



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

HOSPITAL GENERAL “DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ”



Estudio inmunohistoquímico de marcadores inflamatorios y de densidad vascular en úlceras venosas tratadas con compresión e hidrogel con y sin el fitofármaco MTC-2G (Mimosa tenuiflora cortex) en el Servicio de Dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

DERMATOLOGÍA

PRESENTA:

FELIPE VARGAS MARTÍNEZ

Facultad de Medicina



TUTOR::

DRA. MARIA ELISA VEGA MEMIJE

MEXICO, D.F.

2010



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.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Dermatopatología y en la Clínica Interdisciplinaria para el Cuidado Integral de Heridas y Estomas del Servicio de Dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González. Secretaría de Salud por el Dr. Felipe Vargas Martínez con la dirección y supervisión de la Dra. María Elisa Vega Memije y el Dr. José Contreras Ruíz

Este trabajo de Tesis con No. Protocolo 06-27-2010 realizado por el alumno Felipe Vargas Martínez se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dra. María Elisa Vega Memije y la División de Enseñanza e Investigación a cargo del Dr. Octavio Sierra Martínez con fecha del 30 de julio de 2010 para su impresión final.

Dirección de Enseñanza e Investigación

Dr. Octavio Sierra Martínez

Tutor Principal

Dra. María Elisa Vega Memije

Autorizaciones

Dr. Octavio Sierra Martínez
Director de Enseñanza e Investigación
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Luciano Domínguez Soto
Jefe de la División de Dermatología
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dra. María Elisa Vega Memije
Médico adscrito de la División de Dermatología
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

**Estudio inmunohistoquímico de marcadores inflamatorios y de densidad vascular
en úlceras venosas tratadas con compresión e hidrogel con y sin el fitofármaco
MTC-2G (*Mimosa tenuiflora cortex*) en el Servicio de Dermatología del Hospital
General Dr. Manuel Gea González.**

Colaboradores:

Dra. Maria Elisa Vega Memije

Firma: _____

Dr. José Contreras Ruiz

Firma_____

Dr. Adalberto Mosqueda Taylor

Firma_____

Dra. Angélica Rodríguez Carreón

Firma_____

INDICE

Glosario	8
Relación de tablas, gráficas y figuras	10
Resumen	11
Abstract.....	13
Agradecimientos.....	15
Introducción	16
1. Antecedentes.....	16
2. Conocimiento actual de las citocinas involucradas en la fisiopatología y cicatrización de la úlcera venosa.....	26
3. Justificación	30
4. Hipótesis	31

5. Objetivos.....	31
6. Material y Métodos	31
7. Resultados.....	34
8. Discusión	55
9. Conclusiones	58
10. Perspectivas	59
11. Bibliografía.....	59
12. Anexos.....	63

GLOSARIO

Índice tobillo-brazo: Cociente que resulta de dividir la presión arterial del tobillo entre la presión arterial del brazo (medido mediante flujometría doppler) del cual se obtiene un valor numérico adimensional que de resultar > 0.8 y < 1.3 es compatible con úlcera venosa en el contexto clínico adecuado

mmHg milímetros de mercurio

MTC *Mimosa tenuiflora cortex*

MTC-2G Extracto etanólico de *Mimosa tenuiflora cortex*

Fitofármaco: Productos elaborados con material vegetal o algún derivado de este, cuyo ingrediente principal es la parte aérea o subterránea de una planta o extractos y tinturas, así como jugos, resinas, aceites grasos y esenciales, presentados en forma farmacéutica

ITB Índice tobillo brazo

IL-8 Interleucina 8

TNF α Factor de necrosis tumoral alfa

VEGF Factor de crecimiento derivado del endotelio vascular

IL-1 β Interleucina 1 beta

PDGF Factor de crecimiento derivado de plaquetas

IL-2 Interleucina 2

IL-3 Interleucina 3

IL-6 Interleucina 6

TGF- β Factor de Crecimiento Transformante beta

EGF- α Factor de Crecimiento Epidérmico alfa

FGFb Factor de crecimiento de fibroblastos básico

VEGF Factor de crecimiento vascular endotelial

VEGFR-3 Receptor 3 del factor de crecimiento vascular endotelial

CD34 Glucoproteína de superficie expresada en diversos tipos celulares que tiene un papel importante en la interacción célula-célula como molécula de adhesión, tiene expresión positiva en células endoteliales vasculares

D2-40 Sialomucoproteína transmembrana expresada en las células endoteliales de los vasos linfáticos

ELISA Inmunoensayo ligado a enzimas

MMP Metaloproteinasas de matriz

ICAM Molécula de adhesión intracelular

VCAM Molécula de adhesión celular vascular

LFA-1 Antígeno asociado a función leucocitaria tipo 1

VLA-4 Antígeno con activación muy tardía tipo 4

PDGF Factor de crecimiento derivado de plaquetas

GM-CSF Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos Macrófagos

CK Citoqueratinas

MHC Complejo mayor de histocompatibilidad

RELACION DE TABLAS, GRÁFICAS Y FIGURAS

- Tabla 1. Concentrado de valores de grado de inmunotinción
- Tabla 2. Concentrado de valores de topografía de inmunotinción

- Gráfica 1.- Grado de inmunotinción de grupo tratado versus no tratado a tiempo cero
- Gráfica 2.- Topografía de inmunotinción de grupo tratado versus no tratado a tiempo cero
- Gráfica 3.- Grado de inmunotinción de grupo tratado versus no tratado a tiempo ocho semanas
- Gráfica 4.- Topografía de inmunotinción de grupo tratado versus no tratado a tiempo ocho semanas

- Figura 1. Inmunohistoquímica para TGF-beta
- Figura 2. Inmunohistoquímica para EGF-alfa
- Figura 3. Inmunohistoquímica para TNF-alfa
- Figura 4. Inmunohistoquímica para Il-1 β
- Figura 5. Inmunohistoquímica para Il-6
- Figura 6. Inmunohistoquímica para CD34.
- Figura 7. Inmunohistoquímica para D2-40

RESUMEN

Introducción: En el análisis etiopatogénico y fisiopatológico de las úlceras venosas se ha descrito la importancia de los inmunomarcadores Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β), Factor de Crecimiento Epidérmico alfa (EGF- α), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina-1 beta (Il-1 β), Interleucina-6 (Il-6), CD34 y D2-40. El patrón de inmunomarcación de los mismos no se conoce en las en las úlceras venosas tratadas con *Mimosa tenuiflora cortex* (Tepescohuite) fitofármaco que ha demostrado utilidad clínica en el manejo de tales úlceras. **Objetivos:** Describir y comparar el patrón de expresión de los marcadores inmunohistoquímicos TGF- β , EGF- α , TNF- α , Il-1 β , Il-6, CD34 y D2-40 en las úlceras venosas tratadas con el fitofármaco MTC-2G (*Mimosa tenuiflora cortex*) así como en las úlceras tratadas sin tal fitofármaco tanto a tiempo 0 como a las 8 semanas de tratamiento. **Material y métodos:** Estudio observacional, longitudinal y comparativo donde se estudiaron mediante inmunohistoquímica los bloques de parafina de las muestras de piel obtenidas por biopsia con sacabocado del protocolo previo: "Eficacia del fitofármaco *Mimosa tenuiflora cortex* (MTC-2G) en el tratamiento de úlceras venosas en el Departamento de Dermatología Del Hospital General Dr. Manuel Gea González" realizado por Lammoglia L. y colaboradores (año 2008 y 2009). Tales muestras de tejido embebidas en parafina correspondieron a pacientes tratados con gel hidrocoloide con y sin el fitofármaco MTC-2G, tomadas tanto a tiempo cero como a las 8 semanas de iniciado el manejo. Las variables independientes fueron: tratamiento con o sin MTC-2G así como antes (tiempo 0) y después (semana 8) del tratamiento y las dependientes fueron el grado de inmunomarcación para los marcadores comentados. **Resultados:** Se obtuvo marcación por inmunohistoquímica para las proteínas TGF- β , EGF- α , TNF- α , Il-1 β , Il-6, CD34 y D2-40 para cada una de las biopsias de úlceras venosas obtenidas por sacabocado de 4 mm de 19 pacientes tanto a tiempo cero como a las 8 semanas de iniciado el tratamiento con o sin el fitofármaco MTC-2G constituyendo 10 pacientes tratados únicamente con vehículo (hidrogel) y 9 tratados con vehículo más fitofármaco MTC-2G. El grado de inmunotinción se clasificó como Nada=1, leve=2, moderado=3, intenso=4 y se llevó a cabo el análisis de varianza multifactor (ANOVA) con p estadísticamente significativa menor a 0.05. Además se describió la topografía de la inmunoreactividad: Epidermis=1, dermis=2, vasos sanguíneos=3, infiltrado inflamatorio=4, No aplica=5, epidermis mas vasos=6, vasos mas infiltrado=7, epidermis mas vasos mas infiltrado=8, epidermis mas dermis=9, epidermis mas infiltrado=10. Todos los valores

especificados se tradujeron en gráficas comparativas en términos de grado y topografía de inmunotinción tanto a tiempo cero como a las ocho semanas de tratamiento. En el análisis de varianza multifactor (ANOVA) de los datos presentados se encontraron los valores de covariado y para efectos principales así como el valor del promedio y desviación estándar acompañados de sus respectivas gráficas para cada una de las proteínas involucradas. El análisis de varianza ANOVA indicó ausencia de diferencias estadísticamente significativas para TGF-beta, EGF-alfa, TNF-alfa, Il-6 y CD34 entre el grupo tratado y el no tratado tanto a tiempo cero como a las ocho semanas de tratamiento. En el caso de D2-40 se encontraron diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos a tiempo cero pero no fue así a las 8 semanas. Finalmente en el análisis referente a Il-1 β al momento cero se encontraron ambos grupos sin diferencias estadísticamente significativas pero el valor de P de efectos principales demostró significancia estadística. **Discusión y conclusiones:** El estudio de las úlceras venosas en sus diferentes aspectos etiopatogénicos y terapéuticos es muy importante dada la morbilidad individual y general provocadas por este padecimiento. Los aspectos clínicos de la enfermedad están bien caracterizados en términos morfológicos y cronológicos, sin embargo aún conocemos poco acerca de los fenómenos inflamatorios, microbiológicos y bioquímicos subyacentes. En el contexto de la complejidad de la respuesta inmune local y del proceso de cicatrización de las úlceras venosas determinamos mediante inmunomarcación TGF-beta, EGF-alfa, TNF-alfa, Il-1 β , Il-6 así como CD34 y D2-40; estos dos últimos, como medio de inmunomarcaje altamente específico para conocer la densidad vascular y linfática respectivamente en las úlceras venosas tratadas con tepescohuite (MTC-2G) versus las tratadas sin tal fitofármaco. No encontramos diferencia estadísticamente significativa para los inmunomarcadores mencionados tanto a tiempo cero como a las ocho semanas entre el grupo control y el tratado excepto en el caso de Il-1 β la cual se presentó con menor grado de inmunoexpresión en forma significativa estadísticamente en el grupo tratado versus el no tratado. Con este hallazgo identificamos que el tepescohuite puede regular a la baja la concentración local de esta importante citocina pro-inflamatoria y que esta modificación microambiental en la úlcera venosa podría mostrar evidencia de los mecanismos inmunológicos subyacentes a la intervención terapéutica con tepescohuite en los pacientes con úlceras venosas. El estudio del tepescohuite y la definición de su papel como agente terapéutico en las úlceras venosas es importante ya que constituye un agente útil en la práctica clínica, económico y disponible en nuestro medio.

ABSTRACT

Introduction: In the problem about the etiopathogenic and physiopathologic factors in venous ulcers has been described immunomarkers as Transforming Growth Factor-beta (TGF- β), Epidermal Growth Factor (EGF- α), Tumoral Necrosis Factor alfa (TNF- α), Interleukin-1beta (Il-1 β), Interleukin-6 (Il-6), CD34 and D2-40. The pattern of immunomarcation of that molecules in the context of treatment of venous ulcers with tepescohuite (phytopharmaceutic *Mimosa tenuiflora cortex* extract or simply MTC-2G) has not been described yet. **Objectives:** This study is designed to describe and compare immunoexpression pattern of TGF- β , EGF- α , TNF- α , Il-1 β , Il-6, CD34 and D2-40 in the venous ulcers under treatment with and without MTC-2G at time zero and 8 weeks of treatment. **Material and methods:** A longitudinal, observational and comparative study has been designed to analyze by immunomarcation parafine blocks of venous ulcers punch biopsies get in the previous protocol "Clinical efficacy of *Mimosa tenuiflora cortex* (MTC-2G) in the treatment of venous ulcers in the Dermatology Department of General Hospital Dr. Manuel Gea González" (Lammoglia L. et al. 2008 and 2009). Those paraffine embedded tissue correspond to patients whose have been treated with elastic compression band and hidrocoloid gel with and without topical phytoextract MTC-2G. The punch biopsies have been taked at time 0 and at 8 week of treatment. The immunomarcation degree has been denominated as nothing=1, light=2, moderate=3, heavy=4 and also has been described the topography of immunomarcation: sanguineous vessels, inflammatory infiltrate, dermis and epidermis. **Results:** We obtained the immunomarcation by immunohistochemistry (IHC) for the proteins TGF- β , EGF- α , TNF- α , Il-1 β , Il-6, CD34 y D2-40 for each one of the 4 mm punch biopsies of the previous protocol already mentioned being a total of 19 patients (10 without treatment and 9 with treatment). Once we have been asignated numeric values to IHC for each one of the proteins we evaluated by analysis of variance (ANOVA) (with a p less than 0.05 to consider statistical significance) and by this statistical analysis we get no significant statistic differences nor at time zero or 8 weeks of treatment for TGF-beta, EGF-alfa, TNF-alfa, Il-6 and CD34 between treated and no treated groups. Just in the case of D2-40 we found significant statistical differences at time zero but not at 8 weeks of treatment and respect Il-1 we found differences with statistical significance at 8 weeks. **Discussion:** The study of venous ulcers in its different etiopathogenic and therapeutic aspects is very important in virtue of the general and individual morbidity that this problem means in world and local terms. Important clinical aspects of the disease has been well characterized but not those

topics about immunologic and biomolecular events subyacent to venous ulcers. In this growing complexity context we get by immunomarcation the expression degree of TGF-beta, EGF-alfa, TNF-alfa, II-1 β , II-6 and also CD34 and D2-40, the last two as a mean to know the vascular and lymphatic vessel density degree. No one of those proteins shows statistical significance with ANOVA at 8 weeks except II-1 that shows a lesser immunomarcation degree in treatment group versus no treatment group. In basis of this finding we show that the topical application of tepescohuite phytoextract as therapy for venous ulcers maybe plays a role in microambiental immunomodulation that eventually could explain in a scientific basis its real importance in venous ulcers therapeutic armamentarium. The understanding of tepescohuite is especially important as its represent a relatively common used resource in México as a phytopharmaceutic preparation, a country that not only has a big epidemiologic problem cause the venous ulcers but a place where the economic and health care system situation urges to find and understand potential therapies that looks cheap and easy to obtain.

