

Tesis de Maestría

Rol de la galectinas -1 y -3 en el desarrollo de fibrosis en la esclerosis sistémica progresiva

Mora, Gabriela Fernanda

2008

Tesis presentada para obtener el grado de Magíster de la
Universidad de Buenos Aires en Biología Molecular Médica
de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Mora, Gabriela Fernanda. (2008). Rol de la galectinas -1 y -3 en el desarrollo de fibrosis en la esclerosis sistémica progresiva. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4511_Mora

Cita tipo Chicago:

Mora, Gabriela Fernanda. "Rol de la galectinas -1 y -3 en el desarrollo de fibrosis en la esclerosis sistémica progresiva". Tesis de Magíster. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4511_Mora

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

BIBLIOTECA CENTRAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Y NATURALES / UBA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Maestría en Biología Molecular Médica

TESINA

ROL DE LAS GALECTINAS -1 Y -3
EN EL DESARROLLO DE FIBROSIS
EN LA ESCLEROSIS SISTÉMICA
PROGRESIVA

Dra Gabriela Fernanda Mora

79041

Director : Dr. José Mordoh

2008

A mi esposo, Alejandro.

ÍNDICE.

	<u>Página</u>
I. <u>Introducción</u>	4.
a) Fibrosis	4.
b) Galectinas	6.
c) Microambiente tumoral y fibrosis	11.
d) Esclerosis sistémica progresiva	11.
e) Otra molécula relacionada con los procesos fibróticos: TGF β	19.
II. <u>Objetivo</u>	23.
III. <u>Materiales y Métodos</u>	24.
a) Pacientes	24.
b) Inmunohistoquímica	27.
c) Cuantificación	27.
d) Análisis estadístico	27.
IV. <u>Resultados</u>	28.
V. <u>Discusión</u>	39.
VI. <u>Conclusiones</u>	46.
VII. <u>Agradecimientos</u>	48.
VIII. <u>Bibliografía</u>	49.

I. INTRODUCCIÓN.

a) Fibrosis.

La fibrosis se define por la proliferación, endurecimiento y/o cicatrización de varios tejidos y es atribuida a un exceso de deposición de componentes de la matriz extracelular como el colágeno. Este proceso es el resultado de una reacción inflamatoria crónica inducida por una variedad de estímulos como: infecciones persistentes, reacciones autoinmunes, alergia, exposición a químicos, radiaciones e injuria tisular (1).

Aunque los tratamientos actuales para enfermedades fibróticas como fibrosis pulmonar idiopática, cirrosis hepática, esclerodermia, enfermedad renal progresiva y fibrosis cardiovascular típicamente hacen blanco en la respuesta inflamatoria, existe evidencia creciente de que los mecanismos que llevan a la fibrosis son distintos de aquellos que regulan la inflamación. De hecho, algunos estudios han sugerido que la inflamación sostenida es necesaria para revertir una fibrosis establecida y progresiva (2-3).

El mediador celular clave en la fibrosis es el miofibroblasto, que cuando es activado sirve como célula primordial productora de colágeno. Los miofibroblastos se generan de una variedad de fuentes que incluyen a las células mesenquimáticas residentes, células epiteliales y endoteliales en procesos denominados transición epitelio/mesenquimática - endotelio/mesenquimática (TEM/TEndM), como también de células circulantes

“tipo fibroblastos” llamadas fibrocitos, derivadas de células madre de médula ósea (4).

Los miofibroblastos se activan por una variedad de mecanismos como señales paracrinas derivadas de linfocitos y macrófagos, factores autocrinos secretados por los miofibroblastos y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) producidos por organismos patogénicos que interactúan con receptores de reconocimiento de patrones *toll-like* (TLRs) en la superficie de los fibroblastos (5-8).

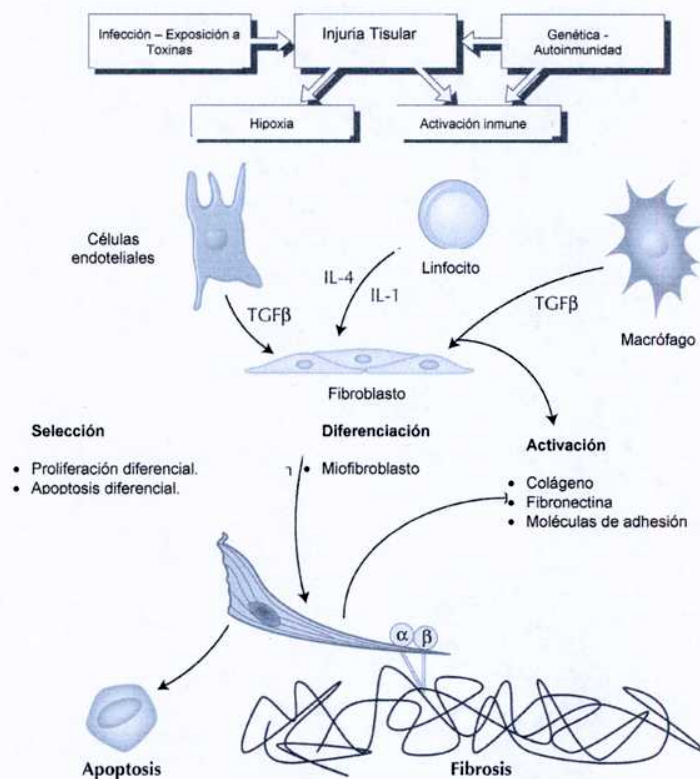


Figura 1. Patogénesis de la fibrosis.

b) Galectinas.

Las galectinas son una familia de lectinas animales con alto índice de conservación evolutivo entre especies, que cumplen distintas funciones intra y extracelulares. Como característica central, poseen una gran avidez de unión a beta-galactósidos. Pueden descifrar glicocódigos específicos en macromoléculas complejas situadas en las membranas celulares o en la matriz extracelular (MEC) a través de un dominio de 135 aminoácidos filogenéticamente intacto desde invertebrados inferiores hasta mamíferos denominado “dominio de reconocimiento de carbohidratos” (DRC), que interacciona con estructuras disacáridas del tipo $(\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc})_n$, polilactosamina (9-10) .

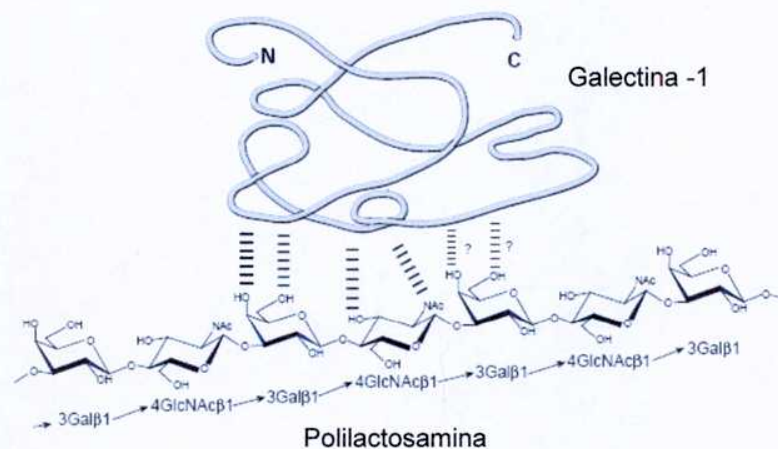


Figura 2. Esquema de la hipótesis de interacción de galectina -1 con terminales de polilactosamina.

Modificado de: Cho et al, *Trends in glycoscience and glycotechnology* 1997; 9:47-56.

Aunque la lactosamina es la estructura oligosacárida mínima reconocida por las galectinas, un gran número de glicoproteínas y otras glico-estructuras

complejas son potenciales receptores de galectinas. Se encuentran en la superficie celular, en la matriz extracelular y en el citoplasma de las células. Influyen en la adhesión célula-matriz a través de contrarreceptores glicosilados de la superficie celular (por ejemplo, ciertas isoformas de laminina, fibronectina, vitronectina e integrinas) (9).

Aunque todos los miembros de la familia de galectinas se unen a β -galactósidos, cada una tiene especificidad diferencial por oligosacáridos más complejos; de allí que diferentes miembros de esta familia puedan unirse a diferentes receptores de glicoconjugados, resultando en efectos biológicos distintos.

De acuerdo con su estructura, estas proteínas ligadas a hidratos de carbono se clasifican en: prototipo (con un sólo dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC), entre las que se encuentran las galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13 y 14; quiméricas (DRC más un dominio de unión a proteínas unidos por un *linker*) como la galectina -3 y de repetición en *tandem* (varios DRCs), galectinas -4, 6, 8, 9 y 12. Todas ellas comparten varias similitudes en sus DRCs, como también la especificidad por ligandos conteniendo galactósidos (9-10).

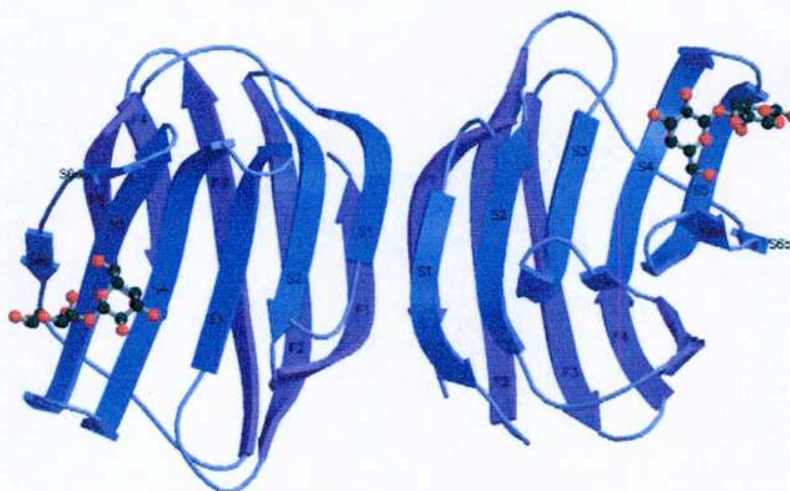


Figura 3. Diagrama de cintas de galectina-1 homodimérica, con sus DRCs –en rojo y negro–, preparado con el programa MOLSCRIPT (Kraulis, P. J. *J. Appl. Crystallog.* 1991; 24:946–950). Las cadenas beta agrupadas en 5 (F1–F5) y 6 (S1–S6a/S6b) hojas beta se indican con letra y número. Modificado de López-Lucendo M *et al*: *J. Mol. Biol.* 2004; 343: 957–970.

