

ESTUDIO CON MICROSCOPIA OPTICA DE ALTA RESOLUCION (MOAR) DEL CICLO CELULAR EN PACIENTES CON PSORIASIS

HIGHT RESOLUTON OPTICAL MICROSCOPY
OF THE CELLULAR CYCLE IN PSORIASIS PATIENTS

*Frede S., **Caballer MED, **Reinoso N., *Berrotarán N., **Juri G,
***Piccinni D.J., ***Asis G., **Burgos E., ***Spitale L.S.

RESUMEN

Antecedentes: La Psoriasis se caracteriza por incremento del ciclo celular a nivel epidérmico, evidenciado a nivel histopatológico por un intensa hiperparaqueratosis, acantosis, papilomatosis e inflamación crónica. **Materiales y métodos:** Se estudió con microscopia óptica de alta resolución (MOAR), la epidermis de pacientes portadores de Psoriasis, analizando la diferenciación epitelial y las posibles alteraciones estructurales de los queratinocitos. **Resultados:** Los especímenes correspondieron a 10 pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de psoriasis. Las biopsias de piel fueron fijadas en solución de glutaraldehído buffer-collidina durante 48 hs, procesados con la técnica para MOAR y coloreados con azul de toluidina, azul de metileno, fuscina básica y metenamina-plata. Los elementos epiteliales basales presentaban núcleos ovoideos, varios de ellos con nucleólos prominentes. En 7 de los casos estudiados el estrato granuloso estuvo ausente y en los 3 casos restantes observamos retención de núcleos y nucleólos. **Conclusiones:** Se observaron queratinocitos con anofilia perinuclear, complejos de unión elongados e infiltrado linfocitario y de macrófagos.

Palabras clave: diferenciación epitelial en psoriasis. Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR) en Psoriasis.

ABSTRACT

Skin tissue from patients with Psoriasis was analyzed using HROM (High Resolution Optical Microscopy), studying epithelial differentiation and possible structural alterations of the queratinocytes.

The samples were taken from 10 patients with histopathologic diagnosis of Psoriasis. This tissue samples were affixed with glutaraldehyde buffer-collidine for 48 hours. Later processed with the HROM technique and colored with toluidine blue, methylene blue, basic Fuscine, and silver metenamine. The basal epithelial elements presented ovoid nucleus and most of them had prominent nucleolus. In 7 of the studied cases, the granular stratum was absent, and thinner in the rest, with nucleus and nucleolus retention. At this level queratinocytes were observed with perinuclear anophilia, as well as lymphocytic and macrophagic infiltrate and union complex where elongated.

Key words: epithelial differentiation in psoriasis. High Resolution Optical Microscopy (HROM) in psoriasis.

Fecha de envío: julio de 2007 • Fecha de aceptación: 17 de agosto de 2007

*Departamento de Microscopía Electrónica. **Servicio de Dermatología. Hospital Nacional de Clínicas.

***II^o Cátedra de Patología. Fac. de Ciencias Médicas. UNC.

Trabajo Subsidiado SECyT. Resol N°: 05/H218. UNC.

INTRODUCCIÓN

La Psoriasis se caracteriza por incremento del ciclo celular a nivel epidérmico, evidenciado a nivel histopatológico por un intensa hiperparaqueratosis, acantosis, papilomatosis e inflamación crónica.

La utilización de técnicas poco desarrolladas, como la microscopía óptica de alta resolución (MOAR), posee tres ventajas fundamentales: a) observación de los elementos celulares con mayor poder de resolución, b) disminución de costos en los reactivos utilizados en el procesamiento y 3) menor inversión de tiempo para arribar al diagnóstico.

La utilización y la interpretación del MOAR permite admitir y tomar como propio las palabras de E.B. Wilson, eminente biólogo molecular «*la clave para cada uno de los problemas biológicos, finalmente se debe buscar en la célula, porque cada organismo viviente es, o ha sido, una célula.*»

Objetivos

Analizar por medio de MOAR el ciclo celular, el infiltrado inflamatorio y la presencia y/o ausencia de alteraciones en las fibras colágenas en la piel de pacientes con Psoriasis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los especímenes de piel de 1 mm. de 10 pacientes con diagnóstico histopatológico de psoriasis, fueron procesados con la técnica de MOAR. Los mismos fueron fijados en glutaraldehído buffer-collidina durante 48 hs. Posteriormente fueron re-fijados en tetróxido de osmio e incluidos en resinas póxicas (SPURR). Las secciones se obtuvieron con ultramicrotomo Porter lum-MT-1 de un espesor de una micra. Los cortes se colorearon con azul de toluidina, azul de metileno, fucsina básica y metenamina-plata.