Agradecimientos

A la Dra. María Elisa Vega Memije, Dra. Lorena Lammoglia Ordiales, Dr. José Contreras Ruiz, Dr. Adalberto Mosqueda Taylor, Dr. Armando Herrera, Dr. Oslei Paes de Almeida y su equipo de trabajo en Brasil especialmente a la Dra. Marisol Martínez Martínez y a Bruno Augusto Benevenuto de Andrade. A todos ellos por su apoyo en la realización de esta tesis sin los cuales no hubiera sido posible culminar este trabajo

A mi esposa Nancy e hijo Felipe

Suegros Carmen y Vicente y cuñados MaryCarmen, José y Vicente

A mis padres Felipe y Justina y hermanas Florencia y Aurora

A Florencia y Martín Vargas Acevedo

A Armando Aldana Herrero y María de Jesús Martínez de Aldana

Al Dr. Roberto Arenas Guzmán

A la Dra. Verónica Narváez Rosales

A la Dra. Ivonne Arellano Mendoza

A la Universidad Nacional Autónoma de México

INTRODUCCION

1. ANTECEDENTES

1.1.- Aspectos generales y definición de la úlcera venosa La insuficiencia venosa es la causa principal de la generación de úlceras de miembros inferiores a nivel mundial tanto en hombres como en mujeres. En Estados Unidos se sabe que de los aproximadamente 7 millones de individuos afectados con insuficiencia venosa, aproximadamente medio millón presenta úlceras venosas, lo que genera una carga económica al sistema de salud de aproximadamente 1 billón de dólares al año. No hay cifras precisas acerca de la epidemiología de este problema en nuestro país (1,2). Se define como úlcera venosa a todo aquel defecto de espesor parcial o total en piel, localizado a miembro inferior, que no puede curar espontáneamente y es secundario a la insuficiencia venosa periférica crónica de miembros inferiores. El sitio en el cual se asienta la úlcera venosa puede presentar, dependiendo del paciente y del tiempo de evolución uno o más de los siguientes signos: plexos venosos dilatados, edema, eccema, dermatitis por estasis, pigmentación ocre, lipodermatoesclerosis o atrofia blanca y cicatrices por úlceras venosas previas. La morfología de la úlcera es generalmente superficial, de aspecto cartográfico, con bordes "cortados a pico" y superficie con grado variable de escara (necrosis), membrana de fibrina y tejido de granulación. Los síntomas clínicos que acompañan a la úlcera venosa son dolor, sensación de plenitud o pesantes así como calambres y prurito (1,3). La clasificación de toda úlcera venosa debe ser clínica, etiológica y anatomofisiológica; en este último sentido destaca la determinación del "índice tobillo-brazo" (cociente de presión arterial del tobillo dividido entre la presión arterial del brazo, medido mediante flujometría doppler) del cual se obtiene un valor numérico adimensional que de resultar > 0.8 y < 1.3 es compatible con úlcera venosa en el contexto clínico adecuado. Este "índice tobillo-brazo" se puede determinar a través del uso del esfigmomanómetro y con la palpación de pulsos mediante los pulpejos del explorador y, en aquellos pacientes donde clínicamente no sea posible determinar el pulso arterial mediante palpación se puede recurrir al uso de un dispositivo doppler portátil. Ante todo diagnóstico clínico de úlcera venosa se debe realizar una historia clínica completa y tomar en cuenta factores contribuyentes o confusores tales como índice tabáquico y alcohólico, diabetes *mellitus*, obesidad, insuficiencia arterial periférica, vasculopatía oclusiva secundaria a cualquier causa, cáncer y/o radioterapia en la zona afectada, antecedente de trauma, ingesta de

medicamentos que alteran la cicatrización tal como antiinflamatorios esteroideos, no esteroideos o quimioterapéuticos (1,4).

1.1.1.- Patogénesis de la úlcera venosa.- La patogénesis de la úlcera venosa no ha sido elucidada completamente. La teoría clásica indica que la cascada de eventos inicia con la incapacidad de la musculatura de la pantorrilla para bombear de regreso hacia el corazón la sangre de las extremidades inferiores y ello trae como consecuencia la generación de hipertensión venosa profunda que por principio hidrostático se refleja en el sistema venoso superficial con la consecuente génesis de insuficiencia valvular venosa y con los cambios correspondientes en la arquitectura de la pared vascular y en la estructura de las válvulas venosas en términos de su composición muscular, de colágeno y elastina, que conlleva a un complejo de cambios funcionales y estructurales interdependientes que se reflejan como aumento crónico de la presión hidrostática en los capilares dérmicos de las piernas y eventualmente la producción de una úlcera (4). Los mecanismos microambientales descritos indican que posiblemente esta hipertensión venocapilar lleva al depósito persistente de moléculas de fibrina provenientes del fibrinógeno existente previamente en el torrente circulatorio (teoría de “los manguitos de fibrina”) y que a su vez ello puede llevar a dos grandes situaciones: la primera sería la alteración en la difusión de oxígeno y nutrientes hacia el intersticio en las localizaciones mencionadas y el otro se refiere al atrapamiento de proteínas en tal red de fibrina con la consecuente disminución en la biodisponibilidad de moléculas clave en la fisiología normal de la dermis y epidermis tales como ciertos factores de crecimiento. Otra hipótesis comentada en la literatura sobre la patogénesis de la úlcera venosa tiene que ver con la incapacidad de los fibroblastos dérmicos locales para responder a moléculas estimulantes y por ende el proceso de cicatrización o reparación de los tegumentos en los sitios de hipertensión venocapilar crónica sufre un detenimiento (1,4). Existen varios factores que evitan que la úlcera venosa cicatrice, dentro de ellos destaca el mismo tamaño de la lesión, ya que cuando ésta es grande hay menores probabilidades de curación espontánea. Otros factores son: cronicidad del problema (entre más antigua es la úlcera menos probable es que cierre), existencia de membrana de fibrina en más del 50% de la superficie de la lesión, antecedente de ligadura de venas en el territorio afectado así como cirugía previa con colocación de prótesis de rodilla o cadera. Otras situaciones de mal pronóstico para el cierre de la úlcera venosa son la insuficiencia arterial concomitante, sin embargo para fines

operativos consideramos que en tal contexto se estaría por definición en tal contexto ante una úlcera mixta (con componente arterial y venoso) y no ante una que se pueda calificar como venosa pura (2).

1.2.- Tratamiento de la úlcera venosa 1.2.1.- Tratamiento estándar.- El tratamiento estándar de la úlcera venosa consiste en la eliminación del tejido necrótico mediante un método quirúrgico o no quirúrgico y la colocación de un apósito oclusivo (hidrogel o gasa húmeda en solución salina) y posteriormente vendaje compresivo que genere un gradiente de presión extrínseco que contraresta el vector de hipertensión venocapilar, esto se logra con el vendaje elástico que idealmente proporciona 30 a 40 milímetros de mercurio (mmHg) de presión a la extremidad. Si ello se logra, no importa si se está manejando al enfermo con compresión inelástica (Bota de Unna) o elástica (1,2). En condiciones ideales de tratamiento convencional (apósito y vendaje óptimo) la tasa de curación está en el rango de 70-85% a las 24 semanas (2,4).

1.2.2.- Tratamiento mediante apósitos especiales versus tratamiento convencional .-

A pesar de la gran cantidad de bibliografía existente sobre el tratamiento de las úlceras vasculares en las piernas, sólo poco más de 30 de artículos publicados en la literatura internacional hasta noviembre de 2001 representaban investigación estructurada como ensayo clínico aleatorizado: 22 estudios evaluaron el uso de apósitos especiales (fabricados con hidrocóide, dextranómero, poliuretano o colágeno) frente a tratamiento convencional (uso de gasa impregnada en solución salina) y 13 compararon diferentes apósitos especiales entre sí. Cuatro artículos proporcionan datos sobre los costos del tratamiento. A grandes rasgos, los estudios comparativos han mostrado eficacia similar sobre las variables de curación entre los apósitos especiales y los apósitos convencionales. Al compararse los apósitos especiales entre sí no se ha demostrado la presencia de diferencias estadísticamente significativas en los parámetros clínicos que definen la potencial mayor utilidad de un apósito u otro (4).

1.2.3.- Tratamiento de las úlceras venosas con *Mimosa tenuiflora cortex*.- 1.2.3.1.-

Aspectos generales y farmacología de *Mimosa tenuiflora cortex*.- La corteza del árbol *Mimosa tenuiflora* llamado popularmente "tepescohuite", se utiliza en México para curar y facilitar la cicatrización de las quemaduras y heridas de la piel. El uso medicinal de esta especie vegetal despertó el interés comercial y médico a partir de que fue utilizada para tratar con aparente éxito a un gran número de personas con quemaduras que produjo la explosión de la estación de gas ubicada en San Juan Ixhuatepec en el

Estado de México en 1984. En esa ocasión, las personas lesionadas recibieron tratamiento usando la corteza seca y pulverizada, aplicada directamente sobre la piel y los medios de comunicación masiva dieron a conocer el efecto notablemente benéfico que produjo este tratamiento en la cicatrización de las quemaduras de primero y segundo grado. Estas observaciones médicas estimularon el interés por conocer, mediante una serie de estudios científicos, las propiedades medicinales de la especie vegetal. De acuerdo con los estudios químicos relativos a la composición de la corteza de *M. tenuiflora* se ha identificado que contiene un grupo de alcaloides, principalmente, la N,N-dimetiltriptamina presente en un 0.003% y varios de sus derivados; además, contiene serotonina en un 0.001%. Otros estudios fitoquímicos reportaron la presencia en la misma corteza de un grupo de saponinas: glucósidos triterpenoides (mimonósidos A y B), y el triterpenoide (mimonósido C), además de tres saponinas esteroideas (3-*O*- β -D-glucopiranosil campesterol, 3-*O*- β -D-glucopiranosil estigmasterol, 3-*O*- β -D-glucopiranosil β -sitosterol) junto con concentraciones traza de glucosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, lupeol y una gran cantidad de taninos condensados. Por otra parte, se ha analizado el hecho de que la corteza de *Mimosa tenuiflora*, al igual que la de otras plantas del mismo género, contenga dimetiltriptamina (DMT), producto con efectos indeseables sobre el sistema nervioso central. Se asume que la concentración de DMT en los pulverizados y extractos es sumamente baja para producir estos efectos mediante su aplicación tópica (5).

1.2.3.2.- Datos farmacológicos de *Mimosa tenuiflora cortex*.- Existe el fitofármaco MTC-2G, el cual está elaborado con el extracto etanólico de *Mimosa tenuiflora cortex*. La presentación farmacéutica del fitofármaco es en forma de gel estandarizado de acuerdo a su contenido en mimonósidos A y B (1.0 y 0.5 mg/g respectivamente) compuestos a los cuáles se consideran responsables de la regeneración celular. La concentración de los principios activos presentes en el fitofármaco, es igual a la que se encuentra en los preparados empleados por la medicina tradicional. La metodología empleada para este propósito consiste en macerar la corteza en metanol durante 24 hrs.; evaporación del extracto a sequedad bajo presión reducida; disolución del residuo en agua y obtención de la fracción saponínica por partición en butanol; concentración del extracto bajo presión reducida en metanol y precipitación de saponinas con éter etílico. Separación de los mimonósidos del precipitado en columna "Lichrospher 100" de fase reversa con un sistema isocrático de agua-acetonitrilo; la cuantificación de los

mimonósidos se realiza por el método de estándares externos. El contenido en mimonósidos totales varía entre 0.05-0.1 %. El gel se elabora, a partir del extracto estandarizado de *Mimosa tenuiflora*, en una compañía farmacéutica privada, en condiciones estériles y con diferentes controles de calidad que exigen ausencia de patógenos y elementos contaminantes. Se envasa en frascos cilíndricos de plástico, que contienen 20 gr cada uno. Formulación: cada 100 gr. de gel contienen carbopol 940 (0.75 gr.), trietanolamina (0.85 gr.), extracto de *M. tenuiflora* (5 gr.), etanol (10 gr.), propilen glicol (16.5 gr.), metilparabeno (0.05 gr.), vehículo c.b.p. (100 gr.). El tratamiento control (hidrogel) se elabora y envasa en forma idéntica al anterior, pero sin el extracto vegetal. Los estudios farmacológicos han estado dirigidos hacia la dilucidación de las propiedades antibióticas y cicatrizantes de los productos del tepescohuite. Sobre las propiedades antibióticas de los extractos etanólicos y acuosos elaborados con la corteza pulverizada se realizaron observaciones en cultivos de microorganismos que se encuentran habitualmente en el tejido cutáneo y que son potencialmente patógenos: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*. Para la prueba sobre dermatofitos se empleó: *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* y *Microsporum gypseum*. Los resultados indican que los extractos inhibieron el crecimiento de todos los microorganismos comentados. En México, se realizaron ensayos *in vitro* sobre el efecto de los extractos sobre la proliferación celular utilizándose dos líneas celulares humanas y evaluándose la modificación en el crecimiento de fibroblastos embriogénicos normales (W138) y de células KB de carcinoma nasofaríngeo. El extracto butanólico y el de acetato de etilo inhibieron el crecimiento de estos cultivos mientras que el extracto de éter de petróleo y el metanólico incrementaron significativamente la proliferación de las células. En Francia se llevaron a cabo los estudios con los mimonósidos y las saponinas esteroideas aislados de la corteza, sometiéndolos a pruebas biológicas de toxicidad, inmunomodulación y proliferación celular *in vitro* utilizando diferentes líneas celulares animales y humanas. Todos estos trabajos permitieron concluir que los mimonósidos son los responsables del efecto inductor de la proliferación celular observado en los extractos y otros productos a base de tepescohuite usados para curar quemaduras y heridas de la piel. Recientemente se evaluó el efecto de los mimonósidos A, B y C sobre el crecimiento de timocitos y esplenocitos en células de ratón midiendo la

incorporación al DNA de (3H)timidina(3H-TdR). Los resultados mostraron que los mimonósidos provocan un incremento significativo de la incorporación de 3H-TdR en los timocitos, en comparación con las células control. Este efecto fue igualmente positivo, pero menor en los esplenocitos. Se estudió también la influencia de los tres mimonósidos sobre los linfocitos activados con mitógenos o aloantígenos para medir su capacidad inmuno-estimulante observándose que poseen un efecto sinérgico sobre los timocitos y los liposacáridos en la activación de los esplenocitos. A partir de esta serie de trabajos se planteó la posibilidad de que las saponinas triterpénicas (mimonósidos) podrían inducir un efecto inmunoestimulante (5).

1.2.3.3.- Antecedentes del uso de *Mimosa tenuiflora cortex* como fitofármaco en el tratamiento de las úlceras venosas.- En cuanto a los estudios acerca del uso del tepescohuite en el manejo de heridas existe la investigación llevada a cabo por Palacios y colaboradores quienes indujeron quemaduras químicas en conejos para valorar los efectos procicatrizantes y antimicrobianos del tepescohuite comparando con mupirocina al 2% y solución salina isotónica. En este estudio los autores no encontraron diferencia significativa entre los tres grupos ni para el efecto procicatrizante ni para el efecto antimicrobiano. Los autores desaconsejan el uso del tepescohuite argumentando hepatotoxicidad sin haberla evaluado. En dicho estudio no reportan efectos colaterales clínicos en ninguno de los conejos. Cabe señalar que el conejo es un pobre modelo experimental para evaluar cicatrización. Los resultados del estudio previo contrastan con el estudio de Rivera y colaboradores realizado en pacientes con úlceras venosas donde utilizaron un hidrogel con extracto de tepescohuite que contenía 1mg/g. En este estudio compararon dos grupos de 20 pacientes. Al primer grupo se le aplicó hidrogel sin principio activo y al segundo hidrogel con tepescohuite. Encontraron que después de 12 semanas el 100% del grupo con tepescohuite había cicatrizado y solo 1 paciente del grupo control había mejorado ($p=0.0001$). En este estudio no se encontraron efectos colaterales de ningún tipo ni alteraciones en los exámenes de laboratorio (5). El estudio más reciente y de mayor rigor metodológico sobre el estudio del tratamiento de las úlceras venosas con tepescohuite es el realizado por Lammoglia y colaboradores quienes llevaron a cabo un estudio prospectivo, aleatorizado y doble ciego que comparó el uso del extracto de *Mimosa tenuiflora cortex* en gel versus el vehículo de la sustancia activa (hidrogel) en úlceras venosas. Este estudio incluyó a todos los pacientes con úlceras exclusivamente venosas que se presentaran a la Clínica de Heridas del Departamento de Dermatología

del Hospital General Dr. Manuel Gea González y a quienes se les realizaron exámenes de laboratorio y biopsias de piel del borde de la úlcera iniciales y finales, iconografía y curación semanal. El paciente fue instruido para curación diaria y aplicación del medicamento con posterior vendaje compresivo. Se incluyeron 41 pacientes, 22 pacientes recibieron el fitofármaco MTC-2G y 19 pacientes en el grupo control con hidrogel. Completaron el estudio 32 pacientes, 18 en el grupo experimental y 14 en el de hidrogel, fueron 19 mujeres y 13 hombres, la media de edad fue de 60.56 años y el tiempo de evolución medio de la úlcera fue de 38 meses. La media de reducción de MTC-2G fue de 6.29 cm² (IC95% 3.28-9.29) ($p=0.0001$) mientras que en el grupo de hidrogel la media fue de 5.85cm² (IC 95% 3.58-8.12) ($p=0.001$), no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.815$) entre ambos grupos. Cuando se agruparon los pacientes de ambos grupos según el tamaño de la úlcera en $\leq 10\text{cm}^2$ y $\geq 10\text{cm}^2$ no hubo entre los grupos diferencias significativas ($p=0.42$). Tampoco se encontraron diferencias en la evaluación clínica o en los resultados de la histopatología. El MTC-2G fue seguro y tolerado. De ese estudio se concluye que el MTC-2G no fue superior al hidrogel sin el extracto en el tratamiento de úlceras venosas de miembros pélvicos, sin embargo, en el grupo de pacientes con este tratamiento fue útil para favorecer la cicatrización en úlceras venosas, la granulación y formación de islas de epitelio, en la histopatología se mostró reducción en la necrosis y en la intensidad del infiltrado inflamatorio (5).

