha recibido muy poca atención. A este respecto, alteraciones durante la diferenciación terminal de los queratinocitos en la hiperplasia observada en psoriasis y CBC han sido asociadas a cambios en la distribución de los glicanos presentes en su superficie.³⁷⁻⁴⁰ De igual manera, alteraciones en la expresión de residuos de glicanos presentes en la superficie de los queratinocitos han sido demostradas durante la morfogénesis epidérmica previa a la queratinización.³⁹

En este estudio reportamos que Gal-3 también estaba presente en las capas superiores de la epidermis normal, particularmente delineando los márgenes y puentes entre queratinocitos adyacentes. En contraste, en epidermis hiperplásicas Gal-3 se encontraba muy reducida o ausente.

Notablemente, la colocalización entre Dsg1 y Gal-3 en la epidermis normal ha sido asociada con la diferenciación y maduración de los queratinocitos.³³ En este contexto, estudios realizados en células epiteliales de intestino demostraron una asociación de Gal-3 con los N-glicanos de la Dsg2, la cual contribuye a su estabilidad en la superficie celular protegiéndola de la degradación proteosómica y sugiriendo un papel importante para Gal-3 y Dsg2 en la adhesión célula-célula e integridad de la barrera epitelial.⁴¹ En relación a la presencia o ausencia de Gal-3 en las epidermis engrosadas, algunos estudios han demostrado una marcada reducción en la expresión de Gal-3 en psoriasis⁴⁰ y en carcinomas de piel no melanoma, tales como CBC y CEC, sugiriendo que esta reducción podría estar relacionada con una alteración en la diferenciación terminal de los queratinocitos.^{33,42}

También de interés son los estudios que destacan que Gal-3 no sólo se enlaza a algunas cadenas laterales de glicanos que contienen residuos de β -galactosa y GlcNAc sino que ella también puede formar pentámeros que le permiten entrecruzarse con varias glicoproteínas localizadas en la superficie celular a través de los glicanos, generando redes moleculares (red gal-glicano) a las cuales se les atribuye la capacidad de regular procesos celulares que incluyen la adhesión célula-célula, proliferación y diferenciación.²⁹⁻³² Por lo tanto, consideramos razonable sugerir que en los desmosomas que se localizan en las capas superiores de la epidermis normal, Dsg1, CD44, sindecan-1, y Gal-3 podrían coexistir en forma de red molecular, la cual juega un papel crucial en el mantenimiento de la barrera epidérmica, regulando la adhesión, estratificación y diferenciación terminal de los queratinocitos y que la alteración de esta red podría resultar en una hiperplasia epidérmica, la cual estaría asociada con un crecimiento expansivo producto de una proliferación anormal (*Figura 2*), diferenciación y supervivencia de los queratinocitos.

En este estudio también detectamos que la forma activada o fosforilada del EGFR, un receptor tirosina quinasa que posee al menos ocho N-glicanos,^{14,16} estaba presente en las células de las capas superiores de la epidermis normal, mientras que en las epidermis engrosadas estaba localizado en el núcleo de muchas células basales y suprabasales. Esta localización en la epidermis normal, aunada a la de Dsg1, CD44 y Gal-3, sugiere que EGFR podría estar asociado a Dsg1 y a CD44 a través de sus N-glicanos y que esta asociación podría estar facilitada por Gal-3, tomando en cuenta que Dsg1 físicamente puede formar complejos con EGFR estabilizándolo en la superficie celular, permitiendo no sólo la integridad de las uniones célula-célula y la

señalización dependiente de EGFR en las capas superiores de la epidermis, sino también la diferenciación normal de los queratinocitos.^{1,2,8,9} También CD44 puede interactuar con EGFR funcionando como un coreceptor capaz de regular algunos eventos celulares que incluyen la adhesión célula-célula, proliferación y diferenciación.^{12,13} Más aún, considerando que la interacción entre los glicanos del EGFR y Gal-3 disminuye la activación, endocitosis, y translocación al núcleo del EGFR.³⁴ En tal sentido, creemos que los cambios observados en la distribución de EGFR en las epidermis hiperplásicas podrían estar asociados a una alteración de la red gal-glicano que podría afectar la activación y translocación del EGFR y, en consecuencia, la proliferación y diferenciación de los queratinocitos.

Por lo tanto, es posible hipotetizar que Dsg1, CD44, Sind-1 y EGFR, a través de sus cadenas laterales de N- y O-glicanos, podrían establecer asociaciones facilitadas por Gal-3, dando lugar a una red molecular en la superficie de los queratinocitos que contribuiría al ensamblaje y estabilidad de los desmosomas en las capas superiores de la epidermis y por ende a la integridad de la barrera epidérmica (*Figura 7*), y que la perturbación de esta red podría afectar el crecimiento, proliferación, estratificación y diferenciación terminal de los queratinocitos dando lugar a una hiperplasia epidérmica.