RESULTADOS

Los estudios con MOAR mostraron a nivel epidérmico hiperactividad nuclear, con nucléolos prominentes, en ocasiones binucleados. Su disposición era polar y enfrentados o *en espejo*. En otros elementos epiteliales el núcleo era grande, con nucléolo prominente e hiperromático y mitosis en casi todas las capas del epitelio, inclusive el estrato granuloso.

A nivel de la capa basal, la hiperactividad nuclear fue similar al estrato granuloso («secuestro nuclear»).

Los elementos epiteliales basales mantenían sus complejos de unión (7), sus núcleos eran ovoideos o esféricos y los nucléolos prominentes. En este estrato, fue llamativa la presencia de elementos epiteliales aislados, con núcleos grandes, poco coloreados con azul de toluidina, sin nucléolos.

El citoplasma no mostró diferencias relevantes con la coloración nuclear. Los desmosomas eran inconspicuos y con lente de inmersión se observaban esbozos de los mismos.

Dicho hallazgo fue interpretado como células basales o *pluripotenciales*, las cuales no ingresaban en el ciclo celular, que fue corroborado por medio de diferentes cortes en un mismo espécimen y como control en piel normal, donde no fueron observadas.

En el estrato basal observamos células de Langerhans fusadas intensamente teñidas con azul de toluidina (7), algunas intraepiteliales y otras migrando hacia la dermis.

En 7 de los casos estudiados, la epidermis carecía de estrato granuloso, mientras que en los tres restantes el mismo se presentaba muy adelgazado, con retención de núcleos e incluso de nucléolos. A este nivel, se observaron queratinocitos con anofilia perinuclear, infiriendo que los tonofilamentos estaban involucrados. (Fotos N° 1 y 2)

El infiltrado era predominantemente mononuclear, constituido por linfocitos (16,17) y macrófagos con extensiones de tipo lamelipodos. Se observaron gránulos de lipofuscina o pigmento de desgaste entre los elementos epiteliales.

Los complejos de unión (desmosomas) estaban adelgazados y elongados, en ocasiones, con efracciones profundas.

En el estrato superficial se observaron, en ocasiones, escasos queratinocitos anfófilos, mientras que lo predominante fue extensas escamas amorfas, despegadas del epitelio, las cuales se teñían con azul de toluidina. Se observaron algunos queratinocitos en franca apoptosis entre las láminas de escamas. Las diferentes observaciones fueron una anofilia a nivel citoplasmático, tanto l de la capa suprabasal como del estrato granuloso.

La coloración con metenamina plata permitió observar la gran cantidad de glucoproteínas presentes en el núcleo del queratinocito, el

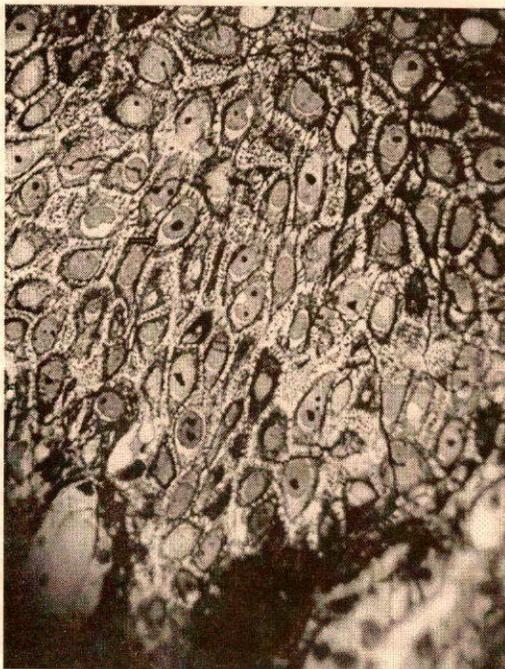


Foto N° 1. Coloración de metenammina plata 400 X. Queratinocitos con anfifilia perinuclear y tonofilamentos involucrados (flecha).