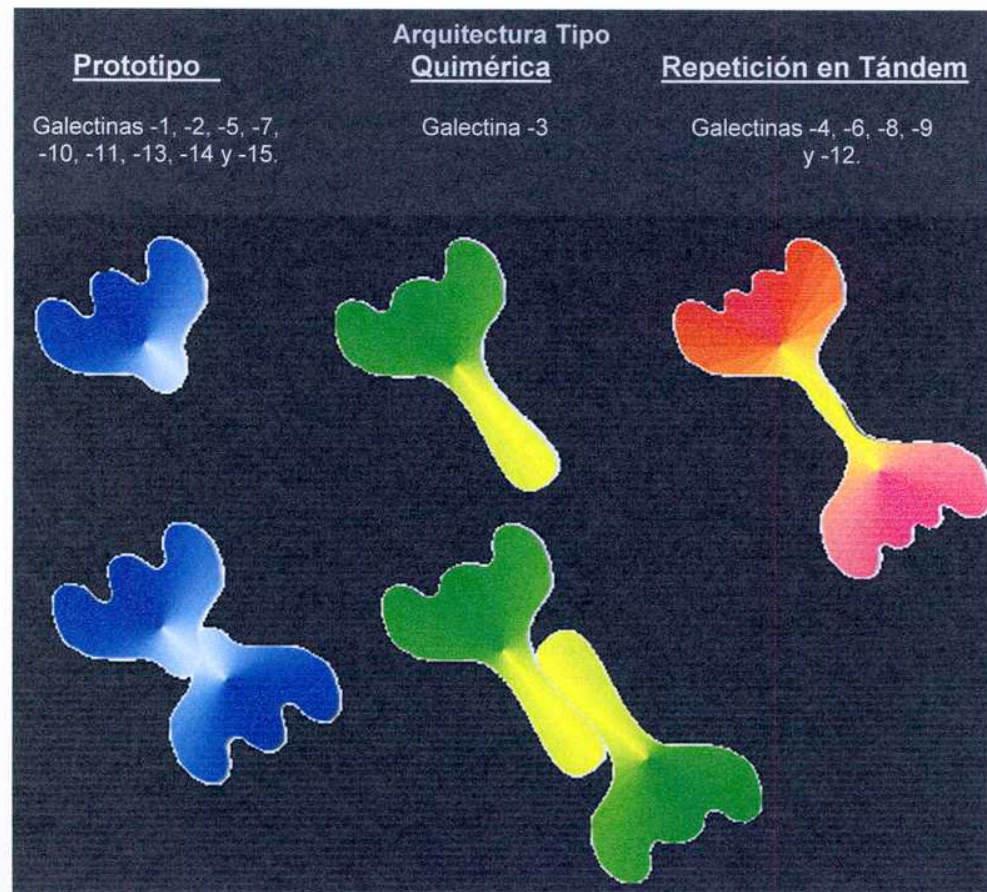


Figura 4. Esquema de las características estructurales de los diferentes tipos de galectinas.

A pesar de dichas similitudes, es llamativo que algunos de los miembros de esta gran familia de lectinas actúan como amplificadores de la respuesta inflamatoria, mientras que otros activan señales homeostáticas para disminuir respuestas inmunológicas potencialmente dañinas inhibiendo así la cascada inflamatoria.

Galectina-1 induce la apoptosis de linfocitos T activados (CD45+ RO). Los linfocitos T de tipo Th2 son resistentes a la apoptosis inducida por Gal-1 (9-

13). La galectina -1 estaría involucrada como mediador junto a FasL y TNF α en la muerte celular inducida por activación de linfocitos T (14-15).

Galectina-1 produce una modulación de la secreción de citoquinas hacia un perfil Th2 (IL4, 5, 10). A su vez, los macrófagos activados expresan altos niveles de galectina-1, promoviendo la apoptosis de linfocitos T activados; galectina -1 inhibe la activación de NF κ B, provocando así la sensibilización a la apoptosis inducida por FasL de linfocitos T *resting*. El gen galectina-1 tiene muchos sitios de unión a NF κ B, con una homología del 100%, y se conoce la propiedad de este factor de transcripción de inducir la producción de agentes tanto proinflamatorios como antiinflamatorios (9-13).

Galectina-3 se encuentra en el núcleo y en el citoplasma de las células y puede influir en las interacciones célula-matriz por acción indirecta sobre la expresión de moléculas de adhesión (α 6v1 y α 4v7 integrinas) y citoquinas como IL-1 (9-10).



Figura 5 Influencia de las galectinas (Gal) en la regulación de la fisiología de células T. El esquema ilustra la influencia de galectinas -1 y -3 sobre distintas funciones de células T, incluyendo la apoptosis, activación, adhesión y secreción de citoquinas. MEC: matriz extracelular; TCR: receptor de linfocitos T. Modificado de Ilarregui, JM. *et al: Ann Rheum Dis* 2005; 64:96–103.

Galectina -3 se expresa normalmente en la piel a nivel de la epidermis en los queratinocitos (en la membrana plasmática), y tanto galectina-1 como galectina-3 se expresan en las células de Langerhans (en el citoplasma y en el núcleo), y en la dermis (en la matriz extracelular y tanto en el núcleo como en el citoplasma de los fibroblastos), donde juegan un rol importante en las funciones de contacto intercelular, adhesión celular en epidermis e interacciones entre las células y la matriz extracelular en la dermis (16-17).

La galectina-1 constituye además un mecanismo de inmunoprivilegio para algunos tumores, favoreciendo el escape tumoral a la respuesta inmune del huésped (18) . Por otra parte, la galectina-3 ha sido asociada al pronóstico de ciertos tipos de cáncer pulmonar (19).

En un estudio sobre tejido hepático fibrótico, se demostró que tanto galectina-1 como galectina-3 favorecían la proliferación de células estrelladas hepáticas activadas (20-21). Galectina -3 tendría un rol importante en la reepitelización de cicatrices corneales crónicas (22)

Por análisis proteómico, se ha demostrado recientemente un aumento de la expresión de galectina-1 en el lavado bronquioalveolar de pacientes con fibrosis pulmonar esclerodérmica (23).

c) Microambiente tumoral y fibrosis.

La invasión tumoral y metástasis han sido relacionadas con un proceso “descontrolado” de curación de heridas. Los genes comprometidos permiten identificar tumores cuya “firma” genética remeda la de una herida activa. Este fenotipo de herida es evidente en estadios clínicos tempranos, persiste durante el tratamiento y predice un elevado riesgo de metástasis y mortalidad por carcinomas mamario, pulmonar y gástrico (24).

Es conocida la relación entre carcinogénesis y algunos procesos fibróticos crónicos como ocurre con la fibrosis pulmonar idiopática y el cáncer de pulmón, y en el caso de la esclerodermia con distintos tipos de cáncer (25-27).

El rol de la matriz extracelular y los fibroblastos que la producen en el desarrollo de un microambiente favorable al desarrollo y progresión de tumores es crítico (28-31).

d) Esclerosis Sistémica Progresiva.

La Esclerosis Sistémica Progresiva (ESP) es un desorden del tejido conectivo caracterizado clínicamente por induración y engrosamiento de la piel (esclerodermia), fenómeno de Raynaud (vasoespasma generalmente digital inducido por el frío o las emociones) y otras alteraciones vasculares, manifestaciones musculoesqueléticas y compromiso visceral (tracto digestivo, pulmones, corazón y riñones). Se trata de una enfermedad rara, tres veces más común en mujeres. La incidencia total anual está cerca de 14.1/1.000.000

(8,3/1.000.000 en hombres blancos y 28/1.000.000 en mujeres blancas, aún más frecuente en mujeres de raza negra). El sexo masculino, la raza negra, el comienzo de la enfermedad después de los 40 años y la forma difusa de la enfermedad son indicadores de peor pronóstico (32-34).

La severidad y progresión de la enfermedad varían desde la forma clásica, con esclerodermia proximal y severo compromiso de órganos internos, a las formas limitadas a las partes distales de los miembros, calcinosis y compromiso visceral tardío.

La ESP se clasifica clínicamente en (32):

1. Sistémica:
 - a) difusa: fibrosis cutánea diseminada distal y proximal de tronco y cara. Rápida progresión del compromiso visceral;
 - b) limitada: fibrosis de extremidades distales, simétrica. Compromiso visceral tardío, calcinosis y telangiectasias;
 - c) superposición: fibrosis difusa o limitada y características típicas de una o más de cualquier otra enfermedad del tejido conectivo.
2. Localizada:
 - a) morfea;
 - b) esclerodermia linear .
3. Síndromes esclerodermiformes: fasciitis eosinofílica, síndrome eosinofilia-mialgia, síndrome del aceite tóxico.

Esclerodermia Limitada

Esclerodermia Difusa

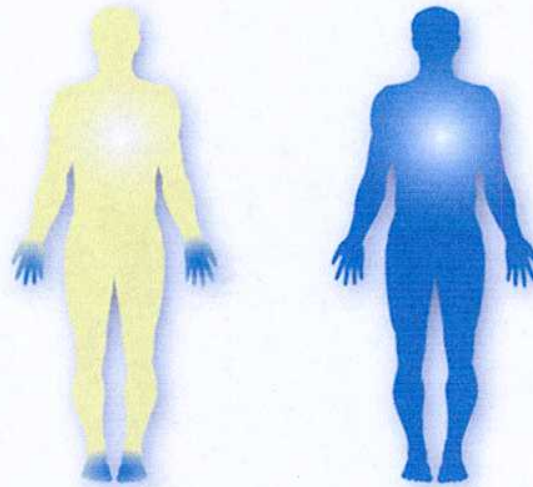


Figura 6. Distribución del compromiso cutáneo en la ESP (en azul).

La ESP puede ser clasificada en subtipos serológicos que van acompañados de rasgos clínicos particulares: los pacientes con esclerodermia difusa se caracterizan por la presencia de anticuerpos antitopoisomerasa I (Scl 70) o anticuerpos anti RNA polimerasa I y III; los que padecen la forma limitada generalmente tienen anticuerpos anticentrómero o anti Th. Asimismo, los pacientes con rasgos de superposición tienen anticuerpos anti U1 RNP, anti PM-Scl o anti U3 RNP. La proporción de pacientes que padecen esclerodermia y tienen por lo menos uno de los siete anticuerpos específicos es del 85% (34).

En el año 1980, Masi *et al* establecieron los criterios de clasificación de ESP para la *American Rheumatologic Association* (32):

Criterio mayor

1. Esclerodermia proximal: cambios esclerodermatosos típicos (falta de elasticidad, engrosamiento y edema, excluyendo formas localizadas) en áreas proximales a articulaciones metacarpo y metatarsofalángicas.

Criterios menores

1. Esclerodactilia: cambios esclerodermatosos limitados a los dedos.
2. *Pitting-scars* (cicatrices puntiformes): pérdida de sustancia en pulpejos secundaria a isquemia digital y acro-osteólisis.
3. Fibrosis pulmonar bibasal: no causada por enfermedad pulmonar primaria.

Estos criterios diagnósticos reúnen un 97% de sensibilidad y un 98% de especificidad.

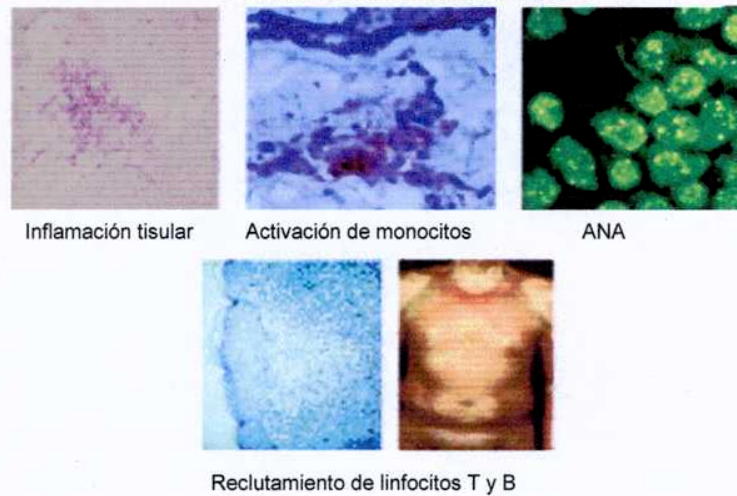
FASE PATOGENICA

Vascular Isquemia digital, calcinosis, integridad y tono vasomotor, HAP



Inmune

Inflamación y autoanticuerpos



Fibrosis

Cicatrización y remodelación de tejido conectivo

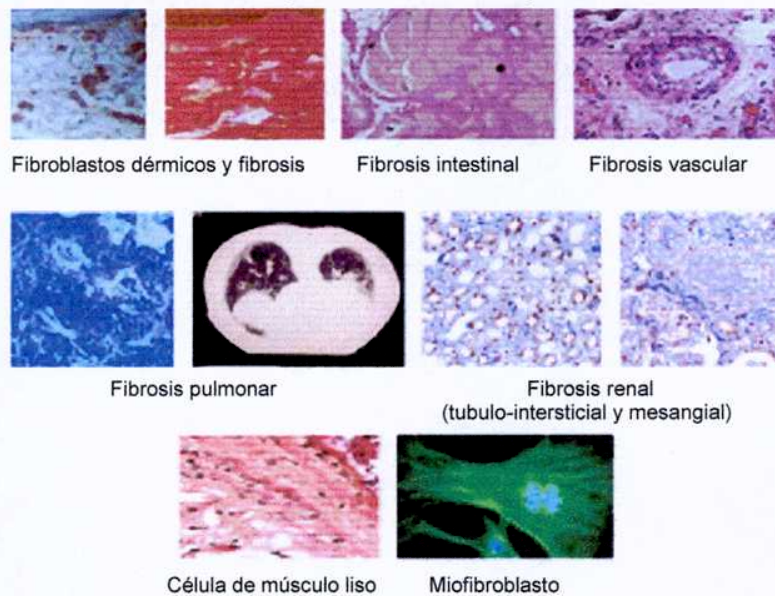


Figura 7. Nexos clínico-patogénicos y celulares en la ESP. HAP: hipertensión arterial pulmonar; ANA: anticuerpos antinucleares

Ante la posibilidad de que un paciente tenga una ESP, se deben tener en cuenta para el diagnóstico diferencial un grupo de enfermedades cuyas manifestaciones remedan las de la esclerodermia:

Síndromes esclerodermiformes:

- fasciitis eosinofílica;
- síndrome del aceite tóxico;
- síndrome eosinofilia-mialgia (por ingestión de L-triptofano contaminado);
- esclerodermia asociada a exposición a sílice y siliconas;
- síndromes esclerodermiformes inducidos por inhalación de solventes orgánicos: tricloroetileno, percloroetileno, tricloroetano, benceno, tolueno, xileno, metilencloride, metafenilendiamina;
- síndromes esclerodermiformes inducidos por químicos: bleomicina, cloruro de vinilo, pentazocina, 5-HO L-triptofano, supresores del apetito, bromocriptina;
- síndromes esclerodermiformes inducidos por resinas epoxi;

La esclerodermia inducida por cloruro de vinilo, constituye el paradigma de estos síndromes, y su característica central es la remisión de las manifestaciones cuando se suprime la exposición al tóxico.

Otras enfermedades que pueden remedar una esclerodermia son:

- enfermedad injerto contra huésped crónica;
- esclerosis digital diabética;

- escleredema adutorum de Buschke;
- escleromixedema;
- enfermedades metabólicas raras: carcinoide, fenilcetonuria, porfiria cutánea tarda, acromegalia;
- otras enfermedades raras: síndrome de Werner, progeria, síndrome de Rothmund, acrodermatitis crónica atrófica, amiloidosis;
- desórdenes neurológicos con piel distrófica: síndrome de distrofia simpática refleja, hemiplejía, paraplejía (32-34).

En los últimos años, ha existido un interés creciente en el concepto de la esclerosis sistémica progresiva como una enfermedad multifactorial, posiblemente desencadenada por factores ambientales (radiaciones, xenobióticos, infecciones), en un huésped genéticamente predispuesto (33-35).

El núcleo celular constituye un blanco de la autoinmunidad tanto idiopática como inducida por xenobióticos. Se han observado *clusters* anormales de autoantígenos nucleares y proteasomas en líneas celulares tratadas con xenobióticos, células esplénicas de modelos animales de autoinmunidad inducida por xenobióticos y células dendríticas de pacientes con esclerodermia. Estos agrupamientos anómalos interfieren con funciones normales del núcleo como la transcripción y la replicación, e induce una degradación proteasómica alterada de autoantígenos nucleares y envejecimiento celular (36).

La patogenia de la ESP comprende: injuria vascular, infiltrados celulares inflamatorios y la presencia de un excesivo número de fibroblastos con fenotipo activado. Estas alteraciones resultan en una acumulación prominente de componentes de la matriz extracelular, fundamentalmente colágenos tipo I y III, y

fibrosis severa y progresiva de órganos internos (35-36). Todos estos eventos remedan el proceso normal de curación de heridas. Durante la cicatrización normal y patológica los fibroblastos proliferan y son eliminados por apoptosis (37-38).

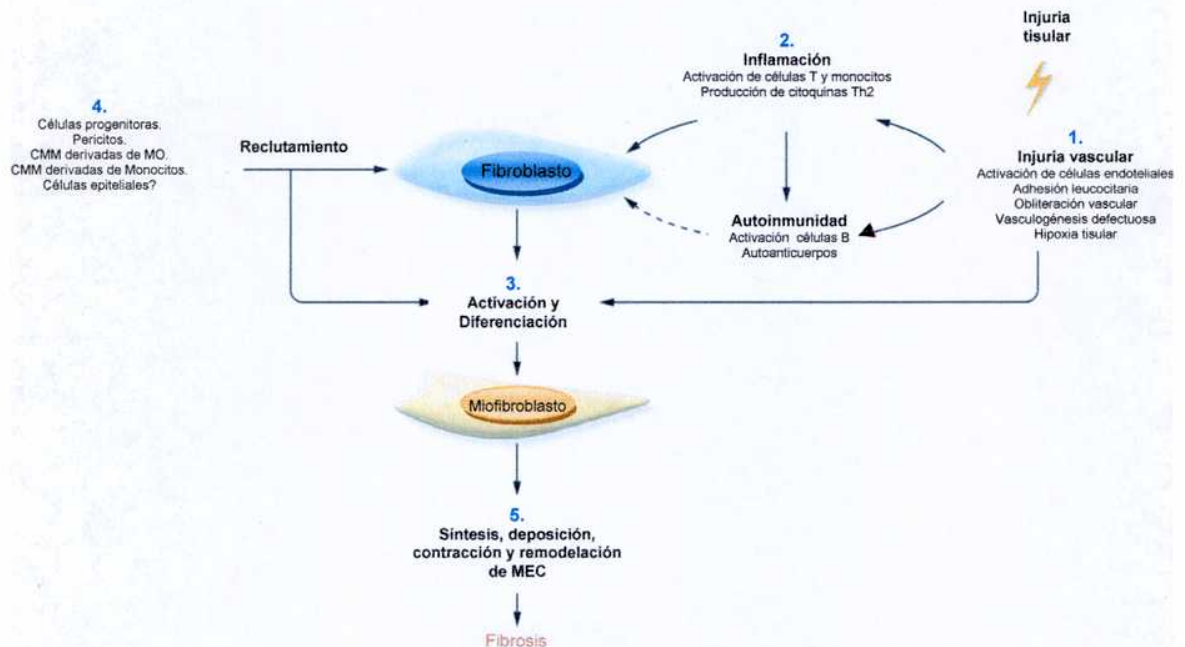


Figura 8. Patogénesis de la ESP: integración de procesos vasculopáticos e inmunológicos que llevan a la fibrosis. La pathogenesis de la ESP es iniciada por injuria microvascular (1). Esto induce inflamación y autoinmunidad (2), que actúan directa e indirectamente en la activación fibroblástica (3), que es un evento central en el desarrollo de la fibrosis. El número de fibroblastos y sus precursores en los tejidos afectados aumenta tanto por el incremento del tráfico como por la diferenciación de las células mesenquimáticas (4). Los miofibroblastos activados en el tejido lesional, cumplen una serie de funciones que culminan en la fibrosis.

CMM: células madre mesenquimáticas; MO: médula ósea; MEC: matriz extracelular.

Modificado de Varga J : *J. Clin. Invest.* 117:557–567 (2007).

