ARTÍCULO

Expresión tisular y niveles séricos del factor de crecimiento y transformación beta-1 en estomatitis aftosa recurrente

Salus

Norma Pedreañez[1], Pablo Ochoa[1], Loida Ponce[1], Robert Tovar[1], Sarah Bethencourt[1], Magda Miret[2], Julie Verzura[1], José Corado[1] y Sioly Orta[1].

RESUMEN

La estomatitis aftosa recurrente (EAR) es una patología de la mucosa bucal, cuya fisiopatología parece estar relacionada con alteraciones de la cascada de citocinas. El factor de crecimiento y transformación beta-1 (TGFβ-1), es fundamental en esta cascada, por tal motivo, se determinaron sus niveles séricos y expresión bucal en pacientes portadores de esta patología. Fueron seleccionados 9 pacientes con diagnóstico de EAR, en fase aguda o en fase de remisión, y 5 individuos sanos, de quienes se obtuvo una muestra de sangre periférica y biopsia de la mucosa bucal, para determinar mediante inmunohistoquímica y ELISA la expresión tisular y los niveles séricos de la citocina. El TGFβ-1 se expresó en 100% de los pacientes en submucosa, epitelio y endotelio. En el grupo de controles sanos la expresión fue 40% en endotelio y 100% en submucosa y epitelio. El porcentaje de casos con EAR que expresó la citocina, de manera fuerte, en endotelio, fue significativamente mayor (p<0,05) que el porcentaje de casos que lo hizo de manera moderada o débil. La intensidad de expresión en los casos controles fue débil en todas las capas analizadas. Los niveles séricos de TGFβ-1 en los pacientes fueron significativamente mayores que los encontrados en el grupo control sano (P<0,05). Estos resultados sugieren que una alteración de la regulación local o sistémica de la síntesis o liberación de esta citocina podría estar implicada en la patogénesis de la EAR.

Palabras Clave: Estomatitis aftosa recurrente, factor de crecimiento y transformación beta-1, citocinas.

ABSTRACT

Tissue expression and serum levels of transforming growth factor beta-1in recurrent aphthous stomatitis

Recurrent aphthous stomatitis is an oral pathology associated with cytokine cascade alterations. Transforming growth factor beta-1 (TGFβ-1) is of the uttermost importance in this cascade. Hence, oral mucosal expression and serum levels of TGFβ-1 in patients with recurrent aphthous stomatitis were investigated. Nine patients with a diagnosis of recurrent aphthous stomatitis, in acute or remission phase, and five healthy controls were selected. Tissue expression (oral mucosal punch) and serum levels of this cytokine were determined using immunohistochemistry and ELISA techniques. TGFβ-1 was expressed in 100% of patients with recurrent aphthous stomatitis in epithelium, submucous and endothelium. In the control group, 40% of the cases expressed TGFβ-1 in endothelium and 100% in submucous and epithelium. The percentage of cases with recurrent aphthous stomatitis and strong endothelial expression of TGFβ-1 was significantly higher (P<0.05) than those with moderated and weak expression. The intensity of expression in the control group was weak in all layers. Serum levels of TGFβ-1 were significantly higher in patients than in the healthy control group (P <0.05). An alteration of systemic or local regulation of the synthesis or liberation of this cytokine could be implicated in the pathogenesis of recurrent aphthous stomatitis.

Key words: Recurrent aphthous stomatitis, transforming growth factor beta-1, cytokines.

[1] Unidad de Investigaciones en Inmunología (UNIVENIN). Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela.

[2] Unidad de Investigaciones Morfopatológicas. Facultad de Odontología. Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela

Correspondencia: Sioly de Orta

E-mai: sioly.orta@gmail.com

Recibido: Octubre 2009 **Aprobado:** Febrero 2010

INTRODUCCIÓN

La estomatitis aftosa recurrente (EAR) es una enfermedad inflamatoria crónica de la mucosa bucal, de naturaleza multifactorial y de etiología desconocida, con una prevalencia de 6 a 20% y más frecuente en adultos jóvenes. Su evolución se caracteriza por períodos de exacerbación y remisión (1,2).

En el desarrollo de la EAR han sido implicados factores inmunitarios, genéticos, endocrinos, infecciosos, metabólicos y el estrés (3-6). La activación anormal de la respuesta inmunitaria (RI) celular con alteración de la cascada de citocinas del tipo del factor de crecimiento y transformación beta-1 (TGF β-1) en la mucosa bucal, ha sido propuesta como hipótesis explicativa de la participación del sistema inmunitario (SI) en la patogenia de esta enfermedad (7-14).

TGFβ-1 es una citocina pleiotrópica que cumple una importante función en la resolución del proceso inflamatorio y en la reparación tisular (15). Su acción es variable, y depende de su localización y concentración. Localmente, en bajas concentraciones, tiene propiedades proinflamatorias (quimiotácticas) e inmunosupresoras (suprime la activación de linfocitos), mientras que, en altas concentraciones impide la resolución de la inflamación y favorece el desarrollo de fibrosis. Otras propiedades incluyen la regulación de la proliferación, adhesión, diferenciación celular y apoptosis (16-18).

Como es conocido que tanto la producción crónica de TGFβ-1 como su acumulación predispone a infecciones recurrentes con potenciación de la inflamación y desarrollo de lