



Inmunolocalización de β -catenina/PCNA en biopsias de úlceras crónicas de pacientes con DM2

Enoc Mariano Cortés-Malagón,* Vicente Torres-Lozada,* Onésimo Zaldívar-Reyna,* Genaro Rodríguez-Uribe,** Nicolás A. Serafín-Higuera,** Eduardo S. García-López,* Rubén G. Contreras,** Jaime Escobar-Herrera,** Octavio Daniel Reyes-Hernández,* Mónica Sierra-Martínez,* Patricio Gariglio,** Carmen Villatoro,* José Bonilla-Delgado*

RESUMEN

Introducción. Las heridas crónicas se caracterizan por su incapacidad de sanar por sí mismas. **Material y métodos.** En el presente trabajo se caracterizó la localización de β -catenina y PCNA en biopsias plantares provenientes de la zona de epitelización de pacientes con DM2 y PD (grado 1/escala Wagner) mediante inmunohistoquímica. **Resultados.** Nuestros resultados sugieren que β -catenina no tiene una localización citoplasmática o nuclear en la epidermis de biopsias plantares de pacientes con DM2; sin embargo, β -catenina presenta una localización en estratos basales y suprabasales; adicionalmente, los estratos suprabasales son positivos a la tinción para la proteína PCNA. **Conclusión.** Los resultados de este estudio apoyan la noción de que los patrones de diferenciación y proliferación celular están afectados en la piel plantar de los pacientes con DM2.

Palabras clave: β -catenina, PCNA, diabetes, úlcera.

ABSTRACT

Introduction. Chronic wounds are characterized by its lack of self-repairing. **Material and methods.** In the present work, we immuno-detected the location of β -catenin and PCNA proteins in plantar biopsies derived from the epithelization zone of DM2 patients (Wagner scale/grade 1) by immunohistochemistry. **Results.** Our results suggest, that β -catenin its not located in the cytoplasm or nucleus of epidermal cells from DM2 patients; however, β -catenin is located in the basal and suprabasal stratum; additionally, the suprabasal stratum contains PCNA-positive cells. **Conclusion.** This report supports the notion that the proliferation/differentiation patterns are dysregulated in the plantar skin of DM2 patients.

Key words: β -catenin, PCNA, diabetes, ulcer.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad crónica, multifactorial y de prevalencia creciente. Su prevalencia mundial en el año de 1996 fue de 120 millones de personas, y se estima que para el año 2030 esta cifra se incrementa a 366 millones de personas como consecuencia del aumento en la expectativa de vida, la obesidad, el síndrome metabólico y una vida sedentaria.¹ El aumento en la población diabética se espera que sea de 40% en los países desarrollados, y de hasta 70% en los países en vías de desarrollo. Actualmente, México cuenta con 3.8 millo-

nes de diabéticos y se encuentra dentro de los diez países con mayor número de diabéticos en el mundo.²

Dentro del esquema de complicaciones más comunes en los diabéticos se encuentran las cardiopatías, neuropatías, retinopatías y las lesiones crónicas que componen el cuadro clínico del pie diabético (PD).³ El PD es un término que engloba alteraciones circulatorias, neuropatías diabéticas, retardamiento en el cierre de las heridas, infecciones, gangrena y la pérdida del miembro afectado. Las heridas crónicas del PD son un serio problema de salud, y se caracterizan por su incapacidad para sanar por sí mismas, haciéndolas de difícil manejo en la clínica. Generalmente, una lesión se considera crónica cuando no sana en un periodo igual o mayor a tres meses.⁴

Para prevenir la insuficiencia vascular en el PD, es necesario controlar los niveles de azúcar en la sangre; no obstante, una vez sufrida una lesión, el proceso de recupera-

* Hospital Juárez de México.

** Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

ción no mejora controlando los niveles de azúcar. Esto podría sugerir que existen complicaciones adicionales en la piel del paciente con DM2 para responder ante una lesión. De hecho, gran parte de las limitaciones terapéuticas para el manejo del PD se deben al desconocimiento de los mecanismos moleculares que conducen a la patogénesis del PD.⁵

A la fecha, existe un único artículo que vincula la acumulación citoplasmática y nuclear de β -catenina como un factor determinante para el desarrollo del PD. En dicho reporte, el grupo de la Dra. Olivera Stojadinovic del Instituto Ronald O. Perelman, USA, propone que la activación de β -catenina en la piel plantar conduce a la diferenciación excesiva de las células madre somáticas hacia células de amplificación transitoria, al diferenciarse las células madre se reducirá su número, y, por ende, la capacidad de la piel para responder ante una lesión.⁶

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la localización de β -catenina en biopsias plantares provenientes de la zona de epitelización de pacientes con DM2 y PD (grado 1/escala Wagner). Nuestros resultados demuestran, que β -catenina no tiene una localización citoplasmática o nuclear; sin embargo, β -catenina presenta una localización tanto en estratos basales como suprabasales; adicionalmente, los estratos suprabasales son positivos a la tinción para la proteína PCNA, sugiriendo que los patrones de diferenciación y proliferación celular están afectados en la piel plantar de los pacientes con DM2.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de biopsias

Se llevó a cabo un estudio prospectivo en el cual se obtuvieron biopsias plantares de 0.5 cm² de diámetro de la zona de epitelización en 20 pacientes con diagnóstico previo de DM2 para ambos sexos, el rango de edades de los pacientes fue de 35 a 71 años (media = 46.3 años). Las biopsias plantares fueron clasificadas como úlceras grado 1 de la escala Wagner. Todos los pacientes fueron informados de la intención del estudio y firmaron un consentimiento informado (Número de Protocolo: HJM1850/10.06.01). La caracterización histopatológica de las úlceras plantares fue evaluada en el Servicio de Patología del Hospital Juárez de México.

Técnica de Inmunohistoquímica

Se obtuvieron cortes histológicos de 5 μ m de espesor, los cuales fueron desparafinados, rehidratados y sometidos a una recuperación antigénica con Buffer de Citratos 20X

(BioSB, U.S.A) durante 12 min en olla de presión. Tras la recuperación antigénica, las muestras se lavaron en PBS 1X y se incubaron con anticuerpos específicos para ser detectados mediante un sistema de anticuerpos quiméricos (Sistema Mouse/Rabbit HRP/DAB Detection System, Bio SB, USA). Finalmente, las proteínas se detectaron por medio de una reacción colorimétrica con Di-amino-benzidina (DAB). Los anticuerpos utilizados durante el estudio fueron: anti-PCNA y anti- β -catenina (Todos ellos de la marca Santa Cruz Biotechnology, USA).

RESULTADOS

Para caracterizar la epidermis de las biopsias se realizó un análisis histopatológico, en el cual la mayoría de las biopsias analizadas (16/20) presentaron una epidermis engrosada (hiperplasia pseudoepiteliomatosa) y paraqueratosis, con la presencia de núcleos en el estrato córneo (ver flechas en Figura 1); lo cual sugiere que la diferenciación de los queratinocitos es deficiente en este tipo de pacientes.

Con el fin de determinar si la hiperplasia observada en el estudio histopatológico se debe a una actividad hiperproliferativa de los queratinocitos, se realizó una inmunohistoquímica para detectar el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Nuestros resultados demuestran que las células proliferativas no sólo se limitan a la capa basal, sino que esta señal se extiende hacia los estratos espinoso y córneo (Figura 2), lo que sugiere que probablemente algunas vías de señalización implicadas en proliferación celular (como la vía Wnt/ β -catenina) están activas.

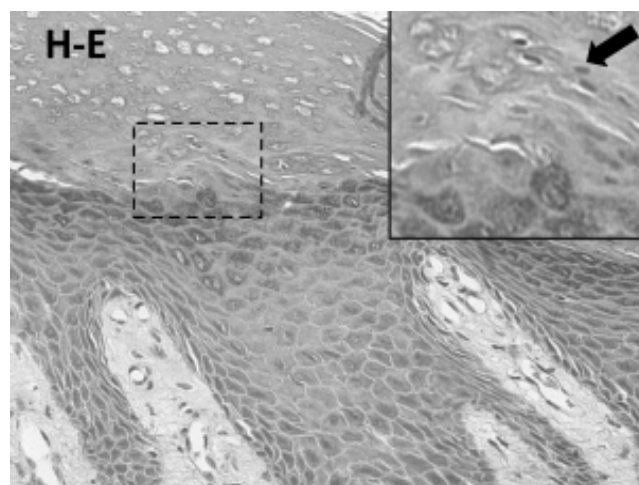


Figura 1. Tinción de hematoxilina-eosina de una biopsia plantar de un paciente con DM2 y úlcera grado 1 (escala Wagner). En el recuadro se aprecia la presencia de núcleos teñidos con hematoxilina (señalados con flecha) en el estrato córneo.

Para evaluar si la vía Wnt/ β -catenina sería la responsable de la proliferación celular detectada en las biopsias, evaluamos por inmunohistoquímica la localización de la proteína β -catenina (Figura 3); nuestros resultados muestran que β -catenina únicamente tiene una localización membranal (β -catenina estructural) y no así en citoplasma o núcleo, lo cual sugiere, que dicha vía podría no ser la

responsable de inducir la proliferación celular en la piel plantar de los pacientes con DM2; sin embargo, en una epidermis normal, β -catenina suele tener una localización únicamente basal, lo cual concuerda con la noción de que las células suprabasales de los pacientes con DM2 están en un estado indiferenciado.

DISCUSIÓN

La piel es la primera línea de defensa contra el medio ambiente, y de su integridad depende del adecuado anclaje de los queratinocitos entre éstos y la membrana basal.⁷ Las heridas generan la activación de los queratinocitos hacia un fenotipo pro-migratorio y proliferativo que, en paralelo con cambios en la adhesión celular, generan un "frente de epitelización" para la adecuada reparación de la zona afectada. Sin embargo, condiciones como la diabetes alteran el programa de epitelización, dando como resultado la formación de una úlcera crónica.⁸

La vía de Wnt/ β -catenina (inicialmente descrita en cáncer de colon) es una vía considerada oncogénica; sin embargo, esta vía es capaz de controlar procesos biológicos tales como: diferenciación, proliferación, migración, adhesión, polaridad celular, arquitectura tisular y organogénesis.⁹

Una de las razones por las cuales no encontramos una localización citoplasmática o nuclear de β -catenina podría deberse a que únicamente nos limitamos al uso de úlceras Wagner grado 1 y no de mayor grado; sin embargo, hay que recordar que la localización subcelular de β -catenina es sólo el paso último de la vía, y otras proteínas "ríen arriba" de la vía podrían resultar buenos candidatos para conocer su estado en úlceras crónicas en un grado inicial de avance, lo cual permitirá en un futuro el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de úlceras crónicas en pacientes con DM2.

CONCLUSIONES

La inmunotinción de β -catenina y PCNA sugieren que la piel de los diabéticos presenta alteraciones en los patrones de diferenciación y proliferación celular.

REFERENCIAS

1. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; 21: 1414-8.
2. Vazquez RM, Romero RE, Escandon RC, Escobedo de la Peña J. The prevalence of non-insulin-dependent diabetes mellitus and the associated risk factors in a population of Mexico, D.F. *Gac Med Mex* 1993; 129: 191-9.