CONCLUSIONES

Nuestras observaciones sugieren que desmogleína1, CD44, sindecan-1 y EGFR, a través de sus cadenas laterales de N- y O-glicanos, podrían establecer asociaciones facilitadas por galectina-3, dando lugar a una red molecular que contribuiría al ensamblaje y estabilidad de los desmosomas en las capas superiores de la epidermis y que la perturbación de esta red podría dar lugar a una hiperplasia epidérmica.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Arq. Rachel Arciniegas por la realización del esquema.

Correspondencia:

Enrique Arciniegas Cotadira

Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina,
Universidad Central de Venezuela.
Distrito Capital, Caracas Núm. 1010
Fax: 58-212-862-6807
E-mail: earciniegasbeta@yahoo.com

BIBLIOGRAFÍA

- Green KJ, Getsios S, Troyanovsky S, Godsel LM. Intercellular junction assembly, dynamics and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2: a000125.
- Simpson CL, Patel DM, Green KJ. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12: 565-580.
- Koria P, Andreadis ST. Epidermal morphogenesis: the transcriptional program of human keratinocytes during stratification. *J Invest Dermatol.* 2006; 126: 1834-1841.
- Thomason HA, Scotthern A, McHarg, Garrod DR. Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. *Biochem J.* 2010; 429: 419-433.
- Wolf R, Orion E, Ruocco E, Ruocco V. Abnormal epidermal barrier in the pathogenesis of psoriasis. *Clin Dermatol.* 2012; 30: 323-328.
- Proksch E, Feingold KR, Man MQ, Elias PM. Barrier function regulates epidermal DNA synthesis. *J Clin Invest.* 1991; 87: 1668-1673.
- Ye L, Lv Ch, Man G, Song Sh, Elias PM, Man MQ. Abnormal epidermal barrier recovery in uninvolved skin supports the notion of an epidermal pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2014; 134: 2843-2846.
- Brooke MA, Nitou D, Kelsell DP. Cell-cell connectivity: desmosomes and disease. *J Pathol.* 2012; 226: 158-171.
- Getsios S, Simpson CL, Kojima SI, Harmon R, Sheu LJ, Dusek RL et al. Desmoglein1 dependent suppression on EGFR signaling promotes epidermal differentiation and morphogenesis. *J Cell Biol.* 2009; 185: 1243-1258.
- Hammers CM, Stanley JR. Desmoglein-1 differentiation and disease. *J Clin Invest.* 2013; 123: 1419-1422.
- Ortiz-Urda S, Elbe-Bürger A, Smolle J, Marquart Y, Chudnovsky Y, Ridky TW et al. The plant lectin wheat germ agglutinin inhibits the binding of pemphigus foliaceus autoantibodies to desmoglein 1 in a majority of patients and prevents pathomechanisms of pemphigus foliaceus *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol.* 2003; 171: 6244-6250.
- Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4: 33-45.
- Orian-Rousseau V, Sleeman J. CD44 is a multidomain signaling platform that integrates extracellular matrix cues with growth factor and cytokine signals. *Adv Cancer Res.* 2014; 123: 231-254.
- Handa K, Hakomori SI. Carbohydrate to carbohydrate interaction in development process and cancer progression. *Glycoconj J.* 2012; 29: 627-637.
- Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology.* 2017; 27: 3-49.
- Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer.* 2015; 15: 540-555.
- Hudson DL, Sleeman J, Watt FM. CD44 is the major peanut lectin-binding glycoprotein of human epidermal keratinocytes and plays a role in intercellular adhesion. *J Cell Sci.* 1995; 1959-1970.
- Tuhkanen AL, Agren U, Tammi M, Tammi R. CD44 expression marks the onset of keratinocytes stratification and maturation into fibrous dermis in fetal human skin. *J Histochem Cytochem.* 1999; 47:1617-1624.
- Bourguignon L, Ramez M, Gilad E, Singleton P, Man MQ, Crumrine D, Elias P et al. Hyaluronan- CD44 interaction stimulates keratinocyte, differentiation, lamellar body formation/ secretion, and permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol.* 2006; 126: 1356-1365.
- Man M, Elias P, Man W, Bourguignon L, Feingold K, Man MQ. The role of CD44 in cutaneous inflammation. *Exp Dermatol.* 2009; 18: 962-968.
- De la Torre A, Carrillo LM, Rojas H, Ramírez R, Reyes O, Arciniegas E. La hiperplasia epidérmica observada en carcinoma basocelular podría involucrar la migración e invasión colectiva de los queratinocitos: posible papel de CD44 y c-Src en su forma activada. *Dermatol Venezolana.* 2012; 50: 19-29.
- Bourguignon LY, Bikle D. Selective hyaluronan-CD44 signaling promotes miRNA-21 expression and interacts with vitamin D function during cutaneous squamous cell carcinomas progression following UV irradiation. *Front Immunol.* 2015; 6: 224.
- Manon-Jensen T, Itoh Y, Couchman JR. Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J.* 2010; 277: 3876-3889.
- Stepp MA, Pal-Ghosh S, Tadvalkar G, Pajooohesh-Ganji A. Syndecan-1 and its expanding list of contacts. *Adv Wound Care.* 2015; 4: 235-249.
- Sanderson RD, Hinkes MT, Bernfield M. Syndecan-1, a cell surface proteoglycan, changes in size and abundance when keratinocytes stratify. *J Invest Dermatol.* 1992; 99: 390-396.
- Ojeh N, Hiilesvuo K, Warri A, Salmivirta M, Henttilä T, Maatta A. Ectopic expression of syndecan-1 in basal epidermis affects keratinocyte proliferation and wound re-epithelialization. *J Invest Dermatol.* 2008; 128: 26-34.
- Tomas D, Vučić M, Situd M, Kruslin B. The expression of syndecan-1 in psoriatic epidermis. *Arch Dermatol Res.* 2008; 300: 393-395.
- Stepp MA, Pal-Ghosh S, Tadvalkar G, Rajjoub L, Jurus RA, Gerdes M et al. Loss of syndecan-1 is associated with malignant conversion in skin carcinogenesis. *Mol Carcinogen.* 2010; 49: 363-373.
- Partridge EA, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Pawling J, Cheung P, Granovsky M et al. Regulation of cytokine receptors by golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science.* 2004; 306: 120-124.
- Fortuna-Costa A, Gomes AM, Kozlowski E, Stelling MP, Pavao MS. Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis. *Front Oncol.* 2014; 4: 1-9.
- Nabi IR, Shankar J, Dennis JW. The galectin lattice at a glance. *J Cell Sci.* 2015; 128: 2213-2219.
- Elola MT, Blidner AG, Ferragut F, Bracalente C, Rabinovich GA. Assembly, organization and regulation of cell-surface receptors by lectin-glycan complexes. *Biochem J.* 2015; 469: 1-16.
- Larsen L, Chen H-Y, Saegusa J, Liu FT. Galectin-3 and the skin. *J Dermatol Sci.* 2011; 64: 85-91.
- Liu W, Hsu DK, Chen HY, Yang RY, Carraway KL, Isseroff RR, Liu FT. Galectin-3 regulates intracellular trafficking of epidermal growth factor receptor through Alix and promotes keratinocyte migration. *J Invest Dermatol.* 2012; 132: 2828-2837.
- Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell.* 2011; 147: 992-1009.