Debido a que la esclerodermia se caracteriza por una respuesta predominantemente Th2 de linfocitos T helper, hay un incremento de citoquinas Th2 como IL4 e IL13, que tienen actividad profibrótica (39). La IL13 en la fase inflamatoria ó temprana de la enfermedad, promueve la producción de TGF β , que es un potente inductor de la diferenciación de miofibroblastos y de su

resistencia a la apoptosis, perpetuando el proceso fibrótico. Esta regulación anormal del proceso apoptótico, es el resultado de la resistencia a la apoptosis inducida por Fas de fibroblastos en cultivo de piel lesional de pacientes con esclerodermia, y no es causada por disminución de niveles de receptor Fas en la membrana de los fibroblastos (39–40).

e) **Otra molécula relacionada con los procesos fibróticos: TGF β .**

El factor transformador de crecimiento beta-1, ó TGF- β 1 es un polipéptido miembro de la superfamilia de citoquinas del factor transformador de crecimiento beta. Es una proteína secretada que cumple muchas funciones celulares, como el control del crecimiento, proliferación y diferenciación celulares y la apoptosis.

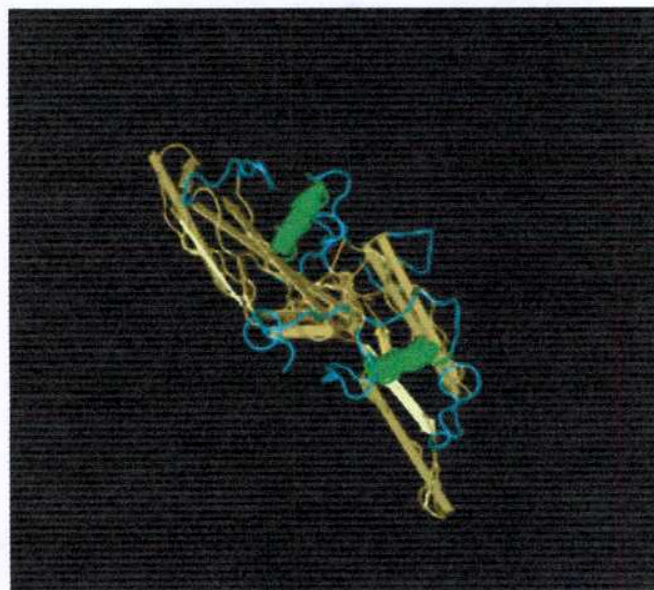


Figura 9. Estructura de la molécula de TGF β -1.

El TGF- β 1 fue identificado por primera vez en plaquetas humanas como una proteína de peso molecular de 25 kilodaltons con un rol potencial en la cicatrización de heridas. Más tarde fue caracterizado como una gran proteína precursora de 390 aminoácidos, que era procesada proteolíticamente para producir un péptido maduro de 112 aminoácidos. TGF- β 1 juega un rol importante en el control del sistema inmune y evidencia actividad sobre diferentes tipos celulares ó células en diferentes estadios evolutivos. La mayoría de las células inmunes secretan TGF- β 1 (41).

Las respuestas inmunes “tras barricadas” ó sitios de inmunoprivilegio no son ya considerados desde reparos anatómicos, pero sin embargo, no pueden desarrollarse en cualquier sitio, sino donde células inmunorregulatorias se congreguen y expresen o liberen productos capaces de desviar las respuestas del huésped hacia antígenos foráneos. Entre las moléculas fundamentales comprometidas en la orquestación de estos sitios ectópicos de inmunosupresión está el TGF- β (41).

<u>Vía de Señalización TGF beta</u>	
Superfamilia de ligandos TGF beta	⬇ Familia TGF beta (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3). ⬇ Proteínas óseas morfogénicas (BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP10, BMP15). ⬇ Factor Diferenciador de Crecimiento (GDF1, GDF2, GDF3, GDF5, GDF6, GDF7, Myostatin/GDF8, GDF9, GDF10, GDF11, GDF15). ⬇ Otros (Activina A y B/Inhibina A y B, Hormona Anti-mülleriana, Nodal).
Receptores TGF beta	⬇ TGFBR1: receptores Activina tipo 1a(ACVR1, ACVR1B, ACVR1C) - VRL1 - BMPR1 (BMPR1A - BMPR1B). ⬇ TGFBR2: receptores Activina tipo 2(ACVR2A, ACVR2B) - AMHR2 - BMPR2. ⬇ TGFBR3: betaglicano.
Transductores/SMAD	⬇ R-SMAD (SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, SMAD9) – ⬇ I-SMAD (SMAD6, SMAD7) ⬇ SMAD4.
Inhibidores de ligandos	⬇ Cerberus - Cordin - DAN - Decorina - Folistatina - Gremlina - Lefty – LTBP1 - Noggin - THBS1.
Correceptores	⬇ BAMBI - Cripto.
Otro	⬇ SARA.

Tabla 1. Vías de señalización de la superfamilia TGF β .

Mientras las vías inmunosupresoras mediadas por TGF- β son beneficiosas para la iniciación y control de la respuesta inmune y el mantenimiento de la homeostasis inmunológica, también pueden solapar a los mecanismos de inmunovigilancia, resultando en una falla para reconocer o responder adecuadamente a antígenos propios, foráneos ó asociados a tumores.

En el análisis del transcriptoma de cultivo de fibroblastos “sanos” de pacientes con esclerodermia se detectaron anomalías en una variedad de genes y procesos celulares comprometidos en la formación de matriz extracelular, fibrillogénesis, activación de complemento y angiogénesis (42).

En un trabajo de Daroqui y colaboradores (43) se investigó la regulación recíproca entre TGF β y galectina-1, dos mediadores críticos en la progresión tumoral y el escape del cáncer a los mecanismos de inmunovigilancia, en la línea celular LM3 (adenocarcinoma mamario metastásico derivado de cultivo primario de adenocarcinoma mamario espontáneo M3). Mostraron la primera evidencia de que la señalización vía TGF β 1 produce un aumento de la expresión de galectina-1 en células tumorales. Este efecto también fue observado en la línea LP07 de adenocarcinoma pulmonar murino y en líneas de adenocarcinoma mamario humano MCF7. Otros autores habían demostrado previamente que TGF β 1 produce una *upregulation* del mRNA del gen galectina-1 en células de músculo liso arterial pulmonar murino PAC1 y en células de músculo liso vascular humanas (44). Es interesante señalar que mientras TGF β 1 regula la expresión de galectina-1 en células LM3, galectina-1 no influye en la expresión de TGF β 1, sugiriendo que la expresión de galectina-1 y su actividad inmunosupresora asociada podría ser influenciada por los niveles de TGF β 1 en el microambiente tumoral, especialmente teniendo en cuenta los altos niveles de TGF β 1 encontrados en varios modelos tumorales (45).

II. OBJETIVO

Teniendo en cuenta el rol de las galectinas -1 y -3 tanto en enfermedades fibróticas en general como en el escape inmunológico y la progresión de tumores, se planteó como objetivo de la tesina evaluar la expresión de estas proteínas en biopsias de piel de pacientes con ESP y correlacionar los hallazgos con las características clínicas y humorales y la eventual presencia de cáncer en pacientes con esta enfermedad.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

a) Pacientes.

Se estudiaron pacientes con diagnóstico de Esclerosis Sistémica Progresiva según criterios del ACR (*American College of Rheumatology*) (22), que integran la población de pacientes ambulatorios y del sector internación del Departamento de Medicina del Hospital Militar Central Cirujano Mayor Doctor Cosme Argerich, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Se realizó una revisión de las características clínico-humorales de la enfermedad:

1. Tipo de esclerodermia (de acuerdo con criterios del ACR). Esclerodermia difusa (ED), esclerodermia limitada (EL), síndrome de superposición (SS), enfermedad injerto contra huésped (EICH).
2. Tiempo desde el diagnóstico (en meses).
3. Anticuerpos antinucleares (FAN) y anticentrómero (ACA) por inmunofluorescencia indirecta con sustrato Hep2 (valor de corte positivo para títulos superiores a 1/40); anticuerpos antitopoisomerasa I (ATA) por inmunodifusión radial (cualitativo).
4. Capacidad pulmonar de difusión de monóxido de carbono (DLCO) (clasificada como 0=normal; 1=leve disminución; 2=moderada disminución; 3=severa disminución).

5. Tomografía computada de tórax de alta resolución (HRCT) (clasificada según los hallazgos: 0=normal; 1=refuerzo intersticial periférico; 2=alveolitis; 3=fibrosis) .
6. Tratamientos inmunosupresores: D-penicilamina (D-Pen), metotrexate (MTX), glucocorticoides (GC), ciclofosfamida (CFM), etc.

Todos los pacientes incluidos firmaron un consentimiento informado para la realización y utilización de las biopsias de piel de antebrazo y el acceso a sus datos clínico-demográficos.

La realización del trabajo contó con la aprobación del Departamento de Docencia e Investigación de la Institución.

b) Inmunohistoquímica.

La realización de este procedimiento y la inclusión en parafina de las biopsias de piel se llevaron a cabo en el Laboratorio de Cancerología de la Fundación Instituto Leloir y en el Centro de Investigaciones Oncológicas – FUCA, del Instituto Alexander Fleming, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Se analizaron las biopsias parafinadas de piel de antebrazo de pacientes con diagnóstico de esclerodermia: se efectuaron cortes de 3-5 μm . Los cortes fueron desparafinizados y rehidratados. Se realizó desenmascaramiento en microondas con *buffer* citrato, pH 6,0. Luego, los cortes se colocaron en peróxido de hidrógeno 3% por 5 minutos para inactivar la peroxidasa endógena.

Se realizó un bloqueo con suero normal de caballo por 20 minutos a temperatura ambiente (*Vectastain® Elite ABC Kit; Vector Laboratories, Burlingham, CA*).

Para la detección de las galectinas 1 y 3 los cortes fueron incubados con los anticuerpos monoclonales respectivos por más de 12 horas a 4° C (clones 25C1 y 9C4 respectivamente, *Novocastra® Laboratories Ltd, Newcastle, UK*), en dilución 1:200.

Los vidrios fueron tratados con anticuerpo biotinilado por 30 minutos y luego con un complejo avidina-biotina y se revelaron con el reactivo ABC (*Vectastain®, Vector*).

La determinación de apoptosis en fibroblastos se realizó con un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra la enzima poli ADP-ribosa polimerasa clivada (cPARP) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (*Cell Signaling Technology Inc. Beverly, MA*).

Se efectuaron los correspondientes controles incubando con PBS sustituyendo al primer anticuerpo.

Como control normal fueron utilizados para galectinas-1, -3 y cPARP cortes de una biopsia parafinada de piel normal y como controles positivos: para galectina-1 cortes de cáncer de próstata, para galectina-3 cortes de melanoma dérmico y para cPARP cortes de ganglio linfático con hiperplasia folicular reactiva.

c) Cuantificación.

Los cortes fueron analizados con un microscopio *Olympus® BX-60*, (*Olympus® Microscopes, Tokyo, Japan*). Se leyeron 10 campos a 1000X con inmersión en cada biopsia.

Se realizó el recuento de fibroblastos positivos para galectinas-1 y -3 y c-PARP sobre el recuento total de fibroblastos por vidrio observado.

Los campos de interés fotografiados con una cámara digital *Olympus® DP-71*, (*Olympus®, Tokyo, Japan*), y las imágenes procesadas con *Adobe Photoshop® CS*, *Adobe®*.

d) Análisis estadístico.

Se realizó estadística descriptiva con proporciones expresadas como porcentajes para las variables cualitativas y mediana y rango para las variables cuantitativas.

Se utilizaron métodos no paramétricos y el coeficiente de correlación de Spearman para relacionar variables dependientes e independientes.

Se aplicó el test de comparación de dos proporciones para evaluar diferencias significativas entre dos variables.

Se fijó el límite de significancia en un valor de $p \leq 0,05$.

Para la realización de los cálculos estadísticos se utilizó el programa *Statistica®* versión 6.0.

IV. RESULTADOS.

Se evaluaron diez biopsias de pacientes con diagnóstico de esclerodermia y se realizó una revisión de sus historias clínicas.

La mediana para edad de los pacientes fue de 54,5 años (rango 18-74), de los cuales fueron 9 mujeres y 1 varón.

Respecto del tipo de esclerodermia: 4/10 pacientes tuvieron diagnóstico de esclerodermia difusa (40%), 4/10 esclerodermia limitada (40%), 1/10 síndrome de superposición (10%) todas de sexo femenino y 1/10 enfermedad injerto contra huésped crónica con esclerodermia (10%), de sexo masculino.

El tiempo desde el diagnóstico de la enfermedad al momento del estudio fue de hasta 24 meses en 7/10 pacientes (70%), de 25 a 60 meses en 1/10 pacientes (10%) y de más de 60 meses en 2/10 pacientes (20%). Las características clínicas y humorales de los pacientes estudiados se describen en tabla 2.

En el recuento de total de fibroblastos, se halló un promedio por campo de 13,2 en los pacientes con ESP. En contraste, en el recuento realizado en piel normal, el promedio de fibroblastos contados por campo de 1000x fue de 7,2.

No se halló ninguna correlación significativa entre el promedio del recuento de fibroblastos de pacientes con ESP en cada biopsia y las variables edad, sexo, tiempo de diagnóstico, tipo de ESP, HRCT, DLCO y tratamientos recibidos (correlación de Spearman, $p > 0.05$).

<u>Pac.</u>	<u>Edad</u>	<u>Sexo</u>	<u>Tipo ESP</u>	<u>Tiempo Dx (meses)</u>	<u>HRCT</u>	<u>DLCO</u>	<u>FAN</u>	<u>ACA</u>	<u>ATA</u>	<u>Tratamiento</u>
I	28	Masc	EICH	12	Normal	Normal	Neg	Neg	Neg	GC
II	74	Fem	ED	46	Alveolitis	Severa Disminución	1/80	Neg	Neg	GC + CFM
III	53	Fem	SS	24	Refuerzo intersticial periferico	Leve Disminución	1/80	Neg	Neg	GC + MTX
IV	58	Fem	EL	13	Refuerzo intersticial periferico	NR	Neg	Neg	Neg	-
V	59	Fem	EL	108	Normal	Moderada Disminución	1/80	1/1600	Neg	GC + CFM + D-Pen
VI	18	Fem	ED	1	Normal	Leve Disminución	1/20	Neg	Neg	-
VII	56	Fem	EL	180	Refuerzo intersticial periferico	Normal	1/20	Neg	Neg	GC + D-Pen
VIII	18	Fem	ED	3	Normal	Leve Disminución	1/20	Neg	Neg	GC
IX	18	Fem	ED	9	Normal	Leve Disminución	1/20	Neg	Neg	GC
X	68	Fem	EL	228	Fibrosis	Severa Disminución	1/80	1/1600	Neg	GC + D-Pen

Tabla 2. Características clínicas y humorales de los pacientes con ESP. Abreviaturas: ED: esclerodermia difusa; EL: esclerodermia limitada; SS: síndrome de superposición. HRCT: tomografía computada de alta resolución; DLCO: capacidad pulmonar de difusión de monóxido de carbono; ANA: anticuerpos antinucleares; ACA: anticuerpos anticentromero; ATA: anticuerpos antitopoisomerasa I; GC: glucocorticoides; MTX: metotrexate; D-Pen: D-penicilamina; CFM: ciclofosfamida. NR: no realizado.

	Gal-1%	Gal-3%
I	26.5	44
II	10	93.5
III	6.5	43
IV	16	6.5
V	50.5	71.5
VI	56	91.5
VII	0	41.5
VIII	0	15.5
IX	0	51
X	46.5	95.5
Normal	91	96

Tabla 3. Porcentaje de fibroblastos positivos para galectinas-1 y -3.

	Fibroblastos Gal-1%	Fibroblastos Gal-3%
Edad	0.4556	0.2866
Sexo	0.6262	0.8734
Tipo ESP	0.6252	0.5295
Tiempo DX	0.9337	0.7258
TAC	0.5461	0.9005
DLCO	0.3073	0.0208
TTO	0.5675	0.3755

Tabla 4. Valor de p correspondiente a cada par de variables según el coeficiente de correlación de Spearman.

Los porcentajes de expresión de galectinas -1 y -3 no adoptaron una distribución *gaussiana*. La mediana de la expresión de galectina-1 en el total de las muestras de pacientes con ESP analizadas fue de 13% (rango 0 - 56%). Para galectina-3 la mediana fue de 47,5% (rango de 6,5 - 95,5%) (tabla 3).

En la evaluación de la apoptosis por anti-c-PARP en fibroblastos no se hallaron resultados positivos en ninguna de las muestras analizadas (figura 10).

La proporción de fibroblastos galectina-1 positivos observados por campo de 1000x en la biopsias de pacientes con ESP fue de 0,2772. Esta proporción en la biopsia de piel normal fue de 0,9143. Al aplicar el test estadístico para diferencias entre dos proporciones, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.0000$).

La proporción de fibroblastos galectina-3 positivos observados por campo de 1000x en la biopsias de pacientes con ESP fue de 0,5957. Esta proporción en la biopsia de piel normal fue de 0,9563. Al aplicar el test estadístico para diferencias entre dos proporciones, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.0017$).

En ambas situaciones, se evidenció una disminución global de la expresión de galectinas-1 y -3 en el promedio de fibroblastos de piel esclerodérmica (figura 10).

Hubo una correlación estadísticamente significativa entre el grado de disminución de la capacidad pulmonar de difusión de monóxido de carbono y la expresión de galectina-3 en fibroblastos de pacientes con ESP (pacientes II, V y X), (coeficiente de correlación de Spearman,

$p=0,02$) (gráfico 1). No hubo correlación entre la expresión de galectinas-1 y -3 con las demás variables observadas (tabla 4).

Paciente II: mujer de 74 años de edad que comienza con artralgias en pequeñas articulaciones de manos en noviembre de 2001, acompañadas de fenómeno de Raynaud y esclerodactilia. La paciente es oriunda de Clorinda, Formosa y se dedicaba a la peluquería como oficio, estando en contacto diariamente con lacas para el cabello (policloruro de vinilo), tinturas para el cabello (anilinas), soluciones para rizar el cabello (amoníaco), etc. desde hacía 15 años. Presentaba facies afilada, con surcos periorales acentuados, engrosamiento cutáneo centrípeto y zonas de hiperpigmentación alternadas con otras de hipopigmentación de la piel, “en sal y pimienta”. El diagnóstico histológico de la biopsia de piel fue el de esclerodermia, y clínicamente se la diagnosticó como esclerodermia difusa. En el laboratorio se evidenciaban anticuerpos antinucleares y su laboratorio pulmonar demostró una caída moderada de la capacidad de difusión de monóxido de carbono, que en conjunto con las imágenes de la tomografía computada de tórax con cortes de alta resolución (cada 1 mm) –aumento de la trama intersticio-vascular periférica y en bases de ambos pulmones- dieron lugar al diagnóstico de alveolitis. La paciente recibió tratamiento con esteroides por vía oral en dosis de 20 mg de metilprednisona diarios acompañados por la infusión intravenosa mensual por 6 meses de ciclofosfamida 1g/m² de superficie corporal. Además recibió para el tratamiento de su Raynaud cilostazol 50 a 100 mg diarios y protección gástrica con pantoprazol 40 mg diarios. Al cabo del tratamiento inmunosupresor se observó una discreta mejoría de

los parámetros de difusión pulmonar y una leve mejoría de su compromiso cutáneo. La paciente continúa en seguimiento en la actualidad, estacionaria en su función pulmonar.

Paciente V: mujer de 59 años de edad, ama de casa, con diagnóstico de esclerodermia limitada en 1997, había sido tratada con glucocorticoides y D-penicilamina durante 7 años en dosis de 250 mg diarios, con escasa respuesta cutánea al tratamiento. Al examen físico presentaba facies afilada, telangiectasias faciales y en escote, compromiso cutáneo distal, en manos y fenómeno de Raynaud. En el laboratorio presentaba anticuerpos antinucleares y anticentrómero en títulos elevados. Al momento de ser evaluada, la histología demostró las características propias de la piel esclerodérmica; la paciente mostraba una discreta disnea, por lo que se le realizaron: HRCT, que fue normal, DLCO, que reveló una caída moderada de su capacidad de difusión pulmonar y un ecocardiograma doppler que excluyó hipertensión pulmonar. Se arribó al diagnóstico de alveolitis aguda, por lo que fue tratada con esteroides vía oral en dosis de 60 mg diarios de metilprednisona con descenso paulatino y ciclofosfamida endovenosa mensual, 1 g/m² de superficie corporal durante 6 meses, observándose al cabo del tratamiento una mejoría importante de su función pulmonar (DLCO normal) y de sus síntomas respiratorios. La paciente continúa en seguimiento.

Paciente X: mujer de 68 años de edad, dedicada a tareas de limpieza desde 1969, y que durante su infancia en Tucumán, desde los 4 años, se había dedicado a colaborar en la zafra de caña de azúcar y a la

recolección de rezagos de su procesamiento para la quema, hecha sobre terrenos arcillosos; (en total, el tiempo de exposición a esta tarea fue de 10 años). La paciente tenía diagnóstico clínico de esclerodermia limitada desde 1987. Presentaba anticuerpos antinucleares y anticentrómero en títulos elevados, compromiso esclerodérmico de rostro, manos y antebrazos, respetando el tronco, telangiectasias malares, en puente de nariz, lengua, mucosa yugal, área del escote y palmas. La anatomía patológica de su biopsia cutánea evidenció cambios compatibles con una esclerodermia avanzada. En el estudio de función pulmonar al cabo de diez años de seguimiento, la paciente mostró una severa caída en la capacidad de difusión de monóxido de carbono y en la HRCT una fibrosis pulmonar bilateral. El tratamiento con esteroides en dosis moderadas, de 16 mg diarios de metilprednisona, fue administrado para mejorar sus síntomas pulmonares, y continúa en tratamiento y seguimiento hasta la fecha.

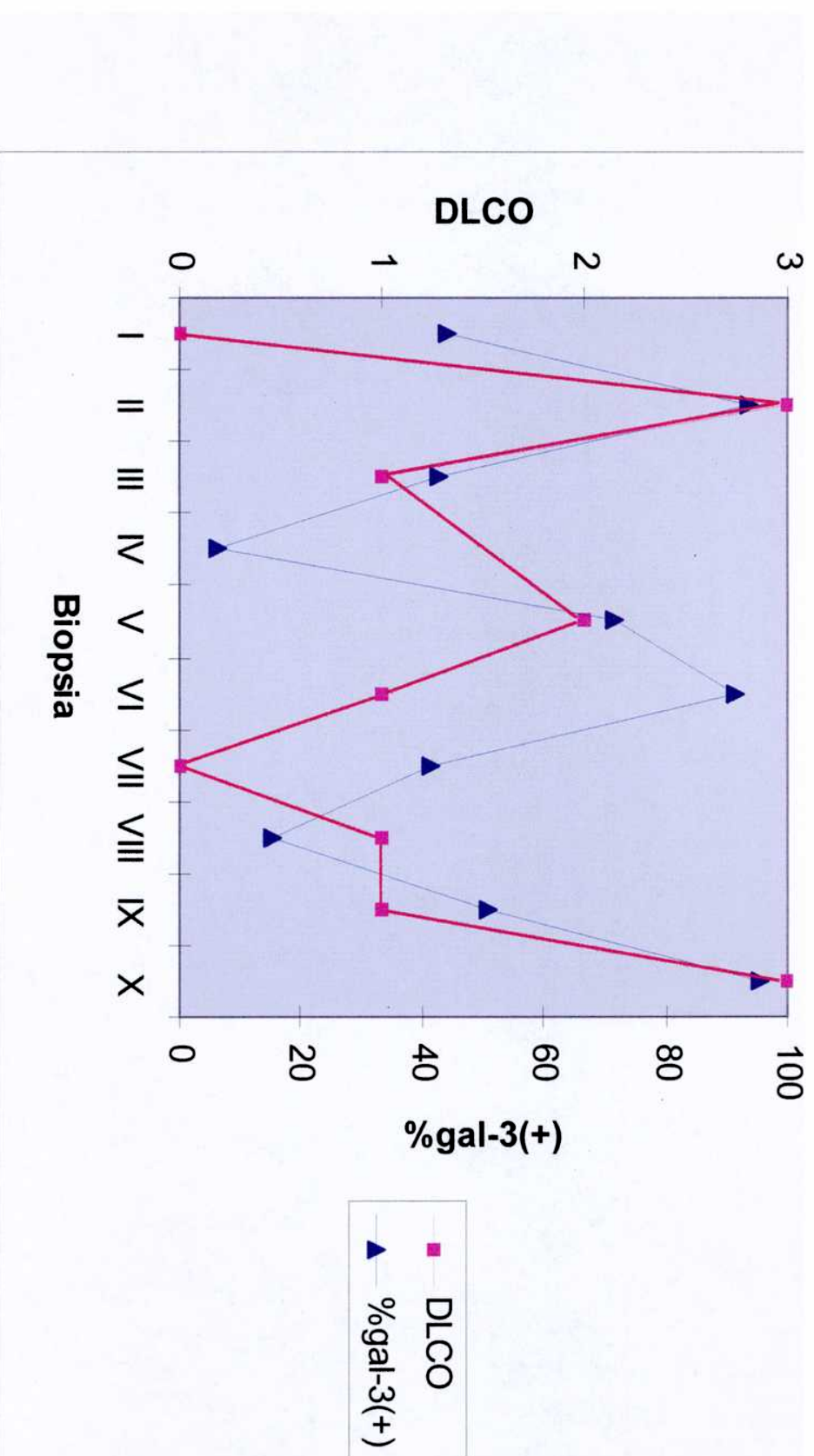


Gráfico 1. Correlación entre DLCO y porcentaje de fibroblastos positivos para galectina-3 (%Gal-3+). Las variaciones en los niveles de expresión de galectina-3 tienen una relación directa con los niveles de DLCO (pacientes II, V y X). Coeficiente de correlación de Spearman, $p=0,0208$. DLCO: 0 = normal; 1 = leve disminución; 2 = moderada disminución; 3 = severa disminución

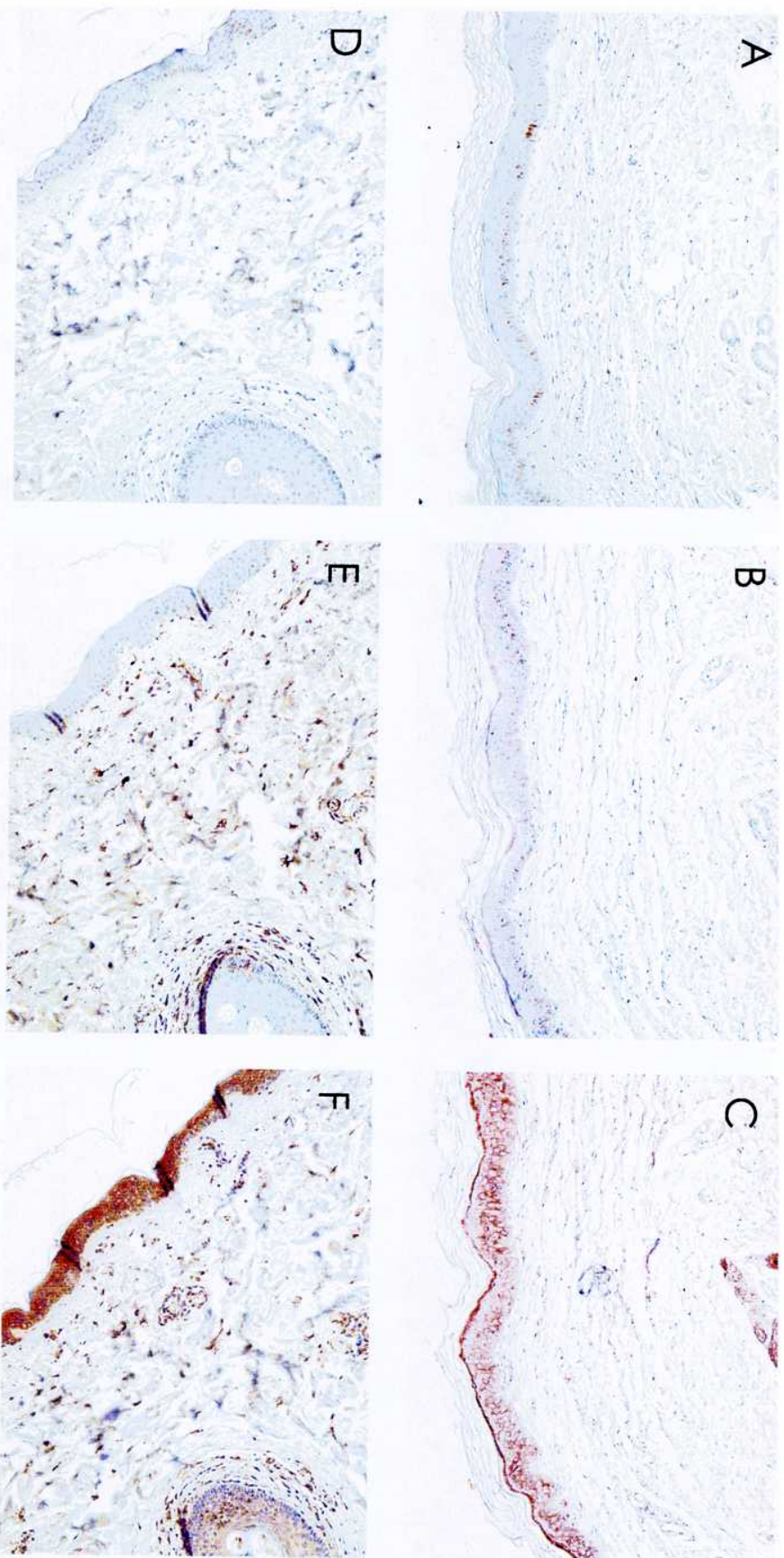


Figura 10. Inmunohistoquímica de piel ESP, piel normal y ganglio linfático.

- **A,B y C.** Biopsia III -ESP-. Se observan fibroblastos con tinción negativa para cPARP, galectina-1 y galectina-3 respectivamente. La epidermis expresa galectina-3 (C) pero no galectina-1 (B).
- **D,E y F.** Biopsia de piel normal. Fibroblastos con tinción negativa para c-PARP, y positiva para galectina-1 y galectina-3 respectivamente. La epidermis de piel normal expresa galectina-3 (F).
- **G.** Biopsia de ganglio linfático con hiperplasia folicular reactiva que evidencia linfocitos

V. DISCUSIÓN.

Aunque es típico que la inflamación preceda al desarrollo de fibrosis, los resultados de estudios sobre varios modelos experimentales sugieren que la fibrosis no siempre se caracteriza por una inflamación persistente, lo que implica que los mecanismos regulatorios en la fibrosis son bastante diferentes de los del proceso inflamatorio. En un modelo de fibrosis hepática inducida por esquistosomiasis, el proceso se desarrolla progresivamente en respuesta al depósito de huevos de esquistosoma en el hígado, lo que lleva a una respuesta granulomatosa crónica (4).

Es probable que los hallazgos de este trabajo estén parcialmente explicados por el hecho de que en la ESP existe una fase inflamatoria inicial muy breve, caracterizada por edema cutáneo e infiltrados de células mononucleares en dermis; posteriormente comienza el proceso de evolución fibrótica de la enfermedad, caracterizada por la alta secreción de citoquinas de tipo Th2, “antiinflamatorias”, particularmente TGF β (36). Si bien no pudo establecerse el *score* clínico cutáneo que tuvieron los pacientes al momento de haber realizado la toma de biopsia de piel, los hallazgos histopatológicos no muestran inflamación ni edema dérmico.

Es llamativo que a pesar de que en la esclerodermia hay una producción incrementada de TGF β , la expresión de galectina-1 en este grupo de biopsias se encontró globalmente disminuida, contrariamente a lo descrito por otros autores en relación con el efecto regulatorio de ésta citoquina sobre la expresión de galectina-1 en modelos tumorales (43-45).

Los estudios llevados a cabo en ratones deficientes en múltiples citoquinas, demostraron que la fibrosis hepática está fuertemente ligada al desarrollo de una respuesta CD4⁺ Th2 (comprometiendo a IL-4, IL-5, IL-13 e IL-21) [46–50]. Los estudios que investigan los patrones de expresión génica de tejidos fibróticos hallaron que los perfiles de expresión de genes inducidos durante respuestas polarizadas Th1 y Th2 son marcadamente diferentes (51-52). Dos grandes grupos de genes fueron identificados en los ratones polarizados en Th1: aquellos asociados con la reacción de fase aguda y la apoptosis, hallazgos que pueden explicar el extenso daño tisular que se observa cuando una respuesta Th1 continúa sostenidamente. En contraste, varios genes comprometidos en el mecanismo de curación normal de heridas y fibrosis están sobrerregulados en animales con respuestas inflamatorias polarizadas en Th2 (51-52).

Las características distintivas de los fibroblastos esclerodérmicos respecto de los fibroblastos normales son su resistencia a la apoptosis inducida por FasL, la transdiferenciación en miofibroblastos inducida por TGFβ y la promoción de la síntesis de matriz extracelular. Esta producción de matriz es consumada por poblaciones específicas de fibroblastos activados, en forma de clones que sintetizan enormes cantidades de colágeno tipo I (42).

La transdiferenciación a miofibroblasto es un evento central en la fibrogénesis y en la cicatrización de órganos. En los primeros estadios del proceso fibrótico esclerodérmico existe un importante influjo de células inflamatorias (macrófagos y linfocitos) que luego es seguido por la proliferación de fibroblastos, su transdiferenciación a miofibroblastos y la

producción acelerada de matriz extracelular. En estadios más avanzados, esta activación tiende a disminuir, y la piel retorna lentamente a sus características premórbidas, aunque no ocurre lo mismo con la fibrosis de órganos internos (42).

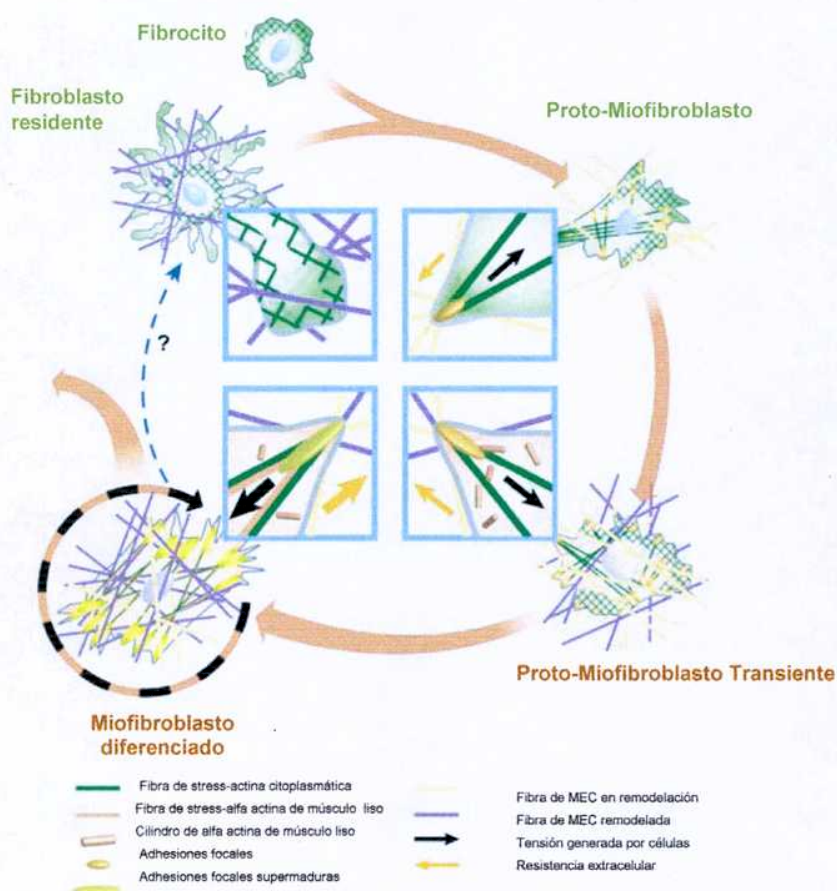


Figura 11. Retroalimentación mecánica en el desarrollo del miofibroblasto. Los fibroblastos en el tejido intacto están protegidos del stress por una matriz extracelular funcional. No desarrollan características contráctiles ni adhesiones célula-matriz. Luego de la injuria, señales inflamatorias activan a los fibroblastos para que se distribuyan en la matriz provisoria de la herida. La actividad celular remodeladora lleva a un incremento gradual en la rigidez global de la matriz, que se contrapone a las fuerzas de tracción celular. La formación resultante de pequeñas adhesiones focales y fibras de stress que contienen actina solamente en su citoplasma caracterizan al proto-miofibroblasto. El TGF β 1 estimula a los proto-miofibroblastos para que expresen alfa actina de músculo liso (α -SMA), la que al principio no se incorpora a las fibras de stress pero se organiza en formaciones cilíndricas. La alineación continuada de fibras en la matriz extracelular crea superficies más extensas para la formación de adhesiones, las que permiten el desarrollo de fibras de stress más resistentes y la generación de mayores fuerzas contráctiles. Cuando los sitios de adhesión crecen hasta el tamaño de adhesiones focales supermaduras, la tensión intracelular alcanza un nivel crítico que permite la incorporación de la α -SMA a las fibras de stress preexistentes. La fuerza generada por una fibra de stress conteniendo α -SMA es significativamente mayor que la de una fibra de stress con actina citoplasmática, que lleva a la supermaduración de adhesiones focales y a la contracción de la matriz extracelular, estableciendo un *loop* mecánico. Los miofibroblastos pueden salir de este ciclo cuando se reconstituye la estructura original de la MEC y retoma nuevamente la carga mecánica. Los miofibroblastos relacionados con fibras de stress eventualmente van a la apoptosis.

Modificado de Hinz, B: *Journal of Investigative Dermatology* 2007; 127: 526–537.

Las galectinas -1 y -3 se expresan normalmente en fibroblastos de piel normal (14-16) y en este grupo de biopsias de pacientes con esclerodermia se evidenció una disminución de la expresión de galectinas 1 y 3 (predominantemente galectina-1) en fibroblastos dérmicos.

La expresión de galectina-3 está sobrerregulada en modelos experimentales de cirrosis hepática (43) y tanto galectina-1 como galectina-3 promueven la proliferación de células estrelladas hepáticas promoviendo el desarrollo de fibrosis hepática en forma autocrina (21).

Las 3 biopsias que mostraron expresión de galectina-3 fueron de 3 pacientes que presentaban compromiso pulmonar fibrótico activo (II y V), ó avanzado (X) caracterizado por una caída de la capacidad de difusión de monóxido de carbono (tablas 2 y 4, gráfico 1.).

El compromiso pulmonar esclerodérmico se caracteriza por una inflamación activa de la membrana alveolo-capilar, que sostenida en el tiempo, lleva a una resolución "por segunda", es decir fibrótica de esa injuria tisular. Durante las fases iniciales de dicho proceso, el perfil de secreción de citoquinas es predominantemente Th1, como TNF α , IFN γ e IL-12 (34-36; 39-40, 42). Algunos estudios describieron un aumento de la expresión de galectina -1 y galectina-3 en el análisis proteómico del lavado bronquioalveolar de pacientes con enfermedades fibróticas pulmonares como esclerodermia, sarcoidosis y fibrosis pulmonar idiopática (23). Extrapolando estos hallazgos, se podría interpretar que estas descripciones justificarían en parte la diferencia en los patrones de expresión de galectina -3 en las biopsias de piel de estos pacientes, en

las que hubo una disminución global de su expresión salvo en los 3 casos con enfermedad pulmonar activa.

Es conocido el efecto biológico de galectina-1 en particular, su capacidad de producir el cambio de una respuesta inflamatoria Th1 a otra de tipo Th2, como ocurre en modelos de artritis experimental (53).

En el tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea juvenil (enfermedad de perfil inmunológico Th1), hay una disminución de la expresión de galectina-1 y un aumento de la expresión de galectina 3, acompañadas de una apoptosis defectuosa de células mononucleares (54).

En un trabajo reciente de Muller y colaboradores, comparando un grupo de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad con perfil Th1) y controles sanos, se pudo identificar una expresión epitelial de galectina-3 similar a la normal en biopsias intestinales de pacientes en remisión, mientras que en los pacientes con inflamación activa había una disminución de la expresión. La expresión constitutiva de galectina-3 en mucosa intestinal ayudaría a evitar respuestas inmunes inapropiadas contra cierto tipo de comensales bacterianos y compuestos alimentarios, y podría ser de importancia en la evaluación de la actividad de la enfermedad (55).

La expresión de galectina-3 en fibroblastos ESP (en las pacientes II, V y X) se correlacionó con mayores caídas en la capacidad pulmonar de difusión de monóxido de carbono, por lo tanto, con mayor compromiso inflamatorio pulmonar. En una cuarta paciente (IX) también hubo expresión de galectina -3, y en este caso, la paciente presentó manifestaciones severas de la enfermedad en los primeros 6 meses de

evolución (acroesclerosis, isquemia digital con cicatrización puntiforme, alveolitis, esclerodermia difusa).

Teniendo en cuenta que en este trabajo se encontró una disminución global de la expresión de galectinas -1 y -3 en fibroblastos de pacientes con ESP, es posible plantear como hipótesis que la expresión de galectina-3 en fibroblastos esclerodérmicos pueda tener relación con la aparición de manifestaciones pulmonares activas –alveolitis, enfermedad intersticial pulmonar- o bien fibrosis, constituyéndose en un potencial marcador predictivo de dichas manifestaciones de la enfermedad.

La expresión de galectina-3 en la inmunohistoquímica de tumores de pulmón (adenocarcinoma y carcinoma epidermoide) y de próstata se comporta como un predictor de progresión y/o recurrencia en forma independiente (19, 56).

En los pacientes con ESP, la fibrosis de la piel va acompañada por fibrosis pulmonar y de otros órganos internos, en forma temprana (dentro de los primeros 2-3 años) en la forma difusa, y en forma tardía (más allá de los 5 años) en la forma limitada. A su vez existe una correlación entre la presencia de anticuerpos antitopoisomerasa I y anticentrómero y el desarrollo de fibrosis pulmonar en la ESP difusa y limitada respectivamente (57-58). La expresión de estos anticuerpos está relacionada con una mayor incidencia de cáncer pulmonar y de otros tipos como mama y estómago (26-27, 58). Dos de las pacientes con expresión de galectina-3 tuvieron altos títulos de anticuerpos anticentrómero y caída de la DLCO (pacientes V y X). Ningún paciente de esta serie presentó hasta la fecha enfermedades tumorales.

En ninguna de las muestras analizadas se pudo comprobar la presencia de apoptosis, confirmando los hallazgos de otros autores (38-39; 59).

VI. CONCLUSIONES.

- La expresión de galectinas-1 y -3 en fibroblastos de piel lesional esclerodérmica fue en promedio inferior a la de la piel normal.
- La disminución de la expresión de galectina-1, con propiedades pro-apoptóticas sobre ciertos tipos celulares, podría tener relación con el microambiente de la matriz extracelular esclerodérmica, rica en citoquinas Th2 como TGF β , que favorecen la transdiferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, con propiedades secretorias más importantes y mayor resistencia a la apoptosis.
- Estos hallazgos se contraponen a los de otros autores en relación con la regulación positiva de la expresión de galectina -1 vía TGF β en modelos tumorales.
- En tres de diez pacientes, la expresión de galectina-3 tuvo una correlación estadísticamente significativa con el mayor grado de compromiso pulmonar activo, evidenciado por una caída en la capacidad pulmonar de difusión de monóxido de carbono.

- Este hallazgo se correlaciona con las descripciones de otros autores acerca del rol de la galectina-3 en la activación de miofibroblastos y producción secundaria de matriz extracelular mediadas por TGF β en enfermedades fibróticas.
- Ninguna de las muestras analizadas mostraron apoptosis de fibroblastos, confirmando los hallazgos de otros autores.
- La expresión de galectina-3 en fibroblastos esclerodérmicos podría constituir un factor predictivo del desarrollo de manifestaciones pulmonares activas en la ESP.

VII. AGRADECIMIENTOS.

- Prof. Dr. José Luis Ciucci, Departamento de Docencia e Investigación del Hospital Militar Central.
- Marcelo Maguna, Servicio de Cirugía, Hospital Militar Central.
- Stella Maris Vidal, Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Militar Central.
- Mariana Rodríguez Zubieta, Laboratorio de Cancerología, Fundación Instituto Leloir.
- Marcela Barrio, Estrella Levy, Erika Von Ew, Michele Bianchini y David Furman, Centro de Investigaciones Oncológicas, Instituto Alexander Fleming.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007; 117:524–529.
2. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:349–363.
3. Friedman SL. Mechanisms of disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1:98–105.
4. Wynn TA. Cellular and Molecular Mechanisms of Fibrosis. *J Pathol* 2008; **214**: 199–210 DOI: 10.1002/path.
5. Meneghin MD, Hogaboam C. Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis. *J Clin Invest* 2007; 117:530–538.
6. Otte JM, Rosenberg IM, Podolsky DK. Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine. *Gastroenterology* 2003;124:1866–1878.

7. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499–511.
8. Coelho AL, Hogaboam CM, Kunkel SL. Chemokines provide the sustained inflammatory bridge between innate and acquired immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:553–560.
9. Rabinovich GA. Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Differ*. 1999;6:711-21.
10. Rabinovich GA, Rubinstein N, Toscano M. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1572:274-84.
11. Rubinstein N, Ilarregui JM, Toscano MA et al. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue Antigens*. 2004;64:1-12.
12. Rabinovich GA, Toscano MA, Ilarregui JM et al. Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: novel regulators of innate and adaptive immune responses. *Glycoconj J*. 2004;19:565-73.

13. Liu FT. Regulatory roles of galectins in the immune response. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005; 136:385–400.
14. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ *et al.* Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 1995; 378:736.
15. Baum LG, Pang M, Perillo NL *et al.* Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J Exp Med* 1995; 181:877.
16. Akimoto Y, Hirabayashi J, Kasai K. Expression of the endogenous 14 kDa beta-galactoside-binding lectin galectin in normal human skin. *Cell tissue Res.* 1995; 280:1-10.
17. Stillman BN, Hsu DK, Pang M *et al.* Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T-cell death. *J Immunol.* 2006; 176: 778-89.
18. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner N *et al.* Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell.* 2004; 241-51.

19. Mathieu A, Saal I, Vuckovic A *et al.* Nuclear galectin-3 expression is an independent predictive factor of recurrence for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Modern Pathology*. 2005; 18:1264-71.
20. Maeda N, Kawada N, Seki S *et al.* Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. *J Biol Chem*. 2003; 278:18938-44.
21. Henderson N, Mackinnon A, Farnworth S *et al.* Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *PNAS*. 2006; 103:5060-5.
22. Cao Z, Said N, Amin S. Galectins-3 and -7, but not Galectin-1, Play a Role in Re-epithelialization of Wounds. *JBC* 2002; 277:42299-305.
23. Rottoli P, Magi B, Perari MG *et al.* Cytokine profile and proteome analysis in bronchoalveolar of patients with sarcoidosis, pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Proteomics*. 2005; 5:1423-30.
24. Chang H, Sneddon J, Alizadeh A *et al.* Gene Expression Signature of Fibroblast Serum Response Predicts Human Cancer

Progression: Similarities between Tumors and Wounds. *Plos Biology*. 2004; 2:206-14.

25. Bouros D, Hatzakis K, Labrakis H *et al*. Association fo malignancy with diseases causing interstitial pulmonary changes. *Chest* 2002; 121:1278-1289.
26. Derk C, Rasheed M, Arlett C *et al*. A cohort study of cancer incidence in systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2006; 33:1113-6.
27. Scope A, Sadetzky S, Sidi Y *et al*. Breast cancer and scleroderma. *Skinmed*. 2006; 5:18-24.
28. van Kempen L, Ruiter D, Goos N *et al*. The tumour microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. *EJCB*. 2003; 82:539-48.
29. Smalley K, Lioni M, Herlyn M. Targeting the stromal fibroblasts: a novel approach to melanoma therapy. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2005; 5:1069-78.
30. Cutroneo K, White S, Chiu J *et al*. Tissue fibrosis and carcinogenesis: divergent or successive pathways dictate multiple molecular therapeutic targets for oligo decoy therapies. *J Cell Biochem*. 2006; 97:1161-74.

31. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature Rev Cancer*. 2006; 6:392-400.

32. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23:403-13.

33. Tan F. Systemic sclerosis: the susceptible host (genetics and environment). In: White B, editor. *Rheum Dis Clin N Am*. Scleroderma. Philadelphia: WB Saunders; 2003. 211-37.

34. Denton CP, Black CM. Scleroderma-clinical and pathological advances. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2004; 18:271-90.

35. Bailey AJ, Black CM. The role of connective tissue in the pathogenesis of scleroderma. In: Jayson MIV, Black CM, editors. *Systemic sclerosis: scleroderma*. New York: John Wiley and Sons; 1988. p. 75-105.

36. LeRoy EC, Smith EA, Kahaleh MB *et al*. A strategy for determining the pathogenesis of systemic sclerosis: is transforming growth factor beta the answer? *Arthritis Rheum*. 1989; 32:817-25.

37. Deuel TF, Kawahara Rs. Growth factors and wound healing. *Annu Rev Med.* 1991; 149:1441-7.
38. Desmouliere A,, Redar M, Darby I *et al.* Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.* 1995;146:56-66.
39. Trojanowska M. What did we learn by studying scleroderma fibroblasts? *Clin Exp Rheumatol.* 2004; 22:S-59-S63.
40. Jelaska A, Korn J. Role of apoptosis and transforming growth factor β 1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43:2230-39.
41. Walsh S, Chen J, Moutsopoulos N. TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege. *Immunol Rev* 2006; 213:213-27.
42. Kissin EY, Korn JH. Fibrosis in scleroderma. In: White B, editor. *Rheum Dis Clin N Am.* Scleroderma. Philadelphia: WB Saunders; 2003. 351-69.
43. Daroqui CM, Ilarregui JM, Rubinstein N, *et al.* Regulation of galectin-1 expression by transforming growth factor β 1 in metastatic mammary adenocarcinoma cells: implicatrons for tumor-immune escape. *Cancer Immunol Immunother* (2007); 56: 491-99.

activation. *J Clin Invest* 2006;**116**(7):2044–2055. Epub: 15 June 2006.

50. Reiman RM, Thompson RW, Feng CG, Hari D, *et al.* Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infect Immun* 2006;**74**(3):1471–1479.
51. Hoffmann KF, McCarty TC, Segal DH, *et al.* Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions. *FASEBJ* 2001;**15**(13):2545–2547.
52. Sandler NG, Mentink-Kane MM, Cheever AW, *et al.* Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. *J Immunol* 2003;**171**(7):3655–3667.
53. G.A. Rabinovich, G. Daly, H. Dreja, *et al.* Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis, *J.Exp. Med.* 1999; 190: 385–397.
54. Harjacek M, De Miguel M, Wolfe H *et al.* Expression of galectins-1 and -3 correlates with defective mononuclear cell apoptosis in patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol.* 2001; 28:1914-22.

- 55.** Muller S, Schaffer T, Flogerzi B *et al.* Galectin-3 Modulates T Cell Activity and Is Reduced in the Inflamed Intestinal Epithelium in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2006 Jul;12(7):588-597.
- 56.** van den Brule F, Waltregny D, Liu F *et al.* Alteration of cytoplasmic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression. *Int J Cancer.* 2000; 89:361-67.
- 57.** Kuwana M, Fujii T, Mimori T *et al.* Enhancement of anti-DNA topoisomerase I autoantibody response after lung cancer in patients with systemic sclerosis. A report of two cases. *Arthritis Rheum.* 1996 Apr;39:686-91.
- 58.** Higuchi M, Horiuchi T, Ishibashi N *et al.* Anticentromere antibody as a risk factor for cancer in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* 2000;19:123-6.
- 59.** Santiago B, Galindo M, Rivero M *et al.* Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2001; 44:1667-76.