1.4.- Antecedentes del estudio en la concentración local de citocinas en las úlceras venosas tratadas con el fitofármaco MTC-2G (*Mimosa tenuiflora cortex*).

No se han descrito las citocinas presentes en las úlceras venosas tratadas con *Mimosa tenuiflora cortex*.

1.5.- A continuación se describen las características generales de los marcadores inmunohistoquímicos que se usaron en este trabajo:

- Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β): Citocina involucrada en la reparación tisular. Esta molécula es producida y secretada por plaquetas, macrófagos, linfocitos y también por células cebadas. Tiene como células blanco los monocitos, macrófagos activados, células epiteliales, endoteliales, linfoides, de estirpe hematopoyética así como linfocitos B proliferantes. Las acciones consecuentes de la unión a su receptor son: quimioatracción, inducción de la producción de interleucina-1, inhibición de la proliferación de células epiteliales, endoteliales, de estirpe linfoide y hematopoyética así como activación de

osteoclastos. Además de lo mencionado induce el cambio de isotipo de inmunoglobulinas hacia IgA (6,7).

- Factor de Crecimiento Epidérmico alfa (EGF- α): Factor de crecimiento involucrado en la reparación tisular y cicatrización. Es producido principalmente por plaquetas y macrófagos y tiene la función de ser mitogénico para los queratinocitos y fibroblastos, estimula la migración queratinocitaria y la formación de tejido de granulación (8).
- Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α): Citocina proinflamatoria sintetizada como precursor de 26 kilodaltones (kDa) ligado a la membrana plasmática y que posteriormente es lisado para conformar con un peso de 17 kDa en un polipéptido activo biológicamente en términos de activación, proliferación y apoptosis celular, siendo cada uno de estos efectos un fenómeno dependiente de la ubicación y concentración de la interleucina. El TNF α estimula *in vitro* la proliferación de los fibroblastos dérmicos y la expresión de moléculas de adhesión celular en los queratinocitos (9).
- Interleucina-1 beta (IL-1 β): Citocina secretada por los monocitos, macrófagos, linfocitos B, células dendríticas y células endoteliales. Las células blanco en las cuales va a ejercer su acción son los linfocitos T auxiliares, linfocitos B, células asesinas naturales, células endoteliales vasculares, macrófagos, neutrófilos, hepatocitos y neuronas hipotalámicas. Las acciones mejor caracterizadas son la activación proinflamatoria de las células blanco, maduración y expansión clonal, potenciación en la actividad de las células efectoras del sistema inmunológico así como en la expresión de moléculas de adhesión celular. Otros efectos de la IL-1 son la inducción de la síntesis de las proteínas o “reactantes” de fase aguda y la inducción de fiebre (pirogenicidad) (6).
- Interleucina-6 (IL-6): Esta citocina es secretada por monocitos, macrófagos, linfocitos T auxiliares tipo 2 así como por las células del estroma de la médula ósea, tiene como blanco los linfocitos B proliferantes, células plasmáticas, células de estirpe mieloide así como hepatocitos. Las acciones biológicas demostradas para IL-6 son: promoción de la diferenciación de las células plasmáticas,

estimulación de la secreción de anticuerpos, diferenciación de células de estirpe mieloide e inducción de síntesis de proteínas de fase aguda (6).

- CD34: Glucoproteína de superficie expresada en diversos tipos celulares que tiene un papel importante en la interacción célula-célula como molécula de adhesión. Tiene una función clave en la relación de las células madre hematopoyéticas con el estroma de la médula ósea. CD34 es expresada en forma constante por las células endoteliales vasculares pero no en las presentes en los endotelios linfáticos. Este CD34 de hecho forma parte de un grupo de proteínas integrales de membrana (con sólo un dominio transmembrana) llamado "proteínas de sialomucina" que se expresan de manera constante en las células de estirpe hematopoyética y vascular endotelial (12). CD34 también guía y adhiere a los linfocitos T para que puedan ingresar a los ganglios linfáticos (13,14). Las células que normalmente expresan CD34 se localizan en cordón umbilical, médula ósea, células hematopoyéticas, células endoteliales (indiferenciadas y diferenciadas) y células cebadas o mastocitos. También se expresa en tumores: *dermatofibrosarcoma protuberans*, tumor gastrointestinal del estroma (GIST, por las siglas en inglés) y tumor maligno de la vaina nerviosa periférica. Cabe enfatizar que CD34 no se expresa en vasos linfáticos. CD34 puede ser positivo en células dendríticas Factor XIII negativas que existen embebidas en la dermis en relación microestructural con los anexos cutáneos. Células CD34+ pueden ser aisladas del torrente circulatorio y del aspirado de médula ósea mediante centrifugación y métodos inmunológicos tales como la inmunofluorescencia. Los anticuerpos antiCD34 son usados para aislar y purificar las células madre progenitoras hematopoyéticas en protocolos de investigación básica y clínica (incluyendo protocolos de trasplante de médula ósea). Otros tumores o procesos hematooncológicos que son capaces de expresar CD34 son: sarcoma alveolar de partes blandas, leucemia linfoblástica aguda pre-B, leucemia aguda mieloide, fibroblastoma de células gigantes, sarcoma granulocítico, sarcoma de Kaposi, liposarcoma, histiocitoma fibroso maligno, hemangiopericitoma meníngeo, meningioma, neurofibroma, schwannoma y carcinoma papilar de tiroides. Cuando el inmunomarcaje para CD34 es negativo también aporta datos de diagnóstico oncológico útiles en el sentido de descartar tumores como el sarcoma de Ewing, tumor

neuroectodérmico primitivo, miofibrosarcoma de mama así como tumor miofibroblástico inflamatorio del estómago (12,13,14). Se ha encontrado expresividad aumentada de CD34 carcinoma de células escamosas de cavidad oral en el así llamado patrón “penetrante” comparado de hecho con el patrón “circunscrito” el previo se asocia a menor tasa de supervivencia y a mayor presencia de enfermedad metastásica en ganglios linfáticos; respecto este hallazgo, se discute nuevamente el uso de CD34 como marcador de angiogénesis en el estudio de la patogénesis tumoral (15). Otro estudio donde se ha demostrado la utilidad de CD34 como marcador de vascularidad tisular es el llevado a cabo por Soares y cols. quienes estudiaron la densidad vascular y linfática (mediante CD34 y D2-40 respectivamente) en bloques de parafina de biopsias de adenomas pleomorfos (primario y recurrente) de glándulas salivales; al comparar el grado de vascularidad entre el adenoma pleomorfo primario versus el recurrente no encontraron diferencia estadística significativa, sin embargo, al estudiar en una misma biopsia las zonas de tumor ricas en células versus las pobremente celulares se encontró que tanto CD34 como D2-40 fueron mayormente concentrados en las zonas tumorales ricas en células con lo que se demostró grado variable de densidad vascular entre una zona u otra del tumor medida a través de éste método (16)

- D2-40: También llamada “Podoplanina humana”, es una sialomucoproteína transmembrana de 40 000 daltones expresada en las células endoteliales de los vasos linfáticos y no en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (17). Desde su descubrimiento, la proteína D2-40 ha sido descrita mediante su inmunexpresión en una variedad de neoplasias vasculares incluyendo linfangioma, sarcoma de Kaposi (donde se ha demostrado mediante este marcador que es una neoplasia con diferenciación linfática más que endotelial vascular), hemangioendotelioma, mesotelioma epiteliode, seminoma y hemangioblastoma. Se ha reportado la inmunexpresión de D2-40 en tumores corticales suprarrenales, schwannomas y en adenoma pleomorfo de glándulas salivales primario y recurrente. Existe expresión importante de este marcador en las yemas de los folículos pilosos de la piel de fetos humanos alrededor de las

20 semanas de gestación, sugiriéndose su potencial papel en la embriogénesis de los anexos cutáneos (14,17,18,19,20).

2- Conocimiento actual de las citocinas involucradas en la fisiopatología y cicatrización de la úlcera venosa.-

En el análisis inmunohistoquímico de las úlceras venosas se han identificado citocinas, proteasas, moléculas de adhesión celular, inhibidores de proteasas, marcadores de senescencia celular y moléculas relacionadas con el estrés oxidativo. Algunos de estas moléculas se han detectado a partir de exudado de las úlceras venosas analizado mediante ELISA (21). Dada la hipoxia, alteración nutricia local e inestabilidad estructural del colágeno existe aumento en la actividad y concentración de las metaloproteinasas de matriz 1 y 2 (MMP-1 y -2) así como en los niveles locales de citocinas fibrogénicas y angiogénicas, específicamente FGFb y VEGF (22,23) así como de las citocinas proinflamatorias Il-1, Il-6 y TNF- α , que llevan a un *status* inflamatorio persistente (23,24,25). Se sabe que Il-6 interviene en el proceso de cicatrización para que puedan llevarse a cabo la quimiotaxis leucocitaria, la angiogénesis y la síntesis de colágeno, de hecho, Il-6 regula positivamente las concentraciones de otras citocinas tales como Il-1, TGF- β y VEGF, fundamentales en la reparación tisular y en la generación del tejido de granulación (23). Se ha encontrado mediante inmunohistoquímica que la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1) (ambas expresadas en el endotelio de los vasos de sitios de piel con insuficiencia venosa) se encuentran elevados con respecto la piel normal, asimismo la expresión de antígeno asociado a función leucocitaria tipo 1 (LFA-1) y antígeno con activación muy tardía tipo 4 (VLA-4) (ambos proteínas expresadas en leucocitos en piel de pacientes con insuficiencia venosa crónica). Dados estos hallazgos es claro inferir que la piel con insuficiencia venosa presenta un alto grado de adhesión y extravasación leucocitaria, que contribuyen al ya mencionado *status* inflamatorio persistente (21,26). Está demostrado que el VEGF regula positivamente y desde los primeros días a partir del daño tisular, la angiogénesis y la generación de tejido de granulación (10,11) incluyendo también acción en úlceras crónicas, la cual está al menos parcialmente regulada por mecanismo de receptor soluble a través del así caracterizado receptor VEGFR-1. De hecho se sabe que la concentración de éste último marcador, medido mediante ELISA en el

fluido de úlceras venosas es directamente proporcional a la cronicidad de la úlcera y ello se debe a la menor biodisponibilidad del VEGF; surgiendo por consecuencia, la hipótesis de que al menos parcialmente, la fisiopatología de la úlcera crónica, incluyendo la venosa, tiene como fenómeno patogénico importante, el desequilibrio entre la concentración local de VEGF versus sus receptores solubles. Por otro lado, la expresión de receptores de superficie para VEGF (tal como VEGFR-3) traduce la medición directa de la actividad de VEGF en un sustrato histológico determinado (8,27). Al comparar la inmunohistoquímica de 21 pacientes con úlcera venosa versus piel sana de 9 voluntarios se encontró que hubo diferencia estadísticamente significativa para las concentraciones de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y para factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) existentes ambos en el citoplasma de los queratinocitos del borde de las úlceras (21). Al determinarse mediante ELISA el nivel de citocinas pro-inflamatorias en 30 piernas con úlcera venosa, tanto a tiempo cero (pre-tratamiento) y después de 4 semanas de manejo con vendaje compresivo se encontró que, comparado con tejido sano perilesional, los pacientes presentaron concentraciones elevadas de Factor de Crecimiento Tumoral tipo 1 (TGF-1), Interleucina 1 alfa (Il-1 alfa), Interleucina 1 beta (Il-1 beta), Receptor alfa de Interleucina 1 (Il-1Ra), Interferón gamma (IFN- γ), Interleucina 12 p40 (Il-12p40) y de Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos Macrófagos (GM-CSF) y respecto la variación en la concentración de tales proteínas ante el tratamiento se encontró que Il-1Ra disminuye con la terapia compresiva así como también lo hacen los niveles de IFN- γ aunque no sucedió lo mismo con el resto de las citocinas (24). En otro estudio se analizó con ELISA el trasudado de úlceras venosas en 80 pacientes para determinar a tiempo cero y a las 5 semanas las variaciones en la concentración de las siguientes moléculas ante tratamiento compresivo y versus apósito convencional: Il-1 β , Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), Metaloproteinasas de Matriz 2 y 9 (MMP-2,MMP-9), Factor de Crecimiento Fibroblástico básico (bFGF), Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) y Factor beta de Transformación del Crecimiento (TGF- β) y se determinó que no hubo variación estadísticamente significativa para ninguna de las proteínas mencionadas excepto para bFGF cuya concentración varió proporcionalmente con los diámetros de la herida (acción o actividad fibroblástica y/o angiogénica) y para TGF- β (acción fibrogénica) cuya concentración varió en

forma inversamente proporcional a los diámetros de la herida (25). En otro protocolo se determinó con ELISA y en el suero de 8 pacientes (cada uno con una úlcera venosa) los niveles de VEGF y de TNF α al inicio y durante la terapia compresiva, encontrándose que las concentraciones de ambas moléculas variaron directamente proporcionalmente al diámetro de la úlcera (28). Respecto al GM-CSF y su papel en la fisiopatología de las úlceras venosas, partiremos de un estudio donde se encontró que al administrarse intradérmicamente este factor a pacientes con úlceras venosas de difícil curación, las concentraciones de VEGF en la herida aumentaron a los 5 días de inicio del tratamiento y las de Factor de Crecimiento Derivado de Placenta (PDGF) disminuyeron, estas últimas moléculas detectadas con técnica de hibridación *in situ*. Este estudio demuestra el papel de las complejas interrelaciones funcionales de las diferentes citocinas involucradas en la patogénesis de la úlcera venosa y se discute que el resultado clínico de la alteración en tal balance puede o no mejorar las condiciones locales de la úlcera (29). Destaca también una investigación llevada a cabo en 12 pacientes con úlceras por pie diabético y que estudió también a 10 pacientes que presentaban úlcera varicosa en pantorrilla y en tal estudio se determinó con inmunohistoquímica la concentración de las moléculas regulatorias del ciclo celular p63, CD29, PCNA, p53, bcl-2, bax, caspasa-3 y también se analizó la concentración de queratinas 10, 16 y 17. Se comparó con piel topográficamente similar (pacientes control) y se concluyó que los queratinocitos del borde de todas las úlceras fueron CK10 negativos, CK 16 y 17+, p63+, CD29+, PCNA+ y p53 negativos y que la intensidad de inmunomarcación para CD29 y p63 fue ligeramente mayor que en el grupo control. La intensidad de bcl-2 fue mayor en el borde de úlceras venosas que en el de úlceras por pie diabético; en este estudio comparativo se concluyó que los resultados no arrojaron diferencias estadísticamente significativas y se discutió que entonces probablemente las moléculas involucradas en el ciclo celular correspondientes a proliferación, diferenciación y apoptosis de las células epidérmicas no juegan un papel clave en la patogénesis de la úlcera venosa y se explica que posiblemente sean entonces las citocinas involucradas en la génesis de tejido de granulación (VEGF, FGFb, TGF β) las que eventualmente tengan mayor importancia respecto las biomoléculas involucradas en la proliferación queratinocitaria (30). Importante es en la fisiopatología de la úlcera venosa el FGFb, poderoso estímulo soluble angiogénico

presente en la herida desde las primeras horas posteriores al daño tisular, donde potencia la actividad de VEGF que será fundamental en las etapas mediatas y tardías de la angiogénesis local (10,31). Está bien caracterizado que diversas citocinas proinflamatorias incluyendo TNF α están involucrados en la cronicidad de las úlceras venosas y que al comparar con inmunohistoquímica para tal molécula la piel sana versus el lecho de la úlcera venosa se encuentra que las concentraciones de TNF α en el tejido de la úlcera se encuentran con elevación significativa estadísticamente. Las úlceras que no curan, definidas para este estudio como aquellas con un tiempo de evolución mayor a 6 meses y más de 5 cm² de área, tienen también mayores concentraciones de TNF α , interleucina-1 y diversas proteasas (9). Cuando se han determinado mediante ELISA las concentraciones de TNF α en el fluido trasudado de las úlceras venosas se ha encontrado que existe un aumento importante en las concentraciones de esta molécula en el líquido trasudado y especialmente en aquellas lesiones que a lo largo de las semanas no mostraban signos de cicatrización respecto las que sí los tenían. Lo mismo ocurre para los receptores solubles de TNF α p55 y 75. Respecto el aumento en la inmunoreactividad para los receptores de TNF α en úlceras venosas se cree que posiblemente este mecanismo busca disminuir la biodisponibilidad de la biomolécula y que este fenómeno estequiométrico-regulador no siempre es suficiente para contrarrestar el carácter deletéreo de TNF α en el status inflamatorio persistente de la úlcera venosa (32). Se ha demostrado que ciertos polimorfismos del gen de TNF α tales como TNFA-308A confieren hasta el doble de riesgo de susceptibilidad para presentar úlcera venosa (el gen del TNF α se localiza en el cromosoma 6 en la zona inestable correspondiente a las secuencias que codifican el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)) (3). Existen diferentes tipos de receptores celulares para TNF α y naturalmente la acción biológica definitiva de la molécula, para cualquiera de los efectos fisiológicos mencionados, es dependiente del subtipo de receptor, su presencia o ausencia así como de la topografía de los mismos; en un interesante estudio llevado a cabo por Mori y cols. se encontró que las ratas de experimentación “noqueadas” para el gen del receptor p55 del TNF α tuvieron efectos fisiológicos menores a los esperados en términos de quimiotaxis y expresión de moléculas de adhesividad celular en las heridas producidas en estas respecto las ratas normales para tal gen (33). El esfuerzo de investigación en el estudio de las moléculas

involucradas en la patogénesis de la úlcera venosa indica que aún no se puede emitir ningún criterio en términos de inmunomarcación como factor pronóstico para trabajo con pacientes individuales en la consulta clínica.

3. JUSTIFICACION

En el estudio previo “Eficacia del fitofármaco MTC-2G (*Mimosa tenuiflora cortex*) en el tratamiento de úlceras venosas en el Departamento de Dermatología del Hospital Dr. Manuel Gea González” realizado por Lammoglia y colaboradores no se encontró significancia estadística en términos de área (medida en cm²) en las úlceras venosas tratadas con *Mimosa tenuiflora cortex*, sin embargo, se documentó que las úlceras de los pacientes tratados en tal estudio presentaron aumento del tejido de granulación, disminución del exudado y epitelización significativas clínicamente por lo que se considera importante determinar si tales úlceras presentan o no expresión de los marcadores inflamatorios y de reparación tisular en úlceras venosas: Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β), Factor de Crecimiento Epidérmico alfa (EGF- α), Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α), Interleucina-1 beta (IL-1 β), Interleucina-6 (IL-6), CD34 y D2-40 tanto en el grupo tratado con *Mimosa tenuiflora cortex* como en el tratado sin tal fitofármaco y a tiempo 0 como a las 8 semanas de tratamiento. De encontrarse diferencias en el patrón de inmunomarcación para las citocinas mencionadas entre el grupo tratado con *Mimosa tenuiflora cortex* comparado con el grupo tratado sin tal fitofármaco entonces se contará con un antecedente para potenciales estudios en los cuales se pueda caracterizar el probable papel farmacológico y/o modificador de la respuesta inmune de *Mimosa tenuiflora cortex* y su valor real como herramienta terapéutica en el manejo de úlceras venosas o en otros procesos patológicos que cursen con heridas crónicas.

4. HIPOTESIS

El patrón de inmunomarcaje para TGF- β , EGF- α , TNF- α , Il-1 β , Il-6, CD34 y D2-40 en las úlceras venosas tratadas con MTC-2G (*Mimosa tenuiflora cortex*) difiere significativamente del patrón presente en aquellas úlceras tratadas sin tal fitofármaco.

5. OBJETIVOS

Describir y comparar el patrón de expresión de los marcadores inmunohistoquímicos TGF- β , EGF- α , TNF- α , IL-1 β , IL-6, CD34 y D2-40 en las úlceras venosas tratadas con el fitofármaco MTC-2G (*Mimosa tenuiflora cortex*) así como en las úlceras tratadas sin tal fitofármaco tanto a tiempo 0 como a las 8 semanas de tratamiento.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Universo de estudio.

Bloques de parafina de las muestras de piel obtenidas por biopsia* por sacabocado de úlceras venosas tratadas con gel hidrocoloide con o sin el fitofármaco MTC-2G, tomadas tanto a tiempo cero como a las 8 semanas de iniciado el tratamiento.

* El universo estudiado fueron las biopsias obtenidas en el protocolo previo: "Eficacia del fitofármaco *Mimosa tenuiflora cortex* en el tratamiento de úlceras venosas en el Departamento de Dermatología Del Hospital General Dr. Manuel Gea González". Realizado por Lammoglia L. y colaboradores (año 2008 y 2009)

6.2. Tamaño de la muestra.

El tamaño de la muestra correspondió al del número total de pacientes del estudio previo en los que se tomó biopsia a tiempo cero como a las 8 semanas de iniciado el manejo y que fueron: 9 pacientes con úlcera tratada con MTC-2G y 10 pacientes con úlcera tratada sin tal fitofármaco, para tener un total de 19 pacientes.

6.3. Criterios de selección:

6.3.1.- Criterios de inclusión.

- El universo a estudiar fueron todos los bloques de tejido embebidos en parafina de las muestras de piel obtenidas por biopsia con sacabocado durante la realización

del protocolo previo “Eficacia del fitofármaco *Mimosa tenuiflora cortex* en el tratamiento de úlceras venosas en el Departamento de Dermatología Del Hospital General Dr. Manuel Gea González”. Realizado por Lammoglia L. y colaboradores (año 2008 y 2009)

6.3.2 Criterios de eliminación

- Bloques de tejido embebidos en parafina cuya cantidad de tejido presente fue insuficiente para realizar la inmunotinción correspondiente
- Tejido que fue mal procesado durante la técnica de obtención de la inmunotinción y que no fue valorable en la emisión de resultados

6.3.4.- Definición de variables

6.3.4.1.- Variables independientes

a) Tratamiento con *Mimosa tenuiflora cortex*, categoría dicotómica, escala: si, no

b) Cronología del tratamiento con *Mimosa tenuiflora cortex*, categoría nominal, escala: antes, después

6.3.4.2.- Variables dependientes

a) Inmunoreactividad a una citocina determinada, variable ordinal: ausente, leve, moderado, intenso

b) Topografía de la inmunoreactividad a una citocina determinada, variable nominal: Epidermis, dermis, vasos sanguíneos, lecho ulceroso, infiltrado inflamatorio

6.4. Descripción de procedimientos

Procedimientos.

6.4.1.- Selección de los bloques de parafina bajo los criterios de inclusión y exclusión ya comentados.

A cargo de investigador principal y uno de los investigadores asociados.

6.4.2.- Envío de los bloques a inmunotinción al laboratorio de inmunohistoquímica

A cargo de investigador principal.

6.4.3.- Realización de la técnica de inmunohistoquímica

Uno de los investigadores asociados, capacitado en inmunomarcación de proteínas a partir de biopsias embebidas en bloques de parafina mediante inmunohistoquímica realizó

la técnica correspondiente. Los investigadores fueron asistidos en todas y cada una de las etapas por el investigador principal.

6.4.4.- Captura de datos

La lectura de todas las laminillas obtenidas mediante la técnica de inmunomarcaje fue realizada de manera ciega por el investigador principal (experto en lectura de inmunohistoquímica en biopsias de úlceras cutáneas) y se hizo en 4 campos a 60x (60 aumentos). El investigador principal fue asistido en todo momento por el investigador responsable quien capturó los datos emitidos por el investigador principal. Ambos observaron simultáneamente la microscopía e inmunomarcación de las laminillas sentados al microscopio de 2 cabezas.

6.4.5.- Análisis estadístico

Una vez realizada la lectura bajo los criterios nominales establecidos, el investigador principal y el investigador responsable así como uno de los investigadores asociados se encargaron de analizar conjuntamente los datos con el rigor estadístico correspondiente y de presentarlos con tablas y gráficas adecuadas.

6.4.6.- Discusión y emisión de resultados

El investigador principal, el investigador responsable y uno de los investigadores asociados discutieron y obtuvieron las conclusiones que llevaron a rechazar o aceptar la hipótesis.

6.4.7.- Reporte final para publicación

Lo llevó a cabo el investigador principal asesorado por la investigadora responsable y dos de los investigadores asociados.

7. RESULTADOS

Se obtuvo la inmunohistoquímica para las proteínas TGF- β , EGF- α , TNF- α , Il-1 β , Il-6, CD34 y D2-40 para cada una de las biopsias de úlceras venosas obtenidas por sacabocado de 4 mm de 19 pacientes en total tanto a tiempo cero como a las 8 semanas de iniciado el tratamiento con el fitofármaco MTC-2G constituyendo 10 pacientes tratados únicamente con vehículo (hidrogel) y 9 tratados con vehículo más fitofármaco MTC-2G.

Para llevar a cabo el análisis estadístico se asignaron valores numéricos para cada una de las escalas de las variables evaluadas de la siguiente manera:

Grado de inmunotinción: Nada=1, leve=2, moderado=3, intenso=4

Topografía de la inmunoreactividad: Epidermis=1, dermis=2, vasos sanguíneos=3, infiltrado inflamatorio=4, No aplica (NA)=5, epidermis mas vasos=6, vasos mas infiltrado=7, epidermis mas vasos mas infiltrado=8, epidermis mas dermis=9, epidermis mas infiltrado=10

Una vez asignados tales valores numéricos se elaboró una tabla (Tabla 1) que constituyó la estructura general de datos en la cual se llevó a cabo el análisis de varianza multifactor (ANOVA) considerando p estadísticamente la menor a 0.05.

Cabe destacar que en el análisis de varianza multifactor ANOVA el valor de P del covariado indica si hay diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos para una variable determinada –en el caso de nuestro estudio- al inicio del tratamiento. El valor de P de “efectos principales” especifica si hay o no significancia estadística entre ambos grupos ante una intervención terapéutica determinada a un tiempo determinado siempre ponderando el efecto de la situación de las variables en comparación al inicio de la medición.

PX	TX	TGF- β T 0	EGF- α T 0	TNF- α T 0	II-1 β T 0	II-6 T 0	CD34 T 0	D2-40 T 0	TGF- β T 8	EGF- α T 8	TNF- α T 8	II-1 T 8	II-6 T 8	CD34 T 8	D2-40 T 8
A	CON	2	2	2	1	1	2	2	4	1	1	1	1	4	3
B	CON	4	1	2	1	2	3	3	3	2	2	1	1	4	3
D	CON	3	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2
H	CON	3	2	2	1	2	3	2	3	1	1	1	2	4	1
I	CON	3	2	2	1	2	4	2	2	1	1	1	1	2	2
N	CON	1	3	3	2	1	3	2	2	2	2	1	1	3	2
O	CON	3	1	1	1	1	3	2	2	2	1	1	3	3	1
P	CON	3	1	1	1	1	3	1	4	1	2	1	2	3	1
Q	CON	4	2	2	1	1	2	2	4	3	3	1	1	4	3
C	SIN	4	1	1	1	1	2	3	2	1	1	1	1	3	3
E	SIN	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	3	2
F	SIN	1	2	2	1	2	3	3	2	2	2	3	2	4	2
G	SIN	2	2	2	1	1	3	2	3	1	1	1	1	1	1
J	SIN	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	2	3	1
K	SIN	1	2	2	2	2	3	4	2	1	2	1	1	4	4
L	SIN	2	2	2	1	2	4	2	4	2	1	1	2	3	2
M	SIN	2	1	1	1	1	2	2	3	1	2	2	2	2	2
R	SIN	1	2	2	1	1	2	2	2	1	2	2	2	3	2
S	SIN	3	1	2	2	2	4	2	2	3	2	2	2	4	2

TABLA 1. CONCENTRADO DE VALORES DE GRADO DE INMUNOTINCIÓN AL QUE SE LE REALIZÓ LA PRUEBA ANOVA

Tiempo cero semanas=T0, Tiempo ocho semanas=8, Con tratamiento=CON, Sin tratamiento=SIN GRADO DE INMUNOTINCIÓN:Nada=1, leve=2, moderado=3, intenso=4

PX	TX	TGF- β T 0	EGF- α T 0	TNF- α T 0	II-1 β T 0	II-6 T 0	CD34 T 0	D2-40 T 0	TGF- β T 8	EGF- α T 8	TNF- α T 8	II-1 T 8	II-6 T 8	CD34 T 8	D2-40 T 8
A	CON	6	1	1	5	5	2	2	7	5	5	5	5	2	2
B	CON	6	5	1	5	4	2	2	6	1	10	5	5	2	2
D	CON	6	5	5	5	5	2	2	3	5	5	5	5	2	2
H	CON	6	1	1	5	4	2	2	3	5	5	5	4	2	5
I	CON	6	6	1	5	4	2	2	6	5	5	5	5	2	2
N	CON	5	1	1	4	5	2	2	6	6	1	5	5	2	2
O	CON	1	5	5	5	5	2	2	8	1	5	5	4	2	5
P	CON	3	5	5	5	5	2	5	4	5	4	5	4	2	5
Q	CON	3	1	1	5	5	2	2	8	1	1	5	5	2	2
C	SIN	3	5	5	5	5	2	2	6	5	5	5	5	2	2
E	SIN	3	5	5	5	5	2	2	6	1	9	5	5	2	2
F	SIN	6	1	4	5	4	2	2	6	1	1	4	4	2	2
G	SIN	6	1	1	5	5	2	2	1	5	5	5	5	5	5
J	SIN	6	1	1	5	5	2	2	6	1	10	4	4	2	5
K	SIN	5	4	4	4	4	2	2	8	5	1	5	5	2	2
L	SIN	6	5	1	5	4	2	2	8	1	5	5	4	2	2
M	SIN	3	5	5	5	5	2	2	6	5	4	4	4	2	2
R	SIN	5	6	4	5	5	2	2	7	5	4	4	4	2	2
S	SIN	6	5	4	4	4	2	2	6	1	10	4	4	2	2

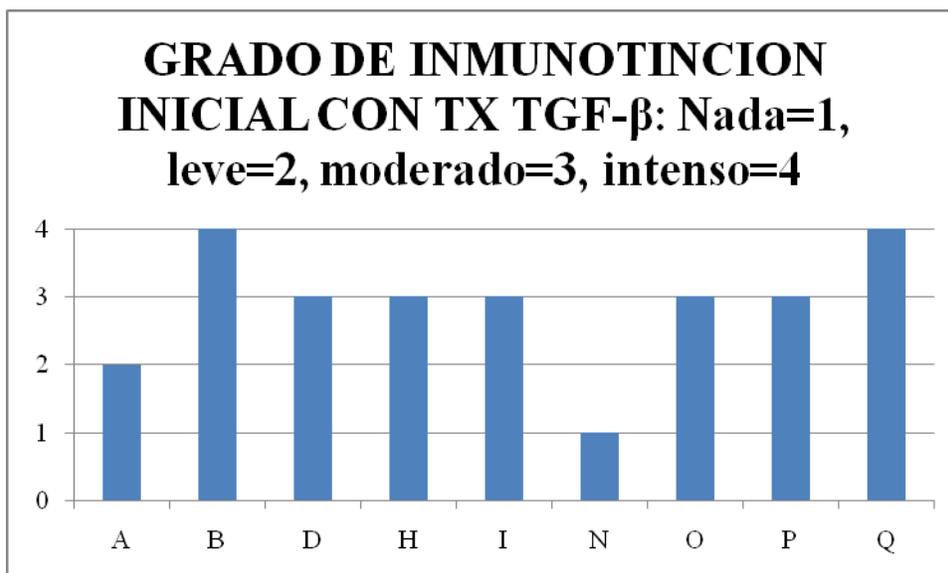
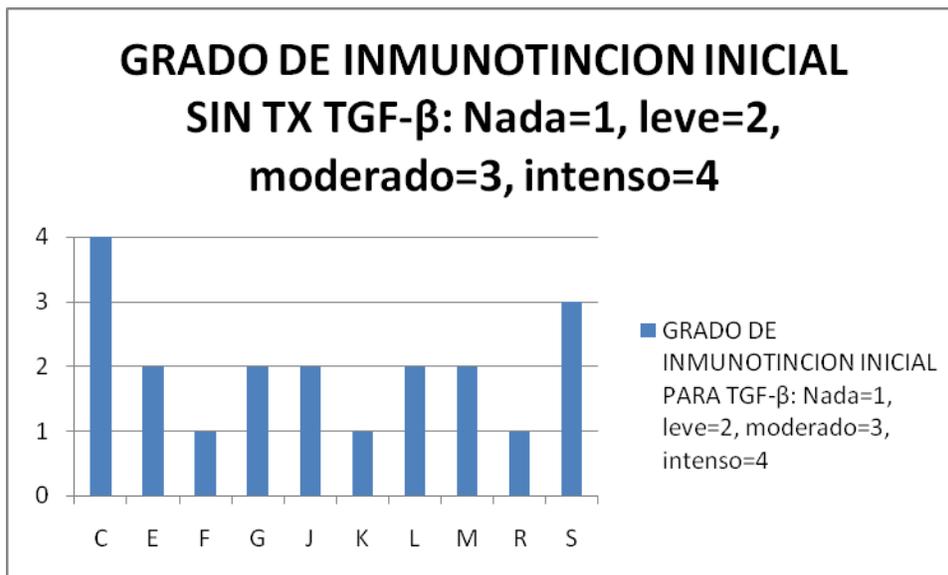
TABLA 2. CONCENTRADO DE VALORES DE TOPOGRAFIA DE LA INMUNOTINCIÓN

Topografía de la inmunoreactividad: Epidermis=1, dermis=2, vasos sanguíneos=3, infiltrado inflamatorio=4, NA=5, epidermis mas vasos=6, vasos mas infiltrado=7, epidermis mas vasos mas infiltrado=8, epidermis mas dermis=9, epidermis mas infiltrado=10

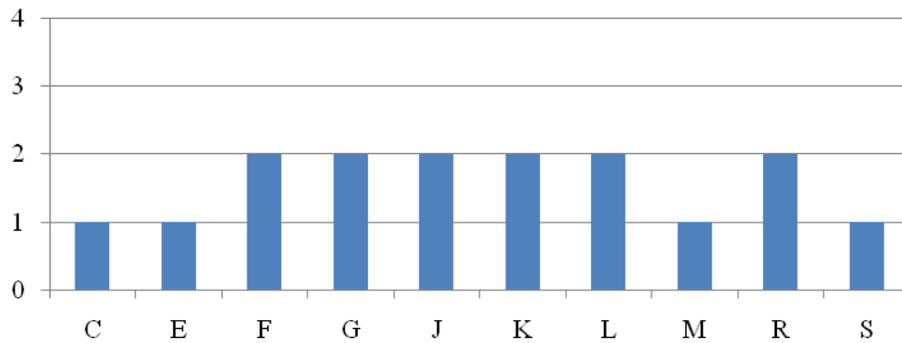
7.1.- Gráficas

Se presentan a continuación algunas de las gráficas comparativas entre ambos grupos obtenidas correspondientes al grado de inmunotinción y la topografía involucrada

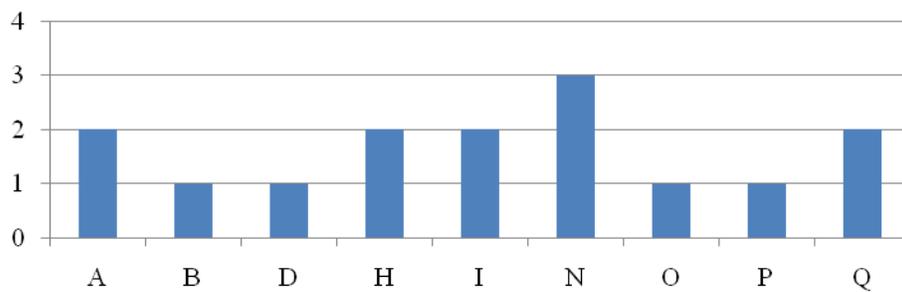
1.- GRADO DE INMUNOTINCION DE GRUPO TRATADO VERSUS NO TRATADO A TIEMPO CERO



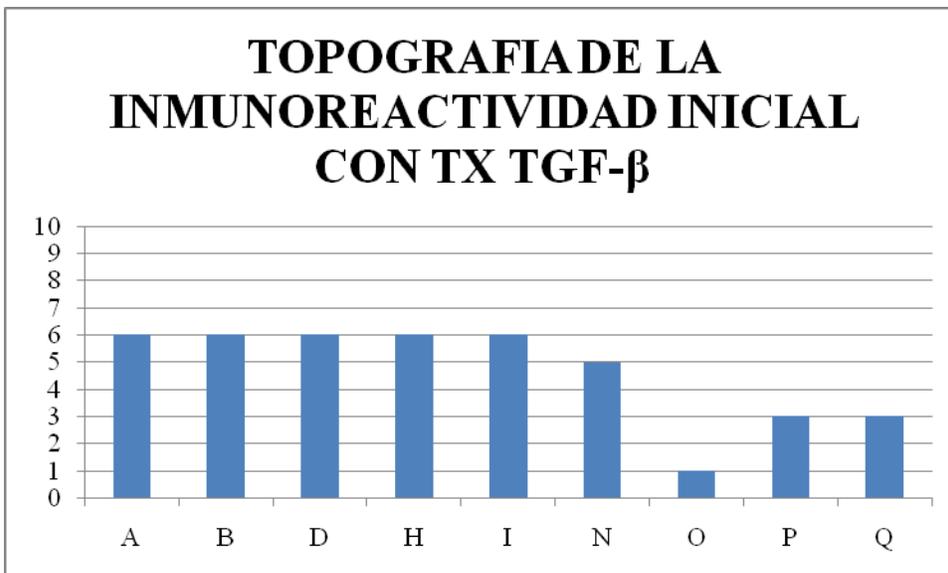
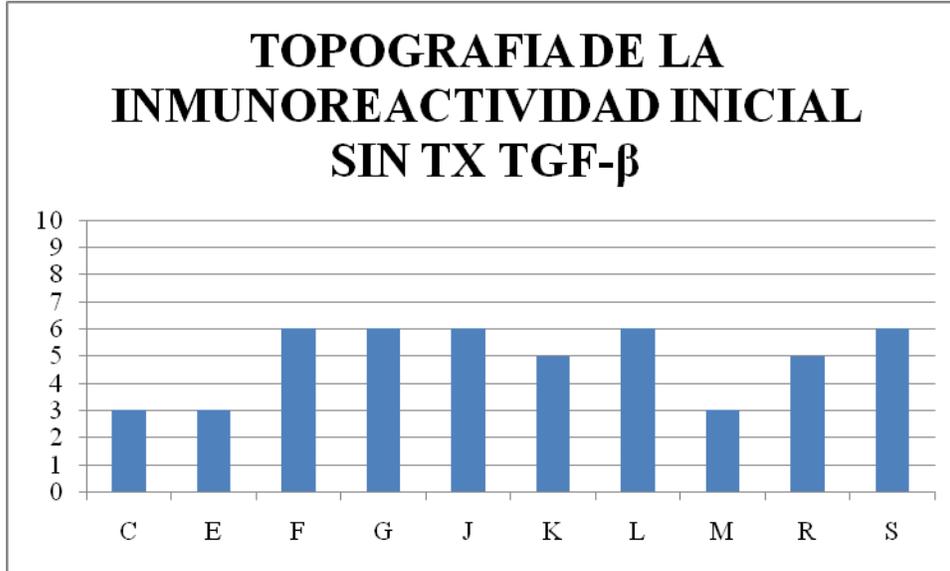
**GRADO DE INMUNOTINCION
INICIAL SIN TX EGF- α : Nada=1,
leve=2, moderado=3, intenso=4**



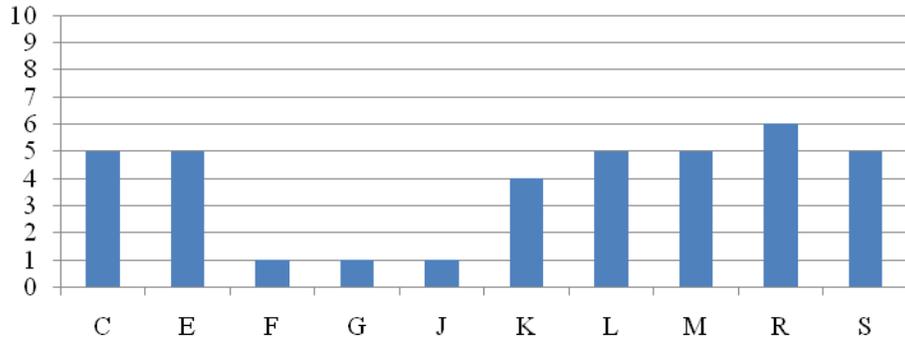
**GRADO DE INMUNOTINCION
INICIAL CON TX EGF- α :
Nada=1, leve=2, moderado=3,
intenso=4**



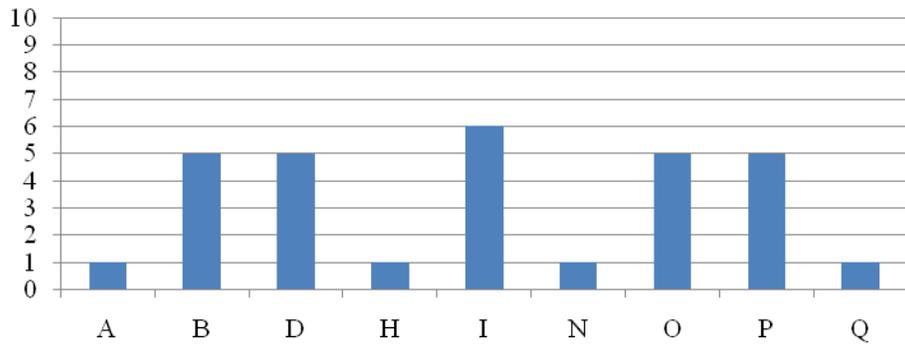
2.- TOPOGRAFIA DE INMUNOTINCIÓN DE GRUPO TRATADO VERSUS NO TRATADO
A TIEMPO CERO



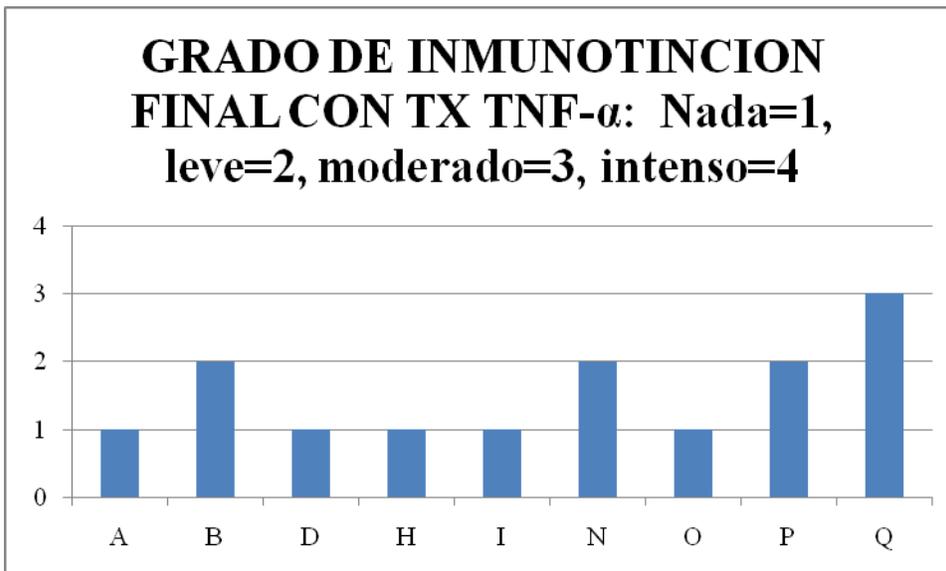
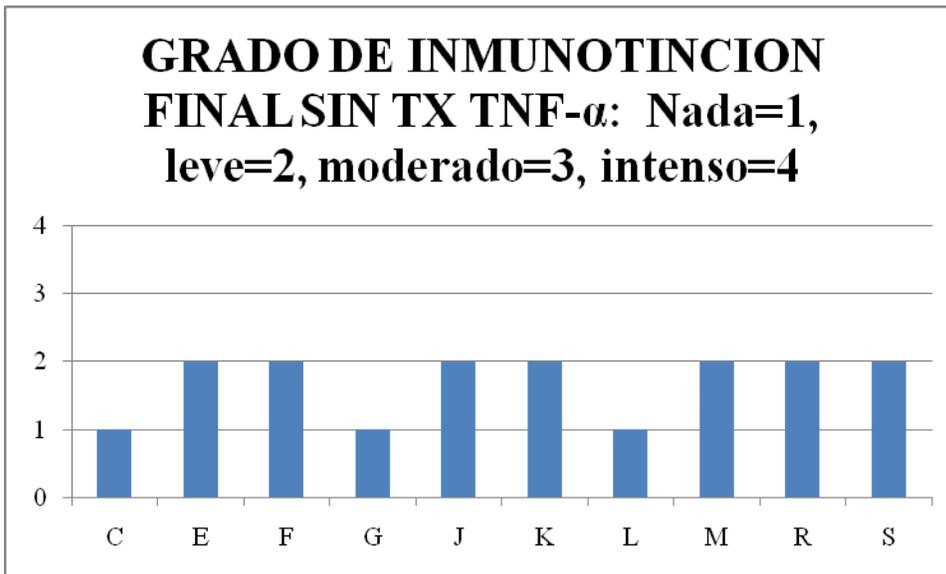
**TOPOGRAFIAD E LA
INMUNOREACTIVIDAD INICIAL
SIN TX EGF- α**



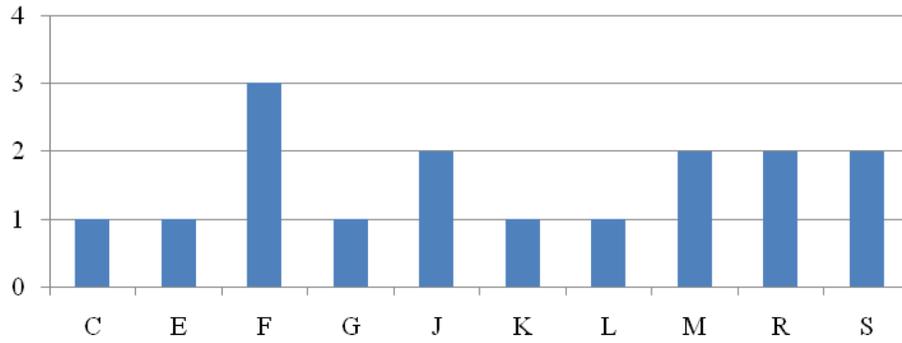
**TOPOGRAFIAD E LA
INMUNOREACTIVIDAD INICIAL
CON TX EGF- α**



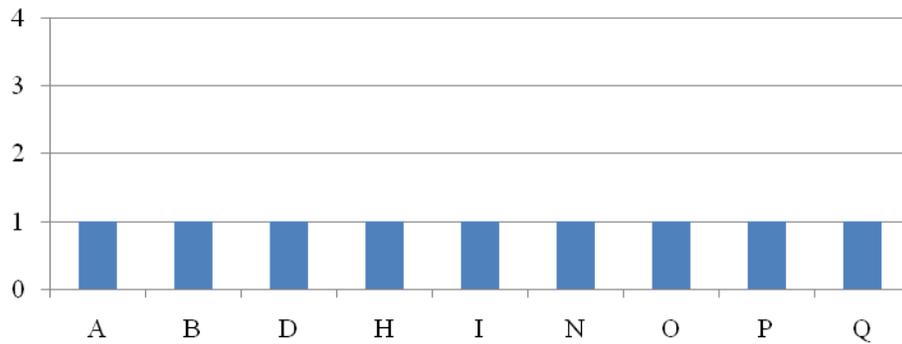
3.- GRADO DE INMUNOTINCION DE GRUPO TRATADO VERSUS NO TRATADO A
TIEMPO OCHO SEMANAS



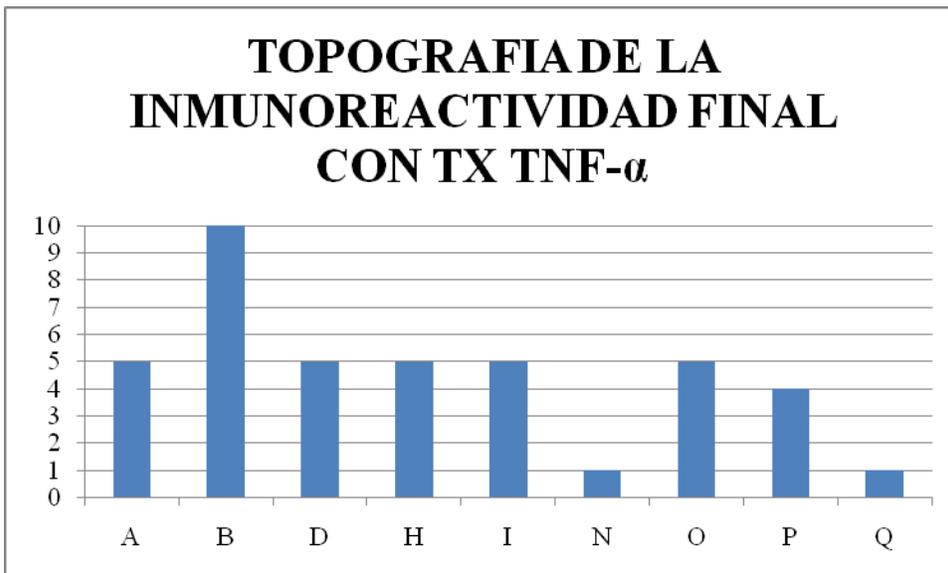
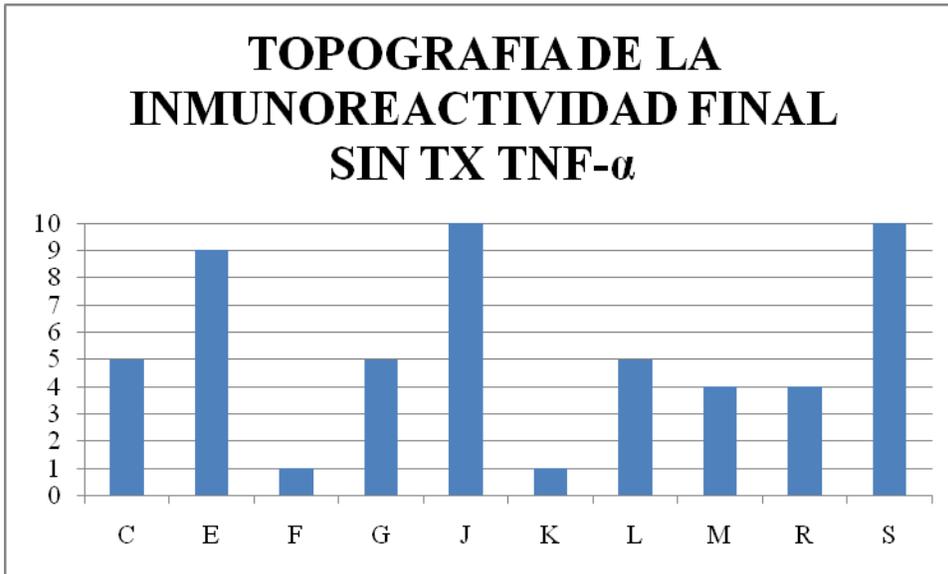
**GRADO DE INMUNOTINCION
FINAL SIN TX II-1: Nada=1,
leve=2, moderado=3, intenso=4**



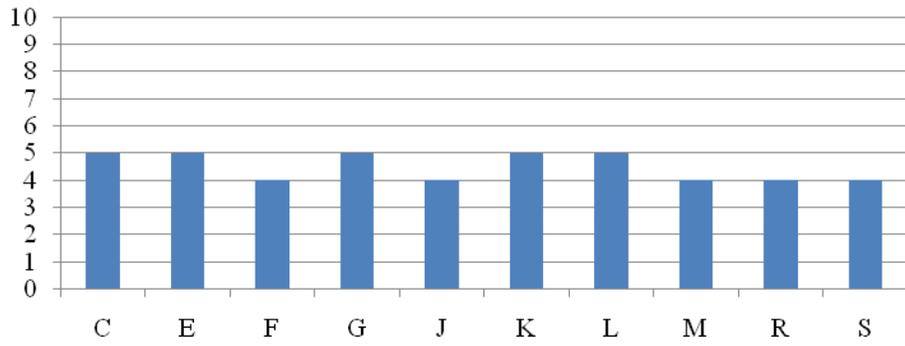
**GRADO DE INMUNOTINCION
FINAL CON TX II-1: Nada=1,
leve=2, moderado=3, intenso=4**



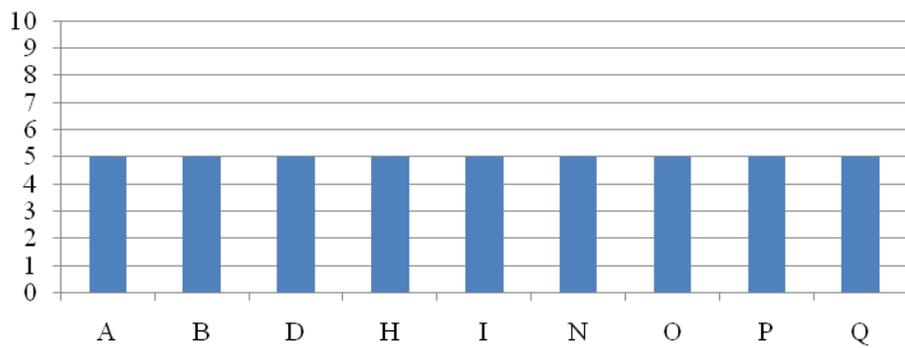
4.- TOPOGRAFIA DE INMUNOTINCIÓN DE GRUPO TRATADO VERSUS NO TRATADO
A TIEMPO OCHO SEMANAS



TOPOGRAFIA DE LA INMUNOREACTIVIDAD FINAL SIN TX II-1



TOPOGRAFIA DE LA INMUNOREACTIVIDAD FINAL CON TX II-1



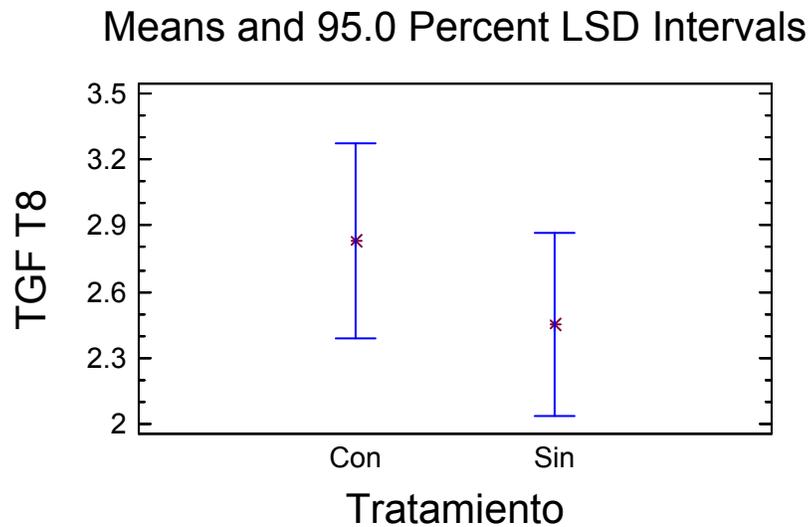
7.2.- ANALISIS DE VARIANZA MULTIFACTOR ANOVA

En el análisis de varianza multifactor (ANOVA) de los datos presentados se encontraron los siguientes resultados los cuales se acompañan de la gráfica correspondiente (valor del promedio y desviación estándar):

TGF- β

Covariado con valor de P de 0.5640

Efectos principales con valor de P de 0.3916

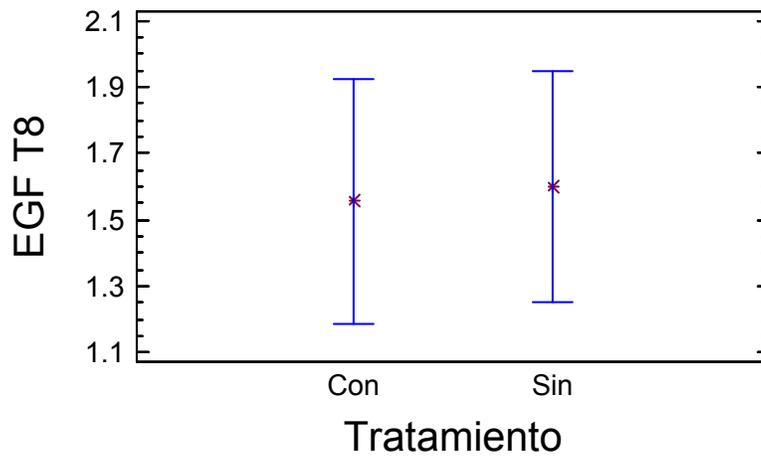


EGF- α

Covariado con valor de P de 0.9718

Efectos principales con valor de P de 0.8954

Means and 95.0 Percent LSD Intervals

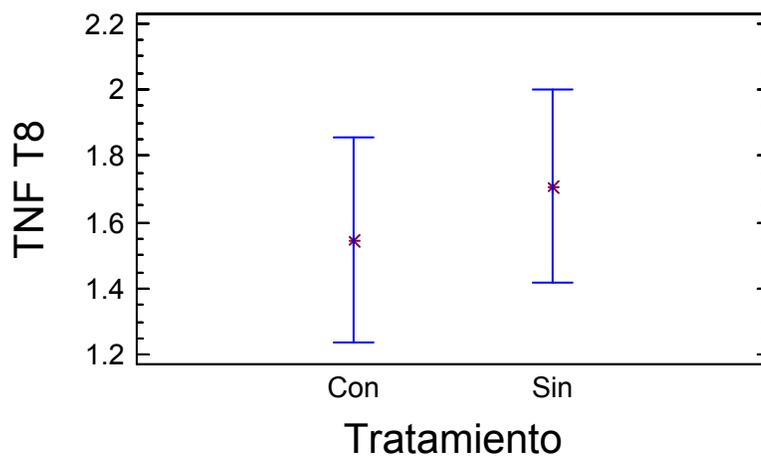


TNF- α

Covariado con valor de P de 0.4202

Efectos principales con valor de P de 0.5778

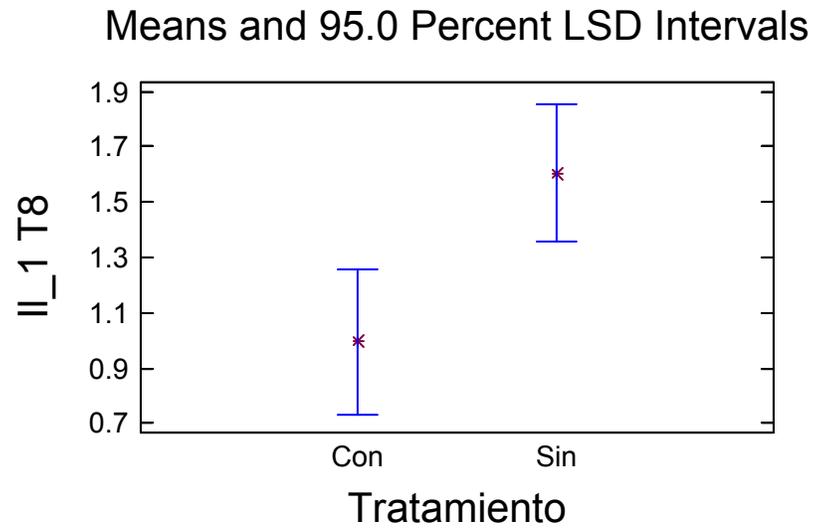
Means and 95.0 Percent LSD Intervals



II-1 β

Covariado con valor de P de 0.8117

Efectos principales con valor de P de 0.0234

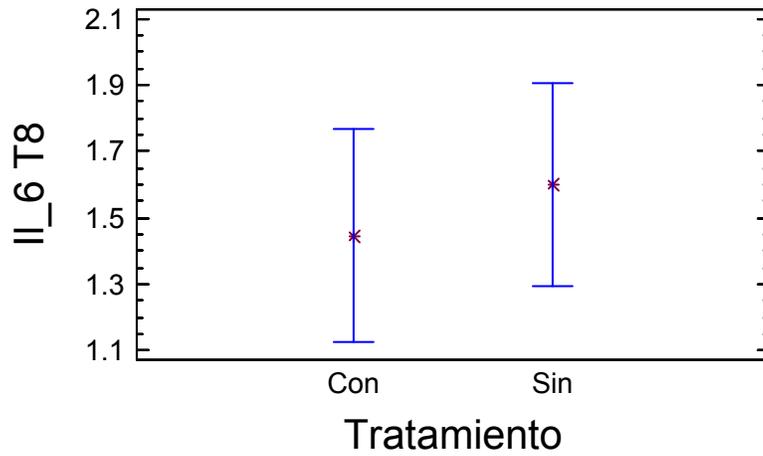


II-6

Covariado con valor de P de 0.8457

Efectos principales con valor de P de 0.6157

Means and 95.0 Percent LSD Intervals

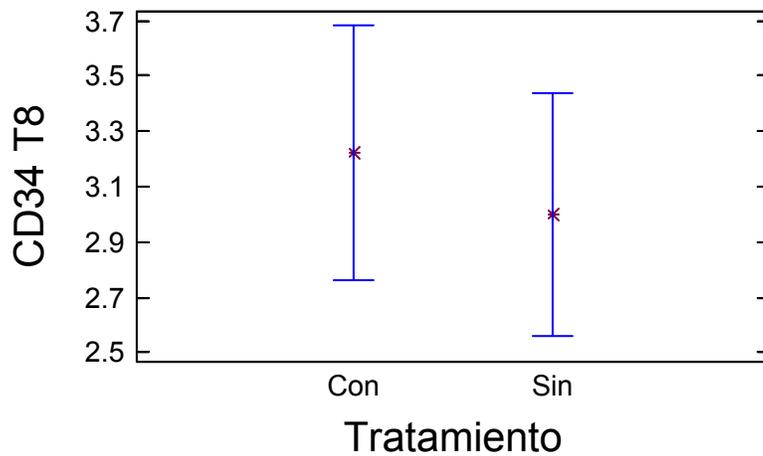


CD 34

Covariado con valor de P de 0.8751

Efectos principales con valor de P de 0.6045

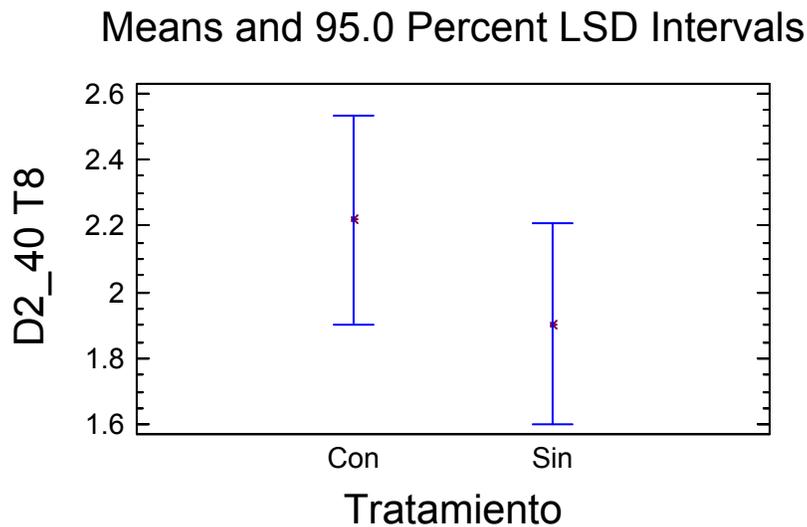
Means and 95.0 Percent LSD Intervals



D2-40

Covariado con valor de P de 0.0006

Efectos principales con valor de P de 0.3129



El análisis de varianza ANOVA realizado indica la ausencia de diferencias estadísticamente significativas para TGF-beta, EGF-alfa, TNF-alfa, Il-6 y CD34 entre el grupo tratado y el no tratado tanto a tiempo cero como a las ocho semanas de tratamiento. En el caso de D2-40 se encontraron diferencias estadísticas significativas a tiempo cero (al inicio del tratamiento) entre ambos grupos pero no así a las 8 semanas. Finalmente en el análisis referente a Il-1 β al momento cero se encontraron ambos grupos sin diferencias estadísticamente significativas pero el valor de P de efectos principales demostró significancia estadística.