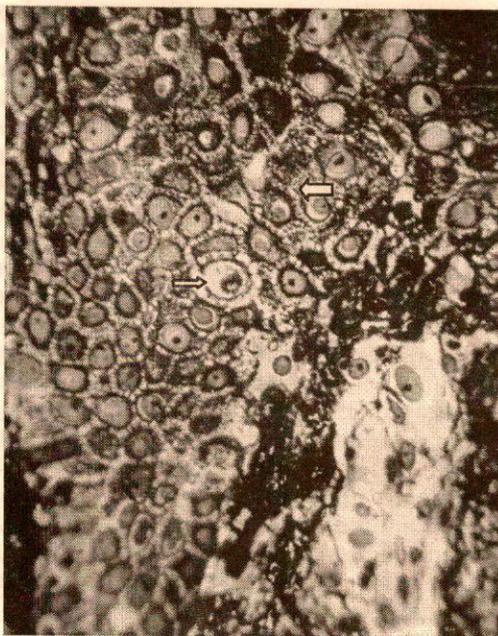


Foto N° 2 Coloración de metenammina plata. 400 x Queratinocitos con anfifilia perinuclear (flecha delgada) y tonofilamentos involucrados (flecha gruesa).

cual permanece activado hasta que se produce la muerte celular. (Foto N° 3)

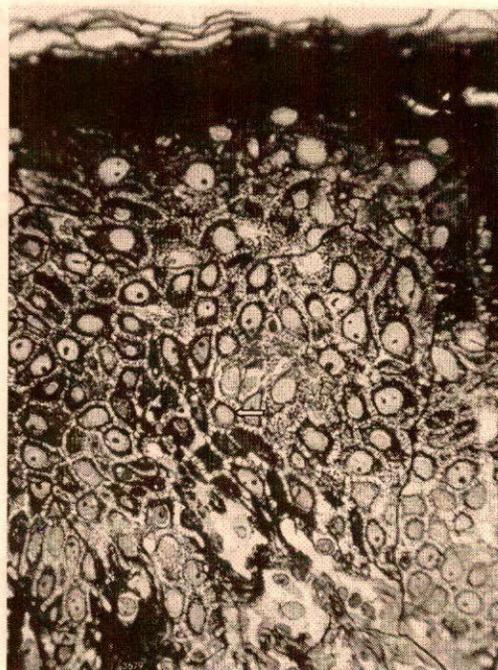


Foto N° 3 Coloración con metenammina plata. 400 X Gran cantidad de glucoproteínas presentes en el núcleo del queratinocito (flecha).

En contraposición con otros estudios, no observamos con MOAR polimorfonucleares neutrófilos.

A nivel de la dermis, alargamiento de las papilas.

La matriz extracelular (MEC), mostró fibras elásticas fuertemente coloreadas con fuscina, mucho más que en pieles normales de control. Las efracciones observadas eran tanto verticales como longitudinales, mientras que las fibras colágenas presentaban roturas o falta de continuidad, con ausencia de paralelismo o polaridad.

Los vasos ya formados presentaban células endoteliales muy tumefactas, las cuales ocupaban casi toda la luz del capilar. (Foto N° 4)

Se observaron procesos de neoangiogénesis precoces, con gemación de células endoteliales y dilatación en el extremo venular. En casi todos los casos obsemos, además de la tumefacción

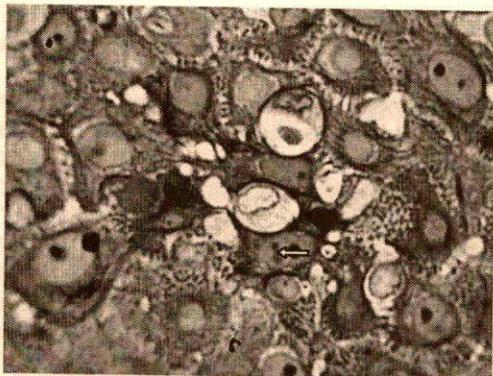


Foto N° 4 Coloración con Azul de Metileno. 400 X
Los vasos ya formados con células endoteliales tumefactas (flecha), las cuales ocupaban casi toda la luz del capilar.

endotelial, infiltrado mononuclear constituido por linfocitos y macrófagos.

Las células endoteliales se presentaron más altas (*endotelio venular alto* o EVA), el cual está involucrado en la reacción inflamatoria e inmunológica.

Alrededor de estos capilares, el infiltrado inflamatorio era en proporción mucho mayor que en el tejido circundante y estaba compuesto predominantemente por linfocitos (Li) y macrófagos. (Foto N° 5)

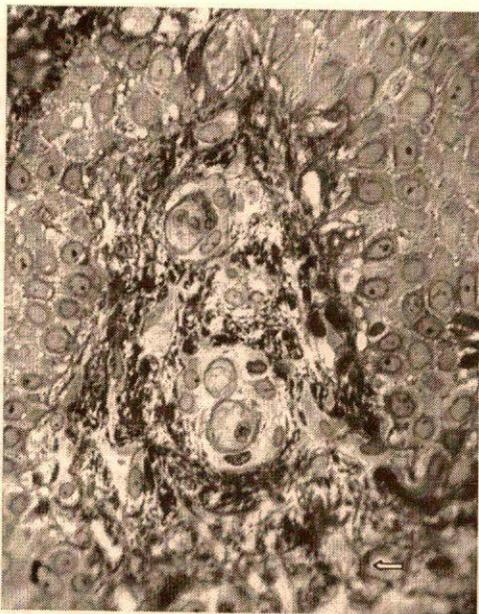


Foto N° 5 Coloración con Azul de Metileno. 400 X
Alrededor de los capilares se observa infiltrado inflamatorio compuesto predominantemente por linfocitos y macrófagos. (flecha)

