

336427



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO
CAMPUS CHAPULTEPEC

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
INCORPORADA A LA U. N. A. M

DETECCIÓN DE APOPTOSIS EN VASOS SANGUÍNEOS
DE PACIENTES CON PIE DIABÉTICO CON LA
TÉCNICA DE TUNEL.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

LILIA FLORES GONZÁLEZ

DIR. DE TESIS:

Q.F.B. JAVIER ARAIZA SANTIBAÑEZ
DRA. VILMA CAROLINA BEKKER MÉNDEZ

MÉXICO, D. F

2006

M. 708723



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

PRESIDENTE: M. Guillermo del Rey Pineda
VOCAL: Q. F. B. Javier Araiza Santibañez
SECRETARIO: Q. F. B. Gerardo García Camacho
1er SUPLENTE: M. Eduardo del Rey Pineda
2do SUPLENTE: M. Víctor Manuel Sánchez Hidalgo

DIRECTOR DE TESIS: Q. F. B. JAVIER ARAIZA SANTIBAÑEZ
ASESOR EXTERNO: Dra. VILMA CAROLINA BEKKER MÉNDEZ
SUSTENTANTE: LILIA FLORES GONZÁLEZ

MÉXICO, D. F

2006

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología "Dr. Daniel Méndez Hernández", Centro Médico Nacional "La Raza" y en el Departamento de Patología Experimental del Hospital de Especialidades "Dr. Antonio Fraga Mouret" del Instituto Mexicano del Seguro Social.

*A DIOS
A mis padres
Y
Hermanos*

Reconocimientos

Con una gran deuda de gratitud a quienes colaboraron en la realización de mi más crecido anhelo.

Dr. César González Bonilla y Dra. Vilma Carolina Bekker Méndez adscritos a la Unidad de Investigación del Hospital de Infectología "Dr. Daniel Méndez Hernández" Centro Médico Nacional "La Raza" IMSS por el apoyo proporcionado durante mi estancia y elaboración de mi tesis.

En especial al Q.F.B. Eduardo Jesús Garro Martínez. "Centro Médico Nacional Siglo XXI " por agregar pericias maravillosas a una nueva etapa de mi vida y quien ayudo a mantener mi sentido de realidad durante este proceso, a la Medico anatomo-patólogo Maria del Rosario Mora Campos y al Histotécnico Jaime Moreno Ortiz adscritos al Servicio de Patología del Hospital de Especialidades de La Raza "Dr Antonio Fraga Mouret" por su gran ética profesional en la realización e interpretación de este estudio y a la Otorrinolaringóloga Bertha Beatriz Montañó Velázquez quien con su gran sensibilidad y profesionalismo me impulsó a la culminación de una de mis más grandes aspiraciones.

A familiares, amigos y a mis hermanos: Elizabeth, Miguel Angel, Cira y Maricela quienes me brindaron apoyo, afecto y comprensión cada instante y principalmente **a mis padres** que con su ardua tenacidad y sacrificio me abrieron las puertas para volar hacia nuevos horizontes y disfrutar de la vida.

INDICE

Resumen	8
Antecedentes	10
Justificación	17
Pregunta de investigación	18
Objetivo	19
Material y métodos	20
Anexo I	31

Congresos donde se ha presentado la tesis

El Daño Tisular del Pie Diabético Infectado. Rosa Ma. Guzmán Aguilar¹, Lilia Flores González², Rosario Mora Campos³, César González Bonilla², Carolina Bekker Méndez². Unidad de Investigación Médica en Infectología e Inmunología del Hospital de Infectología "Daniel Méndez Hernández" CMR XVI Congreso Nacional de Inmunología. 7 al 11 de Marzo Oaxaca, Oaxaca 2004.

El Daño Tisular del Pie Diabético Infectado. Rosa Ma. Guzmán Aguilar¹, Lilia Flores González², Rosario Mora Campos³, Emma González Veirand⁴, César González Bonilla², Carolina Bekker Méndez². Unidad de Investigación Médica en Infectología e Inmunología del Hospital de Infectología "Daniel Méndez Hernández" CMR X Foro Regional de Investigación en Salud. Instituto Mexicano del Seguro Social Dirección de Prestaciones Médicas. Dirección Regional Centro 3 al 4 de Junio 2004 Tequesquitengo Morelos.

Papel De La Apoptosis En El Daño Tisular Del Pie Diabético Infectado. Rosa Ma. Guzmán Aguilar¹, Lilia Flores González², Rosario Mora Campos³, Emma González Veirand⁴, César González Bonilla², Carolina Bekker Méndez². Unidad de Investigación Médica en Infectología e Inmunología del Hospital de Infectología "Daniel Méndez Hernández" CMR XIII Foro Nacional de Investigación en Salud. Instituto Mexicano del Seguro Social Dirección de Prestaciones Médicas. 21-24 de septiembre, Morelia, Michoacán 2004.

Resumen

La diabetes mellitas (DM) es una enfermedad crónica caracterizada por una deficiencia en la producción de insulina de las células β del páncreas, ya sea de forma hereditaria y/o adquirida. Tal deficiencia resulta en el incremento de las concentraciones de glucosa en la sangre, la cual daña algunos de los sistemas del cuerpo en particular los vasos sanguíneos y nervios. Para evaluar el papel de la apoptosis en el pie diabético se utilizó la Técnica de TUNEL en la cual el marcaje de los extremos 3'OH del ADN con nucleótidos biotilados, a través de una reacción enzimática, expresa la fragmentación del DNA. Hasta la fecha sólo se ha reportado un estudio para detectar apoptosis en úlcera de pie diabético (Galkowska 2003).

Material y métodos

El estudio comprendió cortes histológicos (piel y paquete neurovascular) obtenidos del límite quirúrgico de la región supracondílea y falanges del miembro pélvico amputado de 10 pacientes con diabetes mellitus tipo 2, de los que 6 correspondieron al sexo masculino y 4 al sexo femenino. La edad promedio de los sujetos fue de 56 años, ± 15 años con un promedio de evolución de la diabetes mellitus de 11 años ± 9.4 años con diagnóstico de ingreso de fascitis necrosante de miembro pélvico y/o necrobiosis diabética. Como controles se incluyeron 2 pacientes con diagnóstico histopatológico de carcinoma de colon. La detección de células en apoptosis se realizó mediante el Kit de TUNEL "In Situ Cell death detection kit, POD" (Cat No. 1 684 817 Roche Applied Science Mannheim, Germany) y sustrato DAB de acuerdo a la técnica descrita por Negoescu, 1998.

Resultados

Los resultados fueron expresados en términos de intensidad de marcaje y supervisados por un patólogo y mediante microscopía óptica. Se observó una tinción color marrón en aquellas células que se encontraron en apoptosis.

Se observaron vasos de pequeño y mediano calibre, presencia de células endoteliales y células musculares en apoptosis, hipertrofia muscular, formación de trombo y como consecuencia disminución de la luz en un 70%- 95%. Además de observar la presencia de apoptosis en epidermis y en células inflamatorias de la dermis papilar, y en las células de Shwann del nervio periférico.

Conclusiones

La Técnica de TUNEL aplicada a tejidos embebidos en parafina, (vasos sanguíneos) de pacientes con pie diabético fue eficaz y/o apropiada ya que detectó apoptosis en células del endotelio vascular y de la capa muscular.

Galkowska H, y et al. Expresión of apoptosis-and cell cycle-related proteins in epidermis of venous leg and diabetic foot ulcers. *Surgery* 2003;213-20.

Negoescu A, y et al. Tunel apoptotic cell detection in archived paraffin-embedded tissues. *Roche molecular biochemicals* 1998; 3:36-42.

ANTECEDENTES

Diabetes mellitus

La diabetes *mellitus* (DM) es una enfermedad crónica caracterizada por la deficiencia en la producción de insulina de las células β del páncreas, ya sea de forma hereditaria y/o adquirida. Tal deficiencia resulta en el aumento en la concentración de glucosa en la sangre, la cual daña algunos de los sistemas del cuerpo en particular vasos sanguíneos y nervios (1,2).

En el año 2000, la Organización Mundial de la Salud estimó que la DM afecta a nivel mundial a 171 millones de personas y en México a 2 millones. Una de cada 20 muertes se atribuye a esta enfermedad (1,2).

La DM se clasifica en dos tipos principales: Tipo 1 (insulino dependiente) se caracteriza por la falta en la producción de insulina de las células β del páncreas. Este padecimiento se presenta con mayor frecuencia en niños y adolescentes. La tipo 2 (no insulino dependiente), se debe a la resistencia de la acción de la insulina. Es la más común, constituye el 90% de los casos en el mundo y afecta principalmente a los adultos. Un tercer tipo es la diabetes gestacional que únicamente se desarrolla durante el embarazo en la que existe una hiperglucemia sérica y al término de la gestación desaparece (1,2).

La etiología de esta enfermedad es multifactorial, en la tipo 1 los factores son genéticos, ambientales e inmunológicos que finalmente llevan a la destrucción de las células beta del páncreas, en la tipo 2 la etiología es influenciada por factores genéticos y ambientales que condiciona resistencia a la insulina y/o a una secreción disminuida de insulina (1,2).

La diabetes tipo 1 se caracteriza por la presencia de poliuria, polidipsia, pérdida de peso y fatiga. La diabetes tipo 2 presenta síntomas menos evidentes y ocurren de forma tardía cuando las complicaciones ya se han presentado.

El diagnóstico se realiza de acuerdo a uno de tres criterios, de acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y la Organización Mundial de la Salud:

1. La presencia de síntomas clásicos (polidipsia, polifagia, poliuria y pérdida de peso), con el hallazgo casual, sin considerar el tiempo pasado desde la última comida, de un nivel de glucosa en sangre (glucemia) por encima de 200 mg/dL (11.1 mmol/L); 2. Una glucosa en ayunas superior a 126 mg/dL (7 mmol/L); 3. La presencia de unos niveles de glucosa por encima de 200 mg/dL (11.1 mmol/L) en un análisis de dos horas posterior a una sobrecarga oral de glucosa de 75 gramos (prueba realizada según los criterios de la OMS). El hallazgo aislado de cualquiera de estos criterios no es suficiente para establecer el diagnóstico. Debe confirmarse en días posteriores con el mismo, o, con alguno de los dos restantes (1,2).

Las complicaciones de la diabetes mellitus se clasifican como agudas y crónicas. Dentro las agudas se encuentran la cetoacidosis diabética, que se presenta en la tipo 1 y el estado hiperosmolar no cetogénico (tipo 2). Las complicaciones crónicas se dividen en vasculares y no vasculares. Las vasculares se subdividen en microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía) y las macrovasculares (enfermedad coronaria, vascular periférica y cerebrovascular) (3).

Las complicaciones microvasculares de la DM tipo 1 y 2, se deben a la presencia de hiperglucemia crónica y en las complicaciones macrovasculares este factor aún no es concluyente. Se han propuesto tres teorías acerca del efecto de la hiperglucemia en las complicaciones crónicas de la diabetes. Una, es el incremento en la glucosa intracelular que lleva a la formación avanzada de los productos finales de la glucosilación (AGEs) de la vía no enzimática de la glucosilación celular proteica. La glicosilación no enzimática resulta de la interacción de glucosa con grupos amino de proteínas. Los AGEs se unen a

proteínas (como la colágena, proteínas de la matriz extracelular), acelera la aterosclerosis, promueve la disfunción glomerular, reduce la síntesis de óxido nítrico, induce disfunción endotelial, altera la composición de la matriz extracelular y su estructura. La segunda, propone explicar que el incremento del metabolismo de la glucosa vía sorbitol. La glucosa intracelular es predominantemente metabolizada por fosforilación y glicólisis subsecuente, pero cuando la glucosa intracelular incrementa, parte de la glucosa se convierte a sorbitol por la vía de los polioles a través de la enzima aldosa reductasa. El incremento de las concentraciones de sorbitol afecta severamente aspectos de la fisiología celular, disminución de mioinositol y alteración del potencial redox. La tercera, propone que la hiperglucemia aumenta la formación de diacilglicerol (DAG) que conduce a la activación de algunas isoformas de la proteína cinasa C que afecta las funciones celulares, por ejemplo, la proteína cinasa C activada por glucosa altera la transcripción de genes de fibronectina, colágena tipo IV, proteínas contráctiles y otras. Finalmente, el estrés oxidativo y la generación de radicales libres, provocado por la hiperglucemia podría promover el desarrollo de las complicaciones de esta enfermedad (3-10).

Pie diabético

Se denomina pie diabético al proceso infeccioso, isquémico o ambos, de los tejidos del pie que abarcan desde una lesión cutánea hasta gangrena con osteomielitis. La presencia del pie diabético se debe a cambios en los vasos sanguíneos y nervios, que llevan a ulceración y amputación del miembro. Resulta de la enfermedad vascular y neurológica. Es la causa más común de una amputación de origen no traumática de la extremidad inferior (11) como se muestra en la figura 1. La presencia de neuropatía periférica provoca que el pie presente daño por traumatismo y debido a lesiones de las fibras mielinizadas sensoriales, grandes y pequeñas, con reducción de la percepción de las sensaciones propioceptivas: vibración, tacto, temperatura y dolor. Las fibras motoras también se encuentran afectadas, éstas sufren la disminución de la

velocidad de conducción motora y presentan una reducción o ausencia de los potenciales de acción de los músculos intrínsecos del pie. Lo anterior propicia una anormal distribución de los puntos de presión y del peso corporal con la aparición de ulceraciones. La úlcera sirve de puerta de entrada a las bacterias y provoca sepsis. También oblitera las arterias digitales con la disminución de la perfusión tisular y difusión del proceso infeccioso hacia el interior (12).

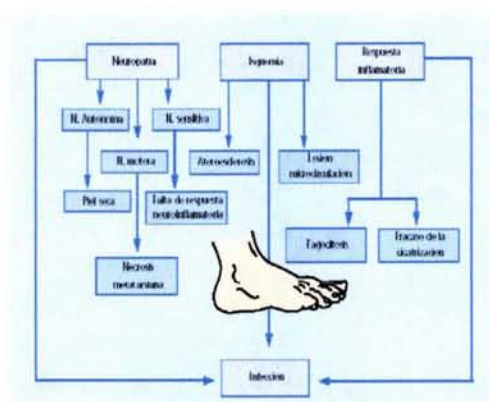


Figura 1. Fisiopatología del proceso infeccioso en el pie diabético. Tratado de Pie Diabético. Fisiología Cap. II. Blanes, JII et al 1996.

Apoptosis

La apoptosis es un proceso natural que mantiene la homeostasis durante el desarrollo embrionario y el desarrollo de los tejidos durante el crecimiento del organismo. Este proceso es fundamental para mantener el sistema inmune viable y su inhibición puede contribuir a la enfermedad inmune (13-15).

Se identifican dos vías por las cuales se activa este proceso, la vía extrínseca y la vía intrínseca. En la vía extrínseca, tipo I o ligando de muerte, intervienen receptores celulares de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral, TNFR (TNFR1, DR5/DR4 y Fas CD95/APO-1) que desencadenan la activación de caspasas. Las caspasas son una familia de cisteína proteasas que actúan como reguladoras centrales de la apoptosis.

Las caspasas iniciadoras 8, 9, 10 y 12 responden a señales proapoptóticas y a su vez activan a caspasas efectoras 3, 6 y 7. Estas últimas actúan a nivel del citoesqueleto y las proteínas nucleares para inducir apoptosis.

Mientras que la vía intrínseca, tipo II o mitocondrial, comienza por la permeabilización de la membrana mitocondrial, que producen la luz ultravioleta, hipoxia, drogas y alteraciones en el transporte de la glucosa. El citocromo c liberado por la mitocondria activa a la pro-caspasa-9 con un complejo de proteínas para formar el apoptosoma en el citosol, así se forma la caspasa 9, que a su vez activa la cascada de caspasas. El proceso de permeabilización de la membrana mitocondrial (MOMP) se encuentra regulado por proteínas de la familia Bcl-2, que se dividen en dos tipos: antiapoptóticas y proapoptóticas. Las proteínas antiapoptóticas incluyen Bcl-2 que impiden la liberación del citocromo c y la permeabilización de la membrana mitocondrial. Las proteínas proapoptóticas son del tipo BH y las BH3 como se muestra en la figura 2.

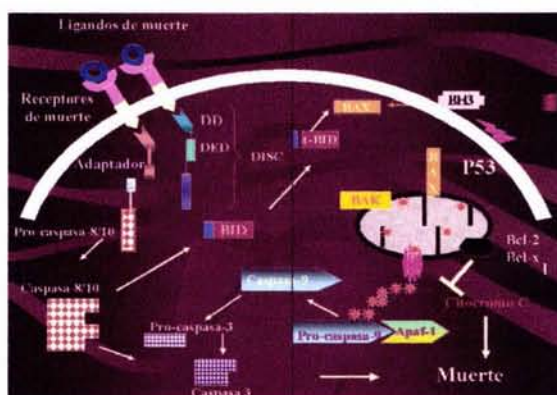


Figura 2. Vía extrínseca e intrínseca de la muerte celular programada. Guías prácticas para el laboratorio de inmunología. Actualidades diagnósticas de las enfermedades autoinmunes y reumatológicas 2005. Ma. L. Irigoyen Coria.V.C. Bekker Méndez Cáp. 2 Editorial MFM 2005.

Cuando una célula se encuentra en apoptosis, morfológicamente se observa condensación del núcleo y fragmentación, formación de cuerpos apoptóticos que luego son digeridos por macrófagos y previenen la liberación del contenido intracelular a los tejidos adyacentes. Existen diversas técnicas para identificar la presencia de apoptosis, como se muestra en el cuadro 1, como TUNEL (Terminal-deoxinucleotidyl-transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling) para detección tardía de apoptosis, ISEL (marcaje de los extremos in Situ) (16), la determinación de anexina V para detección temprana de apoptosis, y de proteínas de superficie como Fas receptor (CD95/APO-1) y la unión de su ligando Fas (FasL) representan la activación de la vía extrínseca de la apoptosis, las caspasas como la caspasa 3 representa la confluencia de la activación de las dos vías de la apoptosis y Bcl-2 que representa a la vía intrínseca que impide la liberación del citocromo c y a su vez inhibir la apoptosis (17-22).

Cuadro 1. Técnicas Usadas para la Detección de Células Apoptóticas en Tejidos*

<p><u>Morfología de Células Apoptóticas</u> Microscopia de luz Tinción nuclear: Hematoxilina-Eosina (H-E), verde de metilo, rojo nuclear etc. Microscopio de fluorescencia Tinción nuclear DAPI, Ioduro de propidio, Toto-3, etc. Microscopia electrónica</p> <p><u>Fragmentación de ADN</u> Terminal transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) In situ nick translation (ISNT) In situ hibridación de AND, ruptura: oligonucleotidos, poly (A), etc.</p> <p><u>Cambios de Membrana en Células Apoptóticas</u> Anexina V marcaje in vivo</p> <p><u>Inmunohistoquímica Apoptosis Asociado a Proteínas</u> Caspasa-3 activada Citoqueratina-18 Poly(ADP-ribosa) Transglutaminasa de tejidos.</p>

Stadelmann Ch, Lassmann H. Detections of apoptosis in tissue sections. Cell Tissue Res 2000; 301:19-31

Prueba de TUNEL

Las células apoptóticas pueden detectarse mediante inmunohistoquímica, TUNEL que se caracteriza por el marcaje de los extremos terminales del 3' OH (oxidrilo) del DNA fragmentado de doble cadena o una sola cadena de las células apoptóticas con la polimerasa Terminal Deoxinucleotidil Transferasa, este marcaje se realiza con nucleótidos biotilados (uridina acoplada a biotina) en la dirección 3' a 5'. La biotina se detecta con la unión de estreptavidina marcada con una enzima. Cuando el sustrato incoloro de la enzima se añade a la sección de tejido o al cultivo celular, reacciona para producir un precipitado coloreado sólo en las células que han sufrido apoptosis (23), como se muestra en la figura 3.

La prueba de TUNEL para la detección de células apoptóticas es confiable, sensible y específica acorde al tejido utilizado (24) además permite una mayor sensibilidad cuando existe un mayor grado de fragmentación del DNA. Sin embargo, el rango de sensibilidad depende del procesamiento del tejido por lo que en esta parte del procedimiento comúnmente se necesita realizar modificaciones. En la técnica de TUNEL se ha encontrado que la sensibilidad puede afectarse cuando se aplica a tejidos embebidos en parafina, y puede ocurrir por: Una incorrecta fijación del tejido (autólisis), por la obtención de un grosor inespecífico (corte) y el tipo de métodos de calentamiento (recuperación de antígeno) para la fragmentación de DNA. Cuando se combinan estos tres factores, esto puede contribuir a la presencia de un marcaje inespecífico o ausencia de marcaje (25).

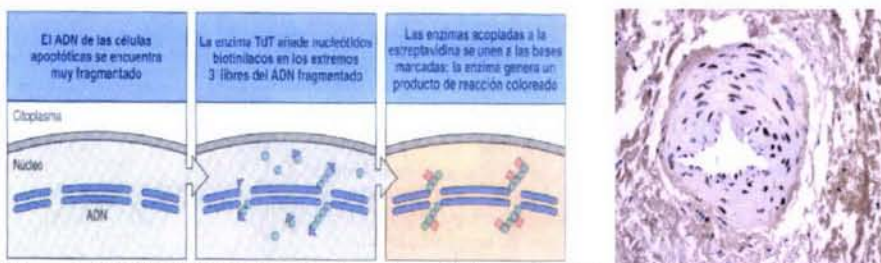


Figura 3. INMUNOBIOLOGÍA El Sistema Inmunitario en Condiciones de Salud y Enfermedad 2ª Edición página 648 Apéndice I Herramientas del inmunólogo Charles A. Janeway, jr 2004.

Justificación

La DM a nivel mundial y en nuestro país es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, así como de las complicaciones como el pie diabético. Para identificar la presencia de apoptosis en diversos tejidos, es necesario realizar la estandarización de las técnicas para su detección temprana y/o tardía (25). Únicamente se ha reportado un estudio realizado para detectar apoptosis en úlceras de pacientes con pie diabético el cual fue realizado con la técnica de TUNEL (26). Es importante estandarizar la Técnica de TUNEL en pacientes con pie diabético, y para que un futuro se determine la posible participación de la apoptosis en los mecanismos de ésta enfermedad. Por lo tanto en este estudio, se pretende detectar la presencia de apoptosis en los vasos sanguíneos de pacientes con pie diabético con la técnica de TUNEL.

Pregunta de investigación

¿Es posible detectar la apoptosis en vasos sanguíneos de pacientes con pie diabético con la técnica de TUNEL?

Objetivo

Detectar la presencia de apoptosis en vasos sanguíneos de pacientes con pie diabético con la técnica de TUNEL.

Material y métodos

El estudio comprendió cortes histológicos (piel y paquete neurovascular) obtenidos del límite quirúrgico de la región supracondílea y falanges del miembro pélvico amputado de 10 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 de los cuales 6 corresponden al sexo masculino y 4 al sexo femenino. El diagnóstico fue fascitis necrosante de miembro pélvico y/o necrobiosis diabética. La edad promedio de los sujetos fue de 56 años, ± 15 años con un promedio de evolución de la diabetes mellitus de 11 años ± 9.4 años y diagnóstico histopatológico (cuadro 2). No se incluyeron las muestras de pacientes con falla orgánica múltiple no reversible. Se utilizaron como controles positivos dos muestras de pacientes con carcinoma de colon.

Las muestras de los pacientes con fascitis necrosante y de cáncer de colon, habían sido procesadas con la técnica convencional para microscopía de luz, fueron fijadas en formaldehído amortiguado al 10% durante 24 horas e incluidas en parafina (27).

Todas las muestras se bloquearon con peróxido de hidrógeno en metanol al 0.3% solución salina de fosfatos PBS pH 7.4 durante 20 minutos y se lavaron 2 veces con (PBS) 2 veces durante 5 minutos.

Una prueba inicial se realizó para la recuperación del antígeno con dos pre-tratamientos en las muestras de arteria de pie diabético y carcinoma de colon; uno con una olla de presión a 121°C durante 30 minutos, aproximadamente a una presión de 15 PSI=103kPas y otro en un horno de microondas a 3 y 10 minutos a 600 W, los cuales mostraron diferencias en la preservación, morfología e intensidad de marcaje de las células, demostrando que el pre-tratamiento con la olla de presión fue mejor. Como parte del control metodológico de la técnica de inmunohistoquímica se corroboró que la intensidad del marcaje de las células de

los vasos sanguíneos de pie diabético con TUNEL fueran similares al control positivo, por lo tanto la técnica fue adecuada.

Para detectar apoptosis en células endoteliales de la pared vascular en pacientes con pie diabético, se utilizó el método convencional descrito por Negoescu A, et al., 1998 (28), con el kit de los reactivos de "In Situ Cell death detection kit, POD" (Cat No. 1 684 817 Roche Applied Science Mannheim, Germany). A las muestras se les agregó 50 µl del reactivo de TUNEL y se incubaron en una cámara húmeda durante 60 minutos a 37°C. Después se lavaron las laminillas con PBS al 0.1M pH 7.4, tres veces y se le agregó un conjugado secundario anti-fluoresceína- POD, incubándose 30 minutos a 37° C, enseguida se reveló con el cromógeno denominado 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorhida (DAB) (dilución 1:10) y se tiñeron con Hematoxilina de Mayers DAKO® (Lillie's Modification) (Anexo I).

A los controles positivos de carcinoma de colon se les adicionaron 50 µl de DNasa grado I [3000 U /mL- 3 U/mL en 50 mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl2 1mg/mL BSA] a 37°C durante 10 minutos, para que los controles positivos demostraran la presencia de apoptosis en glándulas del epitelio estratificado (mucosa) y corroborar la eficiencia y veracidad de la técnica de TUNEL.

El control positivo, se procesó para la detección de apoptosis en colon, con digestión del tejido por DNasa grado I reveló la presencia de núcleos de células del epitelio glandular estratificado intensamente positivas para apoptosis (Fig. 4A), que se corroboró con técnica habitual de Hematoxilina-Eosina al mostrar la presencia de neoplasia epitelial maligna con pérdida de la estructura glandular y del epitelio glandular, con nucleomegalia, nucleólos aparentes y mitosis atípica, así como células con citoplasma eosinófilo y núcleo picnótico que sugirieron apoptosis.

En las muestras se obtuvo una intensidad de marcaje óptima con TUNEL ya que se alcanzó una intensidad similar a la que se esperaba con respecto al control positivo. Los resultados de la aplicación de la técnica modificada de TUNEL para identificar la apoptosis de las arterias de pacientes con pie diabético y de los controles positivos en las células apoptóticas de las glándulas de carcinoma de colon, se realizó por un patólogo y mediante microscopía óptica se observó una tinción color marrón en aquellas células que se encontraron en apoptosis.

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva con medidas de tendencia central y de dispersión y analítica para evaluar la concordancia intra-observador con Kappa y la consistencia interna con el coeficiente de correlación intra-clase, considerando como significativa una $p \leq 0.05$.

Cuadro 2. Características generales de los pacientes con pie diabético

Paciente	Edad (años)/ género	Diagnóstico de ingreso	Evolución DM (años)	Duración de los síntomas (días)	Procedimiento quirúrgico	Diagnóstico histopatológico.
1	46/M	Pie diabético complicado/Fascitis necrosante	10	15	Amputación Supracondílea, miembro pélvico derecho.	Vasos de mediano calibre con hiperplasia de la media que obstruyen su luz en un 40%. Piel y tejidos blandos sus alteraciones a 15 cm de sitio de lesión.
2	56/M	Insuficiencia renal aguda/pie diabético complicado/Fascitis necrosante	24	90	Amputación Supracondílea miembro torácico izquierdo/Amputación falanges miembro torácico derecho; miembro pélvico izquierdo.	Necrosis, con vasos superficiales y profundos trombosados, oclusión de arteria humeral y compromiso inflamatorio.
3	52/M	Pie diabético complicado/Fascitis necrosante	17	19	Desarticulación de cadera miembro pélvico derecho.	Arteriosclerosis de vasos de mediano y gran calibre que obstruye la luz en un 20-40% con calcificación de Monckeberg. Dermatopaniculitis aguda fibrinopurulenta con <i>Actinomicces sp</i> y foliculitis crónica aguda. Tofos gotosos en la unión dermosubcutanea. Miostis aguda y crónica con moderada atrofia.
4	84/F	Pie diabético complicado/Necrobiosis diabética	18	15	Falanges miembro pélvico derecho/Amputación supracondílea.	Ortejo que muestra vasos de pequeño y mediano calibre con hiperplasia de la media y la intima en un 80% con trombos antiguos recanalizados. Piel y tejidos blandos con necrosis e inflamación aguda, límites quirúrgicos con trombos antiguos recanalizados e inflamación aguda. Límite quirúrgico a 5 cm con hipertrofia de la media de vasos de pequeño y mediano calibre que obstruyen su luz en un 40-80%. Inflamación crónica leve.
5	36/M	Fascitis necrosante/Síndrome compartamental	2	7	Amputación supracondílea miembro pélvico derecho.	Aterosclerosis que afecta vasos del límite quirúrgico poplíteo y tibiales anteriores y posteriores que obstruyen la luz hasta en un 70%, con trombos antiguos y recientes que afectan principalmente vasos plantares. Necrosis de piel y tejidos blandos. Inflamación aguda que afecta límite quirúrgico. Úlcera de región plantar de 10 cm de diámetro.
6	53/M	Fascitis necrosante	1	6	Amputación supracondílea de miembro pélvico derecho.	Fragmento de arteria femoral, vaso que parece corresponder a vena con hiperplasia que obstruye su luz en un 30%. Biopsia a 10 cm arriba de la rodilla piel y tejidos blandos que no presentan alteraciones, vasos con hiperplasia de la media. Biopsia a 15 cm arriba de la rodilla piel y tejidos blandos sin infiltración, vasos con hiperplasia de la media.
7	64/F	Fascitis necrosante	10	5	Desarticulación de cadera miembro pélvico derecho.	Importante afección a tejidos con mala respuesta a tratamiento médico y quirúrgico.
8	46/M	Fascitis necrosante/ Pie diabético complicado	11	34	Desarticulación de cadera miembro pélvico derecho.	Tejidos a 5cm de borde quirúrgico piel, tejidos y músculo con inflamación aguda focal con vasos de mediano calibre con hiperplasia de la media y la intima que obstruyen su luz en un 70-80%. Tejidos que corresponden a músculo estriado con inflamación aguda y necrosis. Vasos de pequeño calibre con obstrucción del 50%.
9	74/F	Fascitis necrosante	1	21	Amputación supracondílea, miembro pélvico izquierdo.	Aterosclerosis complicada (calcificación distrófica) que obstruye la luz hasta en un 95% de vasos poplíteos y un 40% en vaso de tibial posterior, anterior y pedías. - Necrosis isquémica de piel y tejidos blandos de ortejo 2 y 5 - ulcera en cara lateral externa de pie y pierna.
10	65/F	Fascitis necrosante/Miembro pélvico derecho	11	34	Desarticulación de cadera miembro pélvico derecho.	Aterosclerosis de Monckeberg obstruye luz en vaso 30% afectando límite quirúrgico tibial posterior, anterior, plantar y pedía con hiperplasia de la media que obstruye su luz en un 90% con reciente formación de trombo, ulcera de 18cm de diámetro que afecta piel y tejidos blandos con abundante inflamación aguda y necrosis. Ausencia de 1X2 ortijos.

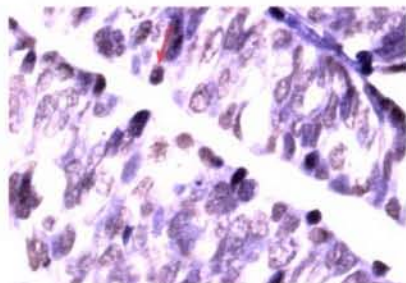
Resultados

El procedimiento original de TUNEL en los cortes de piel de pie diabético se observaron vasos sanguíneos (arterias y venas) con la presencia de apoptosis en el núcleo de células endoteliales, en las células musculares lisas de vasos de pequeño y mediano calibre con aplanamiento de la capa endotelial, hiperplasia concéntrica de la capa media o muscular que llegan a obstruir la luz del vaso hasta en un 90% (Fig. 4 B y C). En algunas arterias de pequeño calibre se observaron trombos antiguos y de reciente formación (Fig. 5. A y B).

También se observaron células apoptóticas en epidermis y en células inflamatorias de la dermis papilar (Fig. 6) indicio de inflamación aguda constituida por polimorfonucleares, con histiocitos y linfocitos, además de apoptosis en las células de Schwann del nervio periférico (Fig. 7).

Se evaluó la concordancia intra-observador con Kappa que fue de 0.7 ($p \leq 0.05$) y la consistencia interna con el coeficiente de correlación intra-clase de 0.75 considerando como significativa una $p \leq 0.05$, la cual fue aceptable.

4A



4B

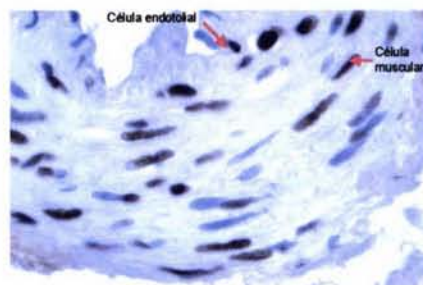


Fig. 4 A Control positivo de carcinoma de colon con Técnica de TUNEL con previa digestión por DNasa grado I, reveló la presencia de núcleos de células del epitelio glandular estratificado (mucosa) intensamente positivas de apoptosis. **B** En corte de vaso sanguíneo de pie diabético se observan núcleos positivos en las células aplanadas del endotelio vascular, así como en células musculares de la capa media de vasos de mediano calibre (100X).

4C

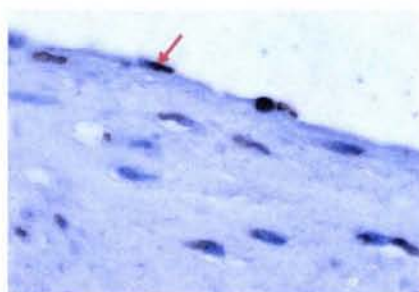


Fig. 4C Con el método de TUNEL se observa vasos sanguíneos (arterias y venas) aplanamiento de la capa endotelial, hiperplasia concéntrica de la capa media o muscular (100X).

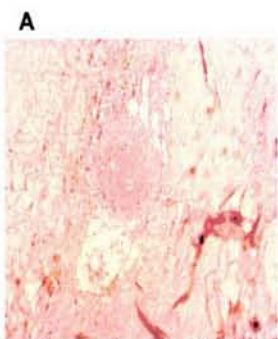


Fig. 5 A y B Con la tinción hematoxilina-eosina (H-E) se observa la formación de trombos en vasos de mediano calibre de límite quirúrgico (40X).

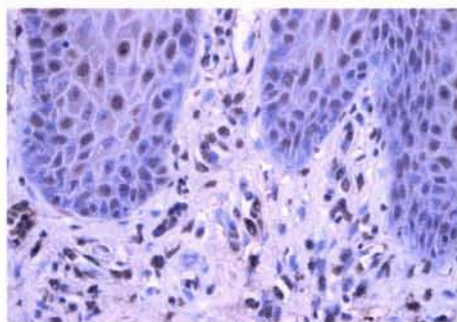


Fig. 6 Corte de piel en el que se observan células en apoptosis con TUNEL en epidermis y en células inflamatorias de la dermis papilar. (100X).

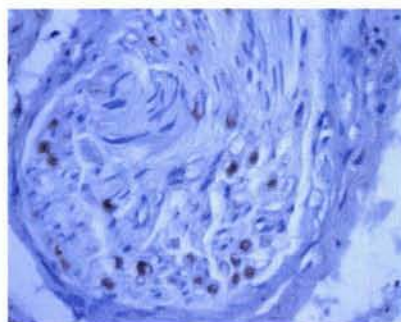


Fig. 7 Corte transversal de nervio que muestra apoptosis con TUNEL en células de Schwann (100X).

Discusión

El principal objetivo del estudio fue la detección de apoptosis en vasos sanguíneos de paciente con pie diabético con la técnica de TUNEL, en el cual tanto la fijación como el pre-tratamiento de los tejidos es crucial para tener un resultado óptimo en tinciones de rutina histológica como en tinciones especiales como la aplicación de la técnica de TUNEL. Las consecuencias de un procesamiento inadecuado de los tejidos pueden traer como consecuencia alteraciones estructurales y por lo tanto falsos positivos (29).

Diversos procedimientos se han utilizado para la recuperación del antígeno tales como horno de microondas, baño maría, olla de presión y autoclave (30). Cattoretti et al, 1993 reporta que los resultados de los diferentes métodos de calentamiento usados para la recuperación del Antígeno Retroviral a través de inmunohistoquímica son similares; sin embargo, se debe tener en cuenta las condiciones y recomendaciones de los materiales a utilizar. Este procedimiento se considera como el punto crucial en el procesamiento de los tejidos embebidos en parafina, lo cual ha sido necesario modificar con la aplicación de diversas técnicas para regular o controlar la temperatura de acuerdo al tejido a estudiar.