7.3.- Resultados sobre la topografía de la inmunomarcación

En términos de topografía se encontraron datos interesantes:

TGF-beta se encontró en epitelios, vasos sanguíneos e infiltrado inflamatorio siendo en estas dos últimas localizaciones donde presentó con frecuencia un grado intenso de expresión, lo que posiblemente está asociado a los varios sitios donde se produce y actúa este factor (Figura 1)

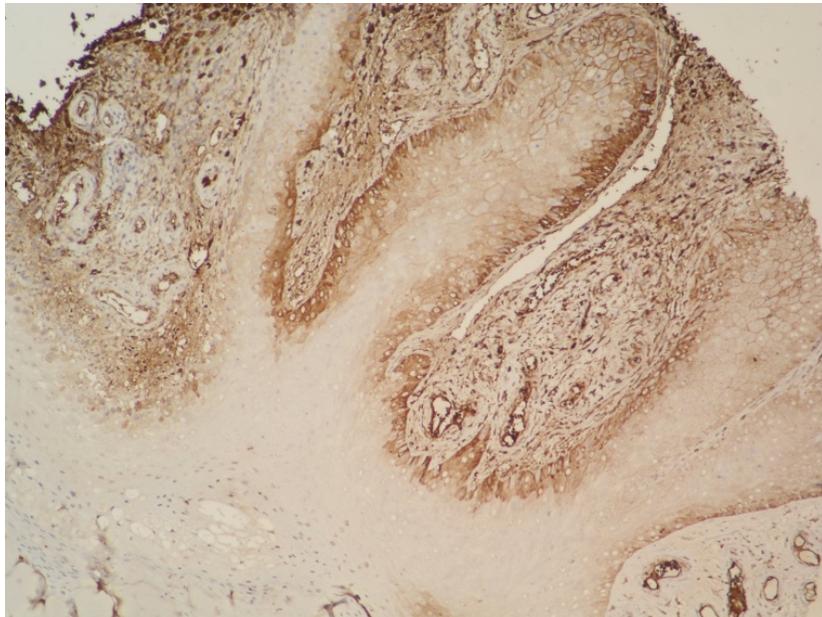


Figura 1. Inmunohistoquímica para TGF-beta 40x

EGF-alfa se expresó en epitelio del borde ulceroso, ya sea en grado leve o moderado aunque también en epitelios e infiltrado inflamatorio (Figura 2)

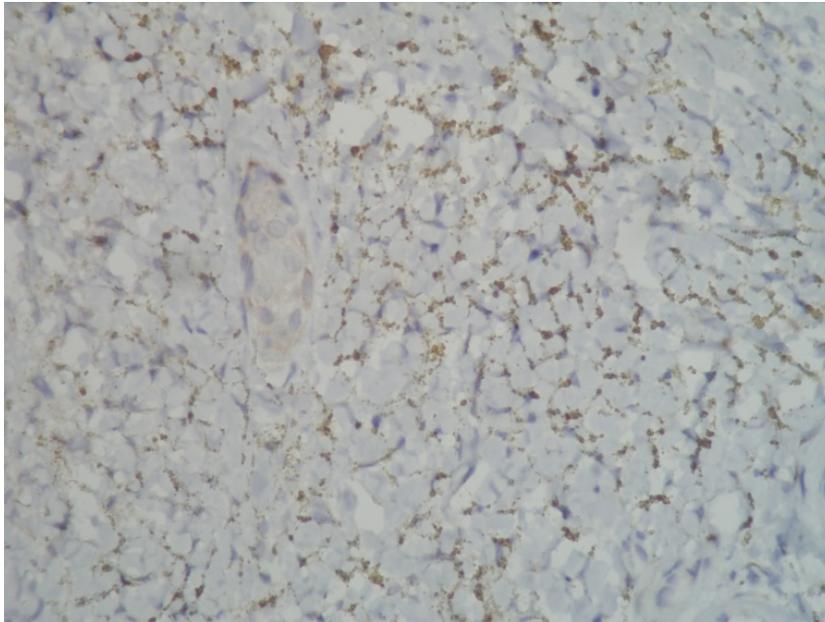


Figura 2. Inmunohistoquímica para EGF-alfa 60x

De las 38 biopsias estudiadas no todas contaban con el muestreo ideal de lecho más epitelio pues 9 de las biopsias no tenían epitelio -destacando que ello es explicable en el sentido que todo muestreo por biopsia con sacabocado de 4 milímetros está sujeto a error humano de apreciación pues es finalmente el cirujano quien indica de donde se va a tomar la biopsia en base solamente a criterios clínicos-.

Respecto TNF alfa este se encontró principalmente en epitelio aunque también en infiltrado inflamatorio. Es probable que de haber contado con muestro epitelial en todas las biopsias quizá EGF-alfa y/o TNF alfa pudieran haber alcanzado significancia estadística (Figura 3)

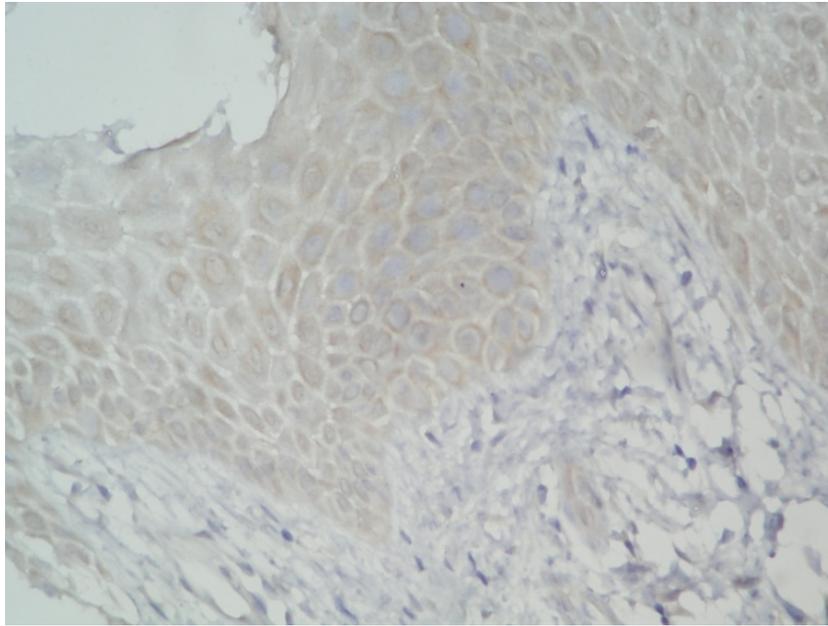


Figura 3. Inmunohistoquímica para TNF-alfa 60x

Il-1 β e Il-6 se expresaron en infiltrado inflamatorio (Figuras 4,5)

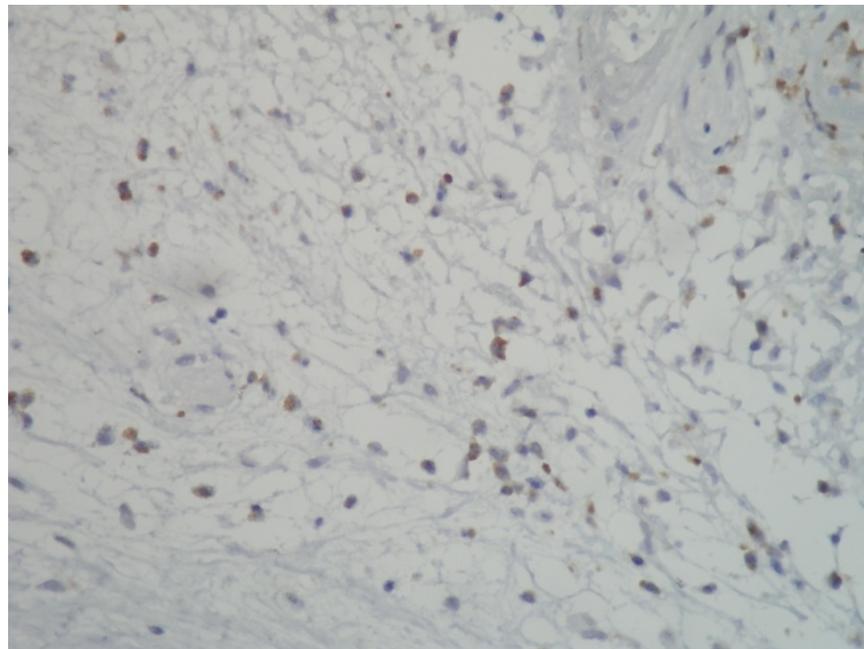


Figura 4. Inmunohistoquímica para Il-1 β . 60x

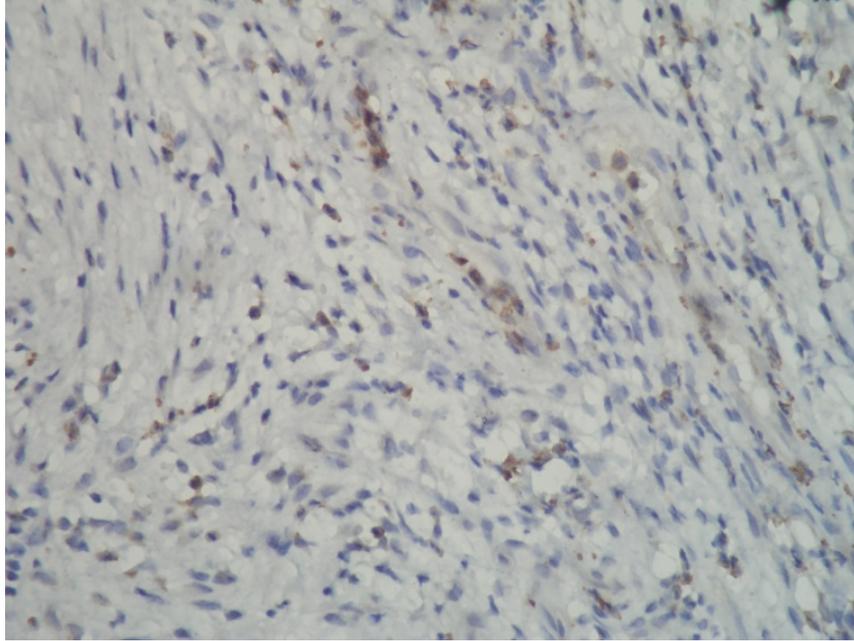


Figura 5. Inmunohistoquímica para Il-6. 60x

Los marcadores vasculares CD34 y D2-40 prácticamente en todas los casos se encontraron expresados en la dermis debido a que los vasos sanguíneos o linfáticos se encuentran siempre en tal localización (Figuras 6,7)

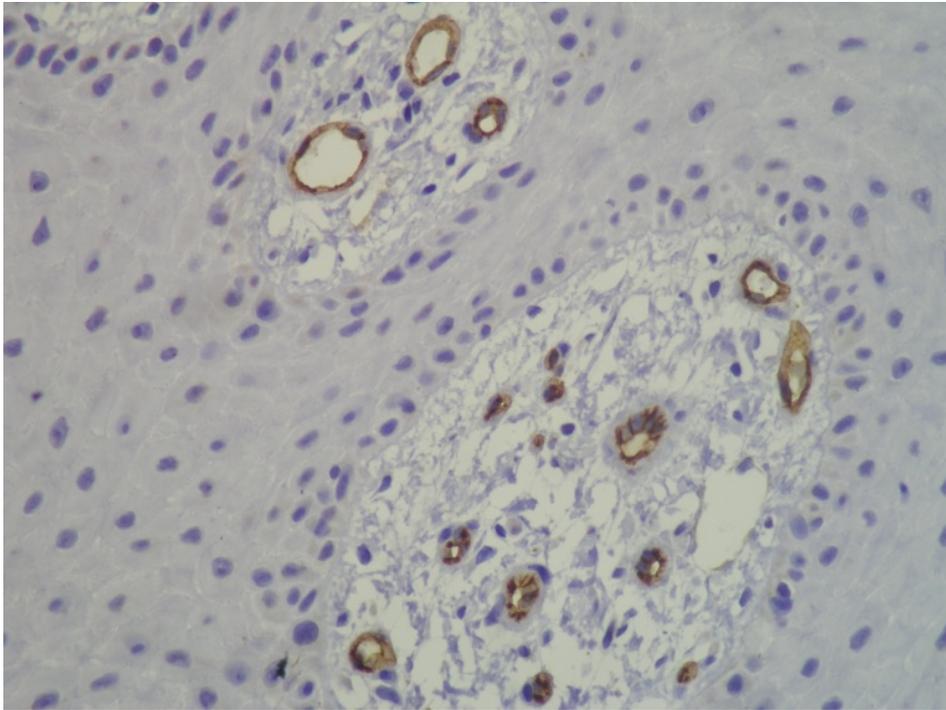


Figura 6. Inmunohistoquímica para CD34. 60x

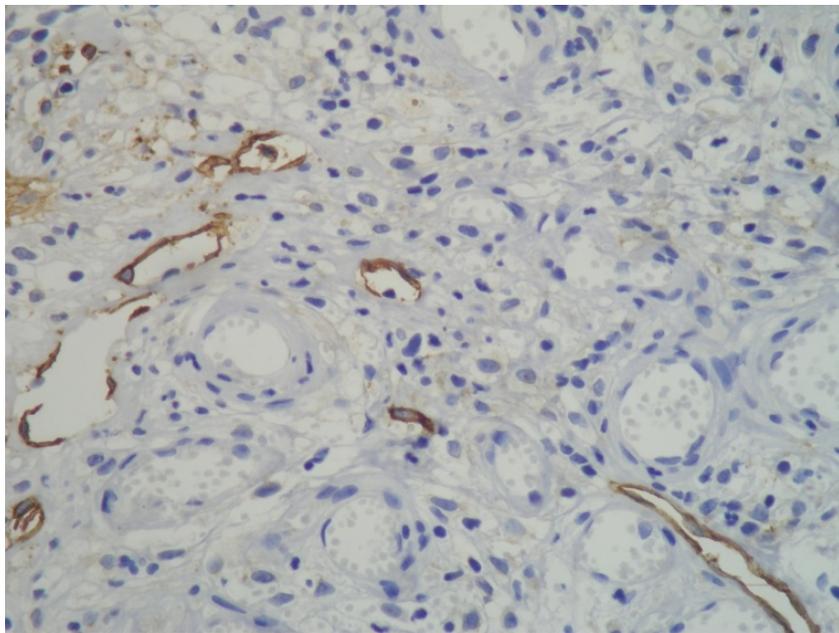


Figura 7. Inmunohistoquímica para D2-40. 60x

8.- Discusión

El estudio científico de las úlceras venosas en sus diferentes aspectos etiopatogénicos y terapéuticos es muy importante dada la morbilidad individual así como la importancia epidemiológica provocada por este padecimiento (1,2). Los aspectos clínicos de la enfermedad están bien caracterizados en términos morfológicos y cronológicos, sin embargo, aún conocemos poco acerca de los fenómenos inflamatorios, microbiológicos y bioquímicos subyacentes (1,3,4). Tal déficit en el conocimiento ocurre también respecto los mecanismos biológicos y farmacológicos secundarios a diversas intervenciones terapéuticas que de una u otra manera han demostrado utilidad en el manejo médico de estos pacientes (4). El reto para el investigador es grande si consideramos la multiplicidad de factores contribuyentes en la fisiopatología de una úlcera venosa tales como la obesidad, el grado de actividad, fármacos administrados e índice tabáquico por citar solo algunos. A los factores fisiopatológicos clásicos tales como la incapacidad de la musculatura de la pantorrilla de bombear sangre de regreso hacia el corazón con el consecuente aumento de la presión hidrostática capilar o la alteración en la difusión de oxígeno secundaria al depósito de fibrina (1,4) en los delicados vasos sanguíneos de la piel se suman ahora y con el avance en el conocimiento médico el papel de los diferentes tipos celulares cutáneos como los queratinocitos, fibroblastos, células del sistema inmunológico, células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos y sus productos definidos como citocinas, proteasas e inhibidores de proteasas, moléculas de adhesión celular y aquellas relacionadas con el estrés oxidativo. En la gran complejidad de los factores involucrados en la fisiopatología de las úlceras venosas destaca la investigación realizada con las metaloproteinasas de matriz así como las citocinas proinflamatorias, fibrogénicas, moduladoras de epidermogénesis así como aquellas con papel angiogénico cuyo conocimiento cobra preponderancia no solamente en términos de su descripción en condiciones basales en la úlcera venosa si no también su modificación ante diversas intervenciones farmacológicas o no farmacológicas. Dentro de las citocinas proinflamatorias estudiadas en este trabajo y con un papel parcialmente conocido en la fisiopatología de las úlceras venosas tenemos a las interleucinas 1,6 y al Factor de Necrosis Tumoral alfa cuya concentración se posiblemente variaría en caso de que cierta intervención farmacológica o no necesariamente farmacológica esté modificando el microambiente de la úlcera venosa. No olvidemos que la interdependencia de las