No llamó la atención la cantidad de eritrocitos anucleados dentro de los capilares y en la MEC, que medían más de 7 micras y se ubicaban en los capilares en forma continua, como cuentas, o en la MEC en forma dispersa.

Ninguno de los pacientes comunicados padecía trastornos hematológicos, y en la bibliografía consultada, se reconoce que los eritrocitos de pacientes psoriásicos viven menos de 120 días.

Es de destacar que, en ninguno de los especímenes analizados por medio de MOAR, observamos mastocitos.

DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

La utilización de técnicas poco conocidas como la microscopía óptica de alta resolución (MOAR), posee tres ventajas fundamentales: a) observación de los elementos celulares con mayor poder de resolución, b) disminución del costo de los reactivos que se utilizan en el procesamiento y 3) menor inversión de tiempo para arribar al diagnóstico.

El análisis de los especímenes permitió corroborar y observar los cambios relevantes que se producen en la piel de pacientes con Psoriasis.

La dermis, como reguladora del crecimiento y diferenciación de la epidermis, mostró cambios relevantes en la MEC, con alteraciones tanto en las fibras elásticas como colágenas. Asimismo, como parte fundamental, la unión dermo-epidérmica presentaba efracciones, lo cual producía una amplia comunicación no sólo de los elementos epiteliales y mesenquimáticos, sino también de información molecular.

Los procesos de neoangiogénesis permitieron inferir la necesidad de sustento del acelerado crecimiento celular. Se demostró mediante MOAR ausencia de polimorfonucleares neutrófilos y presencia de infiltrado inflamatorio de linfocitos y de macrófagos activados, ya que los mismos, con extensiones o lamelipodios. (5, 6, 10, 12, 14).

El endotelio venular alto no existe en el nacimiento, sino que se conforma en procesos inflamatorios, se mostró activado, con células endoteliales tumefactas, elongadas. Dicho endotelio posee dos funciones en las reacciones inflamatorias: 1) pueden ser presentadoras de antígenos para activación de linfocitos T. y 2) regulan el infiltrado leucocitario en el espectro de la inflamación. (16,17). Esto determina que

en la Psoriasis, dicha estructura cumple un rol fundamental, ya sea en la iniciación de la activación linfocitaria o en la producción de moléculas accesorias que respondan al linfocito T. La inmunidad humoral, cumple un rol escaso en la multiplicación de moléculas que están implicadas en la respuesta de hipersensibilidad retardada (15,16).

La Psoriasis, de base inmunogenética (15), representa un desafío para dermatólogos, inmunólogos y biólogos moleculares. Su etiopatogenia mantiene incógnitas, las cuales en ocasiones son contradictorias, ya que se involucran factores ambientales (aloantígenos), que desencadenarían respuestas inmunológicas celulares, y anticuerpos, originando una respuesta inmune humoral (13). Esta entidad, posee un componente inflamatorio que pone en marcha una multiplicidad de moléculas efectoras, lo cual produce un aumento en la cinética del ciclo celular en epidermis, influenciada por moléculas dérmicas (9) y MEC.

Se acepta a la Psoriasis como una entidad genética (1,2,3) y autoinmune, con influencias de factores ambientales y psíquicos. La base genética se respalda en la incidencia familiar y en la asociación con el complejo de histocompatibilidad, sobre todo HLA de clase I (B13, B17, B37 Cw6) y clase II de HLA DR7. Es necesario reconocer, que no se ha encontrado un grupo de HLA específico que supere el 70% de prevalencia, por lo que se sugiere que existiría una heterogeneidad genética, o sea, una herencia de locus múltiples en esta entidad.

La piel recibe numerosos agentes tópicos y ambientales, por lo que el sistema inmune de piel (SIP), no sólo es una barrera defensiva importante, sino que también está perfectamente coordinado y consta de células inmunes (6). Así en epidermis, la población de linfocitos T CD4+ (Li T) es sólo del 2%. A nivel de la capa basal se encuentran las células de Langerhans, presentadoras de antígeno al Li T. En dermis la población de Li T aumenta, siendo la misma CD4+ y CD8+, con macrófagos agregados.

Los antígenos se unen al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), a través de su receptor clonotípico TCR (receptor cell T), estrechamente relacionado al complejo CD3, un grupo de 5 proteínas responsables de la transducción de señales generadas por la unión del TCR a su ligando. Esto desencadena una respuesta inmunológica e inflamatoria, generando diferentes moléculas y activando el endotelio venular. La molécula CD3 facilita el

reconocimiento del antígeno por parte del Li T. Asimismo, en procesos neoplásicos malignos, la activación a través de TCR/CD3 conduce a la apoptosis. Ambos fenómenos, implican una activación de la función genética que requiere transcripción de *de novo*, una fase de traducción o fase de programación seguida por la producción de moléculas inflamatorias.

Con MOAR observamos que el endotelio venular alto estaba muy activado, ya que las células endoteliales se presentaban tumefactas, rodeadas de linfocitos T y de macrófagos. Asimismo, se demostró el involucro de la dermis en el comportamiento epidérmico. Fue llamativa la ausencia de polimorfonucleares neutrófilos, los cuales han sido reportados en numerosos trabajos.

Nosotros inferimos que estos elementos podrían corresponder a la fase aguda de la enfermedad, siendo reemplazados por linfocitos y macrófagos en la respuesta inflamatoria e incluso en la reparación tisular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bowcock, A «Genetics of psoriasis: The potential impact on new therapies.» *Journal of the American Academy of Dermatology*.. 2003, 49 (2) : 51-56.
2. Bray A., Hopkin J., Lewis R., Roberts W. *Essential Cell Biology 2- Edition 2004*, Editorial Garland Science Cap.Nº 21 - 725
3. Cabanillas M., Sanchez-Aguilar D., Perez-Becerra E., Toribio J. Papel de los nuevos tratamientos biológicos en la psoriasis. *Farm Hosp.* 2004, Vol. 28 (3): 192-200.
4. Call ME, Wucherpfennig KW. The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu Rev Immunol.* 2005, 23: 101-25.
5. Call ME, Wucherpfennig KW. Molecular mechanisms for the assembly of the T cell receptor- CD3 complex. *Mol Immunol.* 2004, 40: 1295-305.
6. Chouela E, Troielli P: Consenso Nacional de Psoriasis: Guías de Tratamientos, Sociedad Argentina de Dermatología, 2004
7. Frede S., Cabalier M.E.D. de, Zaya A., Hliba E. Unión Dermoepidérmica: una barrera selectiva, compleja y vital. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas, Córdoba, Argentina 2004*, Vol 61-nº 1. pág. 27-31. ISSN 0014-6722.
8. Frede S., Zaya A., Cabalier M.E.D.de, y Hliba E. Conociendo a la célula de Langerhans.

Archivos Argentinos de Dermatología. 2004, Vol 54: 97-101, ISSN 0066-6750

9. Iglesias Diez L., Guerra Tapia A., Ortiz Romero P. Tratado de Dermatología. II Edición Editorial McGraw-Hill Interamericana España. 2004, 467-474

10. Lebwohl M, Tying SK, Hamilton TK, Toth D, Glazer S, Tawfik NH, Walicke P, Dummer W, Wang X, Garovoy MR, Pariser D; Efalizumab Study Group. A novel targeted T-cell modulator, efalizumab, for plaque psoriasis. *N Engl J Med.* 2003, 20; 349 (21) : 2004-13

11. Lebwohl, M. «Innovations in the treatment of psoriasis.» *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2004, 51(1)40-41.

12. Livak F. In vitro and in vivo studies on the generation of the primary T-cell receptor repertoire. *Immunol.Rev.*2004, 200: 23-35.

13. Marini MA, Noriega G., Galimberti D., Marini MG. Artritis invalidante y tratamiento cardíaco. *Act.Terap.Dermatol* 2006; 29: 388.

14. Rangachari M, Penninger JM. Negative regulation of T cell receptor signals. *Curr Opin Pharmacol.* 2004, 4: 415-22.

15. Steinman Ralph M Alefacept reduces infiltrating T cells, activated dendritic cells, and inflammatory genes in psoriasis vulgaris Laboratory for Investigative Dermatology, The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY 10021 Communicated by, The Rockefeller University, New York, NY, 2004, December 21.

16. Williams MS, Kwon J. T cell receptor stimulation, reactive oxygen species, and cell signaling. *Free Radic Biol Med.* 2004, 37: 1144-51.

17. Von Boehmer H. Selection of the T-cell repertoire: receptor-controlled checkpoints in T-cell development. *Adv Immunol.* 2004, 84: 201-38.