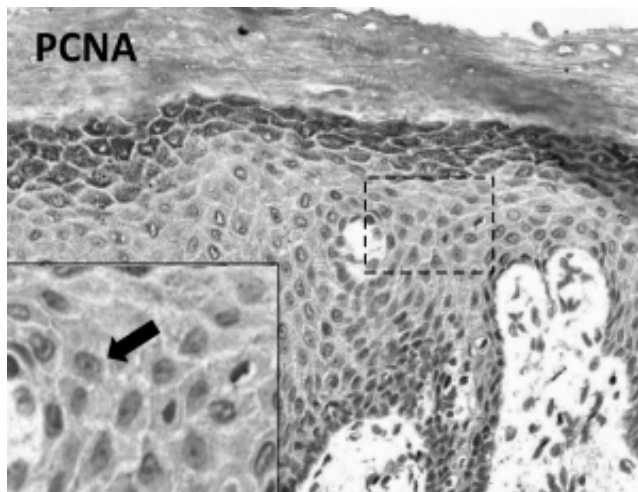


Figura 2. Tinción de PCNA de una biopsia plantar de un paciente con DM2 y úlcera grado 1 (escala Wagner). En el recuadro puede apreciarse la señal nuclear (señalada con flecha) positiva a PCNA en el estrato espinoso y granular.

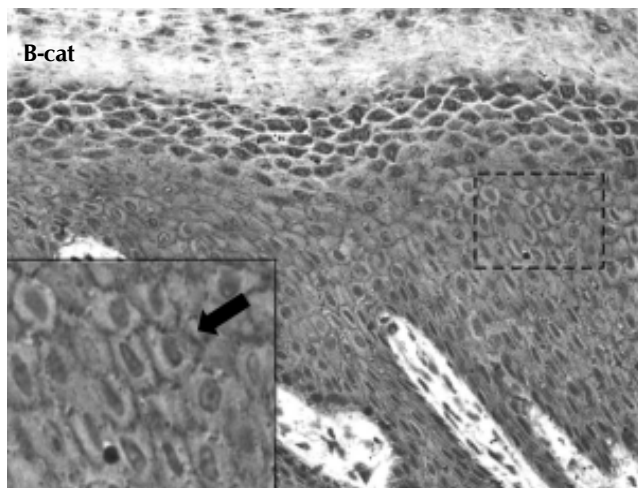


Figura 3. Tinción de β -catenina de una biopsia plantar de un paciente con DM2 y úlcera grado 1 (escala Wagner). En el recuadro puede apreciarse la señal positiva en membrana (señalada con flecha), la señal se extiende al estrato espinoso y granular; no obstante, la señal de β -catenina es ausente para el citoplasma y núcleo de los queratinocitos

3. Harding KG, Morris HL, Patel GK. Science, medicine and the future: healing chronic wounds. *BMJ* 2002; 324: 160-5.
4. Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, Apelqvist J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet* 2005; 366: 1719-23.
5. Jeffcoate WJ, Harding KG. Diabetic foot ulcers. *Lancet* 2003; 361: 1545-52.
6. Stojadinovic O, et al. Molecular pathogenesis of chronic wounds: the role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing. *Am J Pathol* 2005; 167: 59-63.
7. Morasso MI, Tomic-Canic M. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. *Biol Cell* 2005; 97: 173-84.
8. Brem H, et al. Healing of elderly patients with diabetic foot ulcers, venous stasis ulcers, and pressure ulcers. *Surg Technol Int* 2003; 11:161-70.
9. Millar SE. WNTs: multiple genes, multiple functions. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 7-15.

Solitud de sobretiros:

Dr. en C. José Bonilla-Delgado.
Laboratorio de Genética y Diagnóstico
Molecular, División de Investigación, Hospital
Juárez de México. Av. Instituto Politécnico Na-
cional No. 5160, Col. Magdalena de las Salinas,
Deleg. Gustavo A. Madero, México, D.F. C.P.
07760 Tel.: +52-(55)-5747-7560, Ext.: 7330.
Correo electrónico: jose.bonilla@salud.gob.mx