citocinas es total y que, por ejemplo, está caracterizado que Il-6 –citocina importante en la inmunidad local y sistémica- está involucrada en el proceso de cicatrización en términos de quimiotaxis leucocitaria, angiogénesis y síntesis de colágeno y que las concentraciones de otras citocinas cuyo presencia es determinante en la génesis del tejido de granulación se modifican por influencia de esta. Dentro de las moléculas cuyo papel en la generación de tejido de granulación es conocido y analizadas por nosotros se encuentran el Factor de Crecimiento Transformante beta y la misma Il-1. No ha quedado dilucidado el papel del factor de crecimiento epidérmico y sus propiedades queratopoyéticas en el proceso de cicatrización de las úlceras venosas y dado que el proceso de epitelización es fundamental en todo fenómeno de reparación tisular cutáneo constituyendo de hecho una de las etapas formales de tal evento consideramos importante la medición del mismo (6,7,8,9). Es evidente que la topografía de la inmunohistoquímica es importante y que la biopsia llevada a cabo en cada paciente entendida esta como un muestreo que, en el caso ideal, será siempre representativa tanto del lecho como del borde ulceroso. Esta situación ideal no siempre se pudo llevar a cabo en nuestro estudio (ya que en algunos casos se obtuvo solamente o predominantemente lecho ulceroso) y eso puede llevarnos a la obtención de resultados sesgados, simplemente pensemos que en ausencia de epitelio la probabilidad preliminar de encontrar factor de crecimiento epidérmico esta naturalmente disminuida. Se ha encontrado que una gran cantidad de citocinas proinflamatorias están involucradas en la génesis y manutención de la cronicidad de las úlceras venosas y que al comparar con inmunohistoquímica TNF alfa o Interleucina-1 entre piel sana y piel ulcerada de un mismo paciente se ha encontrado que tal biomolécula se encuentra elevada con significancia estadística respecto piel perilesional. En el contexto de esta complejidad sobre el proceso inflamatorio y de cicatrización de la úlcera venosa (9,21,22,23,24,25,26,27,28,30) realizamos la medición de TGF-beta, EGF-alfa, TNF-alfa, Il-1 β , Il-6 así como CD34 y D2-40, estos dos últimos como medio de inmunomarcaje altamente específico para conocer la densidad vascular y linfática respectivamente en las úlceras venosas y asumiendo que una variación podría ocurrir ante la génesis del tejido de granulación, entendido este último como el sustrato histológico fundamental de naturaleza proliferativa celular y vascular de la reparación tisular (6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20). Del estudio previo llevado a cabo por Lammoglia y cols. del cual se deriva este trabajo es importante explicar que completaron el mismo 32 pacientes, 18 en el grupo experimental y 14 en el de hidrogel, fueron 19 mujeres y 13 hombres, la media de edad fue de 60.56 años y el

tiempo de evolución medio de la úlcera fue de 38 meses. La media de reducción de MTC-2G fue de 6.29 cm² (IC95% 3.28-9.29) (p=0.0001) mientras que en el grupo de hidrogel la media fue de 5.85cm² (IC 95% 3.58-8.12) (p=0.001), no hubo diferencias estadísticamente significativas (p=0.815) entre ambos grupos. Sin embargo Lammoglia y cols. observaron clínicamente que MTC-2G favoreció la cicatrización en úlceras venosas, la granulación y formación de islas de epitelio, en la histopatología se encontró reducción en la necrosis y en la intensidad del infiltrado inflamatorio (5). El preparado farmacéutico (MTC-2G) que fue aplicado a los pacientes en el estudio previo del cual se obtuvieron los bloques de parafina con las biopsias para la realización de este trabajo presentó concentraciones de mimonósidos y otros compuestos similares a los preparados empleados en medicina tradicional, destacando además que el vehículo con el que se trató al grupo control (hidrogel) se elaboró en forma idéntica al fitofármaco mencionado pero sin el extracto vegetal. De este estudio previo estudiamos las biopsias de 19 pacientes: 10 sin y 9 con tratamiento, ambos analizados tanto a tiempo cero como a 8 semanas de tratamiento con el fitofármaco MTC-2G.

No existen antecedentes del estudio en la concentración local de citocinas y en los marcadores de densidad vascular en las úlceras venosas tratadas con el fitofármaco MTC-2G (*Mimosa tenuiflora cortex*) y en nuestra determinación comparativa con inmunohistoquímica para TGF beta, EGF-alfa, TNF-alfa, Il-1 β , Il-6, CD 34 y D2-40 entre el grupo de pacientes tratados con el vehículo sin el fitofármaco versus los tratados con vehículo más fitofármaco y con el análisis estadístico riguroso correspondiente no encontramos diferencia estadística significativa alguna para los inmunomarcadores mencionados tanto a tiempo cero como a las ocho semanas entre el grupo control y el tratado excepto en el caso de Il-1 β la cual disminuyó en forma significativa en el grupo tratado versus el no tratado a las 8 semanas de manejo por lo cual consideramos que el tepescohuite aplicado tópicamente sobre la úlcera venosa podría regular a la baja la concentración local de esta importante citocina proinflamatoria secretada por monocitos, macrófagos, linfocitos B, células dendríticas y células endoteliales y cuyas acciones mejor caracterizadas son la activación de las células blanco, maduración y expansión clonal, potenciación en la actividad de las células efectoras del sistema inmunológico así como expresión de moléculas de adhesión celular con el consecuente mantenimiento de un *status* inflamatorio persistente potencialmente deletéreo para la úlcera y cuya modificación podría influir en la mejoría clínica existente. De hecho, las acciones de Il-1 en piel son similares en muchos sentidos a las llevadas a cabo por TNF-alfa. Existen 2 subtipos de

Il-1 (designados alfa y beta) que tienen diferencias de aproximadamente 30% en su estructura aminoácida y a pesar de ello las similitudes en cuanto a acción son prácticamente totales. Debemos destacar que la infección bacteriana puede promover la síntesis de Il-1 sin embargo creemos que tal situación no ocurrió en los pacientes estudiados dado que ninguno de los enfermos mostró en ningún momento de su estudio datos clínicos o microbiológicos de infección local. Así como TNF-alfa lo hace, Il-1 aumenta la expresión de moléculas de adhesión celular en los endotelios vasculares lo que podría explicar en mayor o menor medida la disminución (aunque sin significancia estadística) de la cantidad de infiltrado inflamatorio de los pacientes tratados con MTC-2G así como la mejoría clínica evidente en las úlceras venosas manejadas con este fitoextracto (34).

9.- Conclusiones

En este estudio evaluamos por inmunohistoquímica el grado de expresión de los marcadores TGF-beta, EGF-alfa, TNF-alfa, Il-1 β , Il-6, CD34 y D2-40 en pacientes con úlceras venosas con y sin tratamiento con el fitofármaco MTC-2G tanto a tiempo cero como a las ocho semanas de iniciado el mismo encontrándose que no existieron diferencias estadísticas significativas para ninguno de los inmunomarcadores comentados excepto en el caso de la interleucina-1 β la cual fue menor en su expresión en el grupo tratado versus el no tratado a las 8 semanas de iniciado el manejo. Al ser este el primer estudio donde se analiza la inmunomarcación de proteínas relacionadas con la inflamación y la cicatrización así como con la densidad vascular en pacientes tratados con MTC-2G no es posible hacer comparación con estudios previos. Nuestros hallazgos demuestran el probable papel del tepescohuite como modulador de la respuesta inmunológica en términos de variación de la expresión de interleucina-1 β lo que podría traducir al menos en parte, las cualidades terapéuticas del fitofármaco en diferentes situaciones clínicas incluyendo las úlceras venosas. Este estudio aporta nueva evidencia sobre la eficacia y limitaciones del tepescohuite en el tratamiento de úlceras venosas y presenta un antecedente hacia nuevas líneas de investigación en el estudio de este fitofármaco, tal como la relacionada con la expresión de FGFb, receptores de Il-1 y análisis de metaloproteinasas de matriz en otros.

10. Perspectivas

Ante un problema común e incapacitante como la úlcera venosa es clave que los sistemas de salud locales, estatales y nacionales encuentren opciones baratas y eficaces en el manejo del mismo, el tepescohuite presenta una opción potencialmente útil en el tratamiento de estos pacientes y además a bajo costo.

11. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Paquette D, Falanga V. Leg ulcers Clin Geriat Med 2002;18;1;77-88
- 2.- Margolis D, Berlin J, Strom B. Risk Factors Associated With the Failure of a Venous Leg Ulcer to Heal Arch Dermatol 1999;135;920-6
- 3.- Eklof B, Rutherford R, Bergan J. et al. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: Consensus statement. Acta Fac Med Naiss 2008;25;1;3-10
- 4.- Bouza-Álvarez C, Sanz de León OM, Amate-Blanco JM. Efectividad de los Apósitos Especiales en el Tratamiento de las Úlceras por Presión y Vasculares. AETS. 2001; 1-103
- 5.- Lamoglia L, Vega-Memije ME. Eficacia del fitofármaco MTC-2G (Mimosa tenuiflora cortex) en el tratamiento de úlceras venosas en el departamento de dermatología del Hospital Dr. Manuel Gea González. Tesis para obtener el título de especialista en dermatología. 2009 México DF UNAM p.1-60
- 6.- Cytokines. En: Goldsby R, Kindt T, Osborne B. et al. Kuby' Immunology. 4th. Edition. Freeman New York 2000 p.303-27
- 7.- Theoharides TC, Bowcher W, Spear K. Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. Int Arch Allergy Immunol 2002;128;4;344-50

8.- Kumar, Robbins, Cotran. Pathologic Basis of Disease. Professional Edition 8th ed. McGraw-Hill New York

9.- Charles C, Romanelli P, Bonilla Z. et al. Tumor necrosis factor alfa in non-healing venous ulcers J Am Acad Dermatol 2009;60;851-55

10.- Nissen N, Polverini PJ, Koch A. et al. Vascular Endothelial Growth Factor Mediates Angiogenic Activity during the Proliferative Phase of Wound Healing Am J Pathol 1998;152;1445-52.

11.- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. Am J Pathol 1995;146:1029-39.

12.- Furness SG, McNagny K. Beyond mere markers: function of CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. Immunol Res 2006;34;1;13-32

13.- Berg EL, Mollouney AT, Andrew DP. et al. Complexity and differential expression of carbohydrate epitopes associated with L-selectin recognition of high endothelial venules. Am J Pathol 2006;152;2;469-77

14.- Susawa K, Kobayashi M, Sakai Y. et al. Preferential induction of peripheral lymph node addressin on high endothelial venule-like vessels in the active phase of ulcerative colitis. Am J Gastroenterol 2007;102;7;1499-509

15.- Kademani D, Lewis JT, Lamb DH. Et al. Angiogenesis and CD34 expression as a predictor of recurrence in oral squamous cell carcinoma. J Oral Maxillofac Surg 2009;67;9;1800-5

16.- Soares A, de Araujo VC, Juliano P. et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in recurrent pleomorphic adenoma J Oral Pathol Med 2009; 38; 623–629

- 17.- Ramirez-Amador G, Martínez Mata I, de Almeida OP. et al. Clinical, histological and immunohistochemical findings in oral Kaposi's sarcoma in a series of Mexican AIDS patients. Comparative study J Oral Pathol Med 2009;38;328–33
- 18.- Kalof AN; Cooper N. D2-40 immunohistochemistry so far. Adv Anat Pathol 2009;16;1;62-4
- 19.- Bellin C. Selective D2-40 lymphatic endothelium immunoreactivity in developing human fetal skin appendages. Lymphology 2009;42;2;1-5
- 20.- Soares AB. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in recurrent pleomorphic adenoma. J Oral Pathol Med 2009;38;8;623-9
- 21.- Tian YW. Cytokines and growth factors in keratinocytes and sweat glands in chronic venous leg ulcers. An immunohistochemical study. Wound Repair Regen 2003; 11;5; 316-25
- 22.- Dalton JS, Whiting CV, Bailey JR. et al. Mechanisms of Chronic Skin Ulceration Linking Lactate, Transforming Growth Factor- β , Vascular Endothelial Growth Factor, Collagen Remodeling, Collagen Stability, and Defective Angiogenesis. J Invest Dermatol 2007;127;958–68.
- 23.- Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y. et al. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. J Leukoc Biol 2003;73;713-21
- 24.- Beidler SK. Inflammatory cytokine levels in chronic venous insufficiency ulcer tissue before and after compression therapy J Vasc Surg 2009; 49(4);1013-20
- 25.- Gohel MS. The relationship between cytokine concentrations and wound healing in chronic venous ulceration. J Vasc Surg 2008; 48(5);1272-7

26.- Weyl A, Vanscheidt W, Weiss J. et al. Expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin and their ligands VLA-4 and LFA-1 in chronic venous leg ulcers JAAD 1996;34;418-23

27.- Eming S, Lauer G, Cole M. et al. Increased Levels of the Soluble Variant of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor VEGFR-1 Are Associated with a Poor Prognosis in Wound Healing. J Invest Dermatol 2004;123;799-802

28.- Murphy MA, Joyce WP, Condrón C, Bouchier-Hayes D. A Reduction in Serum Cytokine Levels Parallels Healing of Venous Ulcers in Patients Undergoing Compression Therapy Eur J Vasc Endovasc Surg 2002;23;4;349-52

29.- Cianfarani F. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor treatment of human chronic ulcers promotes angiogenesis associated with de novo vascular endothelial growth factor transcription in the ulcer bed. Br J Dermatol 2006; 154;1; 34-41

30.- Galkowska H, Olszewsk WL, Wojewodzka U. et al. Expression of apoptosis- and cell cycle-related proteins in epidermis of venous leg and diabetic foot ulcers. Surgery 2003; 134;2;213-208.- Moore K. Venous leg ulcers - the search for a prognostic indicator. Int Wound J 2007; 4;2; 163-72

31.- Stavri GT, Zachary IC, Baskerville PA. et al. Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells: synergistic interaction with hypoxia. Circulation 1995; 92;11-14.

32.- Wallace H, Stacey M. Levels of Tumoral Necrosis Factor alfa (TNF α) and TNF α soluble receptor in chronic venous leg ulcers- correlations to healing status J Invest Dermatol 1998;110;292-6

33.- Mori R, Kondo T, Ohshima T. Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice with reduced leukocyte infiltration Faseb J 2002;16;963-74.

34.- Freinkel RK, Woodley D. Cytokines in the skin. En: The biology of the skin. The Parthenon Publishing Group. 1st. Edition London 2001 p.299-332

12. ANEXOS

12.1 Anexo 1.

Hoja de captura de datos inmunohistoquímica (lectura ciega)

Hoja de captura protocolo-Ulceras venosas

Citocina _____

1

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

2

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

3

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

4

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

5

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

6

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

7

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

8

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

9

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

10

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

11

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

12

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

13

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

14

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

15

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

16

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

17

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

18

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

19

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

20

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

21

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

22

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

23

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

24

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

25

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

26

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

27

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

28

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

29

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

30

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

31

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

32

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

33

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

34

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

35

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

36

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

37

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

38

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

39

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

40

GRADO DE INMUNOTINCION: Nada, leve, moderado, intenso

TOPOGRAFIA: Borde de úlcera, lecho de la úlcera, vasos sanguíneos, epidermis, dermis

NOTA: A la topografía se le agregó también la categoría “infiltrado inflamatorio”

Anexo 2. Guía para lectura ciega de inmunohistoquímica (laminilla teñida con inmunomarcación) organizada como microarreglo:

GUIA				
1	9	17	25	33
2	10	18	26	34
3	11	19	27	35
4	12	20	28	36
5	13	21	29	37
6	14	22	30	38
7	15	23	31	39
8	16	24	32	40