En este estudio se utilizó la recuperación del antígeno mediante calor y presión con olla de presión, la cual incrementó la sensibilidad del procedimiento de inmunohistoquímica al obtener una temperatura óptima y resultados satisfactorios en comparación con el horno de microondas. En el que se observó tanto en los controles de carcinoma de colon y en los vasos de pequeño y mediano calibre un marcaje similar.

En este estudio se comprobó que la intensidad del marcaje fue satisfactoria ya que al ajustar el tiempo, la presión y la temperatura fue adecuada para permitir la desnaturalización de proteínas, enzimas endógenas y de los enlaces cruzados de los aldehídos del tejido procesado. Esto con la finalidad de expresión de los

epitopes de los tejidos (31). Nosotros vimos que la recuperación del antígeno con la olla de presión y el amortiguador de citrato de sodio, es un método efectivo. Este método es muy similar al reporte del uso de microondas como fuente de calor (30).

La técnica de TUNEL (Tdt-mediated x-duTP nick end labeling) (31) es la más utilizada para cuantificar células apoptóticas ya que permite también identificar al tipo celular afectado, a pesar de sus limitaciones esta técnica, detecta la fragmentación del DNA por DNAsas endógenas, paso final de la muerte por apoptosis. Recientemente su especificidad se ha cuestionado por el grupo de Fujiwara (32,33), con microscopía electrónica observó células positivas con TUNEL que correspondían a miocitos necróticos o en proceso de reparación de su DNA.

Los estudios que compararon la técnica de TUNEL con otras más específicas que diferían en el clivaje de DNA por necrosis o apoptosis (marcación con Taq polimeras) (34) mostraron índices apoptóticos casi idénticos con ambas técnicas (35), validando así su utilización. Tanto la técnica de TUNEL como las otras utilizadas (microscopía electrónica, medición de la actividad de caspasas, geles de agarosa para observar el clivaje de DNA característico, etc) evalúan parámetros en la etapa final de la apoptosis.

La muerte celular es un fenómeno crucial para el desarrollo normal y la homeostasia de los organismos, pero también juega un papel importante en varias patologías. Hay múltiples vías que llevan a la muerte celular, la activación de caspasas, efectos a nivel mitocondrial y/o presencia especies reactivas de oxígeno (36).

Existe evidencia de la posible participación de la apoptosis en enfermedades vasculares como en la aterosclerosis (37) y en la enfermedad isquémica (infarto al miocardio) (38). En la diabetes mellitus la presencia de aterosclerosis y la enfermedad isquémica contribuyen a la morbilidad de esta enfermedad, cabe mencionar que la presencia de hiperglucemia y otros factores como el aumento en la concentración de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se relacionan con el aumento del estrés oxidativo y además la hiperglucemia inducen apoptosis como se ha documentado en las células endoteliales y tubulares renales (39).

Debido a la escasa información acerca de la fisiopatología del paciente con pie diabético y a la posible participación de la apoptosis en vasos sanguíneos, fue importante realizar la detección de apoptosis con la técnica de TUNEL en vasos sanguíneos para efectuar estudios en un futuro en estos pacientes con esta técnica y la posibilidad de determinar los posibles mecanismos ó la participación de la apoptosis en esta enfermedad.

Conclusiones

1.- La Técnica de TUNEL aplicada en tejidos embebidos en parafina, (vasos sanguíneos) de pacientes con pie diabético fue eficaz y/o apropiada ya que detectó apoptosis en células del endotelio vascular y de la capa muscular.

2.- Las modificaciones realizadas en esta técnica fueron óptimas para la identificación de apoptosis, ya que la sensibilidad radica en el tipo de tejido a procesar y a estudiar.

Perspectiva

La técnica de TUNEL ayudará en la identificación de apoptosis tardía en células endoteliales y capa muscular de vasos sanguíneos de pie diabético y podría en un futuro implementarse para el estudio de la fisiopatología de la enfermedad de los pacientes con pie diabético.

Anexo I

TECNICA DE TUNEL

1. - Realizar cortes histológicos a 3 μm
- 2.- Adherir cortes histológicos en laminillas electrocargadas.
- 3.- Desparafinar a 60°C en horno seco 30 minutos.
- 4.- Hidratación:
 - A. Realizar un baño de Xyleno de 8 minutos.
 - B. Realizar un baño de etanol al 96% de 5 minutos.
 - C. Realizar un baño de etanol al 90% durante 5 minutos.
 - D. Realizar un baño de etanol al 80% durante 5 minutos.
 - E. Realizar un baño de etanol al 70% durante 5 minutos
 - F. Realizar un baño de agua destilada durante 5 minutos.
- 5.- Incubar control positivo con 40ul de DNAsa a 37°C por 10 minutos (1mg/m).
- 6.-Bloquear con peróxido de hidrógeno en metanol al 0.3% PBS 7.4 pH durante 20 minutos.
- 7.-Lavar e introducir las laminillas en agua destilada durante 5 minutos.
- 8.- Lavar con solución salina de fosfatos (PBS) 1M, pH 7.4 2 veces por 5 minutos.
- 9.- Recuperación de antígeno: Citrato de sodio al 0.1 M, pH 6.0 30 minutos en olla de presión a 15 USP.
- 10.- Preparación de la mezcla de reacción de TUNEL "*In Situ* Cell death detection kit, POD" (Cat No. 1 684 817 Roche Applied Science Mannheim, Germany): Tomar vial 1 que es la solución enzimática y vial 2 solución de marcaje utilizando 50 μl de reacción de TUNEL por muestra y 2 controles negativos utilizando 50 μl de la solución de marcaje para cada control.
 - 1.1 Quitar 100 μl del vial 2 solución de marcaje para tener dos controles negativos
 - 2.1 Agregar un volumen total de 50 μl de solución enzimática vial 1 a los restantes 450 μl solución de marcaje en el vial 2 para obtener 500 μl de la reacción de mezcla de TUNEL.
 - 3.1 Mezclar bien para equilibrar componentes.