36. Walsh A, Chapman SJ. Sugars protect desmosome and corneosome glycoproteins from proteolysis. *Dermatol Res*. 1991; 283: 174-179.
37. Bell CM, Skerrow CJ. Lectin binding to psoriatic epidermis. *Br J Dermatol*. 1985; 113: 205-212.
38. Watt FM, Jones PH. Changes in cell-surface carbohydrate during terminal differentiation on human epidermal keratinocytes. *Biochem Soc Trans*. 1992; 20: 285-288.
39. Pasmatzi E, Badavanis G, Monastirli A, Georgiou S, Sagriotis A, Sakkis T et al. Qualitative and quantitative alterations of cell surface carbohydrate residues during epidermal morphogenesis. *Anat Embryol*. 2005; 209: 207-215.
40. Lacina L, Plzáková Z, Smetana Jr K, Stork J, Kaltner H, André S. Glycophenotype of psoriatic skin. *Folia Biol (Praha)*. 2006; 52: 10-15.
41. Jiang K, Rankin CR, Nava P, Sumagin R, Kamekura R, Stowell SR et al. Galectin-3 regulates desmoglein-2 and intestinal epithelial intercellular adhesion. *J Biol Chem*. 2014; 289: 10510-10517.
42. Kapucuoglu N, Basak PY, Bircan S, Sert S, Akkaya VB. Immunohistochemical galectin-3 expression in non-melanoma skin cancers. *Pathol Res Pract*. 2009; 205: 97-103.