Procedimiento:

- 1) Lavar laminillas 2 veces con PBS.
 - 2) Agregar 50 μ l de reacción de TUNEL a las muestra.
- Nota:** para el control (-) agregar 50ul de solución de marcaje.
- 3) Incubar durante 60 minutos a 37°C en una atmósfera húmeda y en oscuridad.
 - 4) Lavar laminillas 3 veces con PBS
 - 5) En este paso las muestras pueden ser analizadas con una gota de PBS bajo microscopia de luz fluorescente en un rango de onda de 450-500nm y de 515-565 nm en verde.

Conversión de señal:

- 1.- Agregar 50 μ l de Convertidor POD (vial 3) a las muestra.
- 2.- Incubar las muestras en cámara húmeda por 30 minutos a 37°C.
- 3.- Lavar las laminilla 3 veces con PBS
- 4.- Agregar 50-100 μ l de sustrato DAB o alternativamente sustrato POD. Tomar 100 μ l de DAB sustrato (Cat. No. 1718096) en 900 μ l del amortiguador.
- 5.- Introducir las laminillas en agua destilada al visualizar un color café marrón sobre los tejidos.

Tinción de Hematoxilina de Mayers DAKO® (Lillie's Modification)

- 1.- Introducir las laminillas durante 1 minuto en la hematoxilina
- 2.-Adicionar agua caliente hasta eliminar totalmente el colorante aproximadamente 30 minutos
- 3.- Deshidratar
- 4.- Montar las laminillas con resina sintética.

Referencias

- 1.- <http://who.int/diabetes/facts/world-figures/en/> (noviembre 2005).
- 2.- Wild s, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes *Diabetes care* 2004;27:1047-53.
3. - Harrison's Principles of internal medicine, endocrinology and metabolism. 15th. ed. McGraw-Hill 2001. p. 2116-20.
- 4.- Defraigne JO. Central pathological mechanism explaining diabetic complications? *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996; 25:255-70.
5. - Chakravarthy U, Hayes RG, Stitt AW, et al Constitutive nitric oxide synthase expression in retinal vascular endothelial cells is suppressed by high glucose and advanced glycation end products. *Diabetes* 1998; 47:945.
6. - Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414:813-20.
- 7.- Ishii H, Koya D, King GL. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J. Mol Med* 1998; 76:21.
8. - Du, XL et al. Hiperglucemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhiobitor-1 expression by increasing Sp1 glycosilation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:12222-26.
9. - Nishikawa T et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404:787-90.
- 10.- Olefsky JM and Nolan JJ. Insulin resistance and non-insulin-dependiente diabetes mellitus cellular and molecular mechanisms. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:980
- 11.- Fisiopatología del proceso infeccioso en el pie diabético. *Tratado de Pie Diabético. Fisiología Cap. II.*BlanesJII y cols. 1996.
- 12.- García HA, Fernández MJ, Rodríguez FR. *El pie diabético* ed. Madrid España Elsevier 2004.
13. - Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 1991; 65:1097-8.

- 14.- Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13:243-51.
- 15.- Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356:397-400.
- 16.- Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Van de velde CJ, Cornelisse CJ, Dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: In situ end-labelling of fragmented DNA. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1993; 41; 1:7-12.
- 17.- Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 1998; 17:3261-70.
- 18.- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15:269-90.
- 19.- Nakagawa T. Caspase 12 mediates endoplasmic-reticulum specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid. *Nature* 1999; 403:98-103.
- 20.- Hengartner. *The Biochemistry of Apoptosis*. *Nature* 2000; 407:770.
- 21.- Srinivasula. Baiting Death Inhibitors (regulation of caspases). *Nature* 2001; 410:33.
- 22.- Lewin B. *Genes VII*. Marban libros: España, 2001:866-71.
- 23.- Abbas AK, Lichtman AH, Lichtman MD, Lichtman AH, MD, PhD. *Inmunología celular y molecular Tolerancia inmunológica 5a ed España Elsevier* 2004.p.216-37.
- 24.- Kressel M, Groscurth P. Distinction of apoptosis and necrosis cell death by in situ labeling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res* 1994; 2; 8:549-56.
- 25.- Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E. In situ apoptotic cell labelling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1996;44;9:959-68.
- 26.- Galkowska H, Olszewski W, MD, Wojewodzka U, MSc, Misal J, MSc, and Filipiuk E, Poland W. Expresión of apoptosis-and cell cycle-related proteins in epidermis of venous leg and diabetic foot ulcers. *Surgery* 2003:213-20.
- 27.- Garcia del Moral R. *Laboratorio de anatomía patológica Fundamentos generales sobre procesamiento histológico de los tejidos* ed. MacGraw-Hill

Interamericana 1993:16-54.

28.- Negoescu H, Guillermet Ch, Lorimier Ph, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, and Labat-moleur F. TUNEL apoptotic cell detection in archived paraffin-embedded tissues. *Roche molecular biochemicals* 1998; 3:36-42.

29.- Norton JA, Jordan S y Yeomans P. Brief high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of Antigen retrieval for routinely processed tissues. *Journal of Pathology* 1994; 173:371-79.

30.- Taylor CR, Shi SR, Chen C, Young L, Yang C, Cote RJ. Comparative study of antigen retrieval heating methods: microwave, microwave and pressure cooker, autoclave and steamer. *Biotech Histochem* 1996;71(5):263-70.

31.- Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C et al. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J. Pathol* 1993;171:83-98.

32.- Gorczyca W, Bruno S, Darzynkiewicz RJ et al. DNA strand break occurring during apoptosis: the early in situ detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *Int J Oncol* 1992; 1:639-48.

33.- Kanoh M, Takemura G, Misao J et al. Significance of myocytes with positive DNA end-labelling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1999; 99:2757-64.

34.- Ohno M, Takemura G, Ohno A et al. "Apoptotic" myocytes in infarct areas in rabbit hearts may be oncolytic myocytes with DNA fragmentation: analysis by immunogold electron microscope combined with in situ nick end-labelling. *Circulation* 1994; 94:1422-30.

35.- Didenko VV, Hornby PJ. Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. *J. Cell Biol* 1996;135:1369-76.

36.- Fiers W. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 1999; 18:7719-30.

37.- Kockx MM, De Meyer GR, Muhring J et al. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998; 97:2307-15.

38.- Fliss H, Gattlinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium.

Circ Res 1996; 79:949-56.

39.- Marron B, Ortiz A, Egido J. Factores patogénicos en la neuropatía diabética.

Nefrología 2001; 21(supl 3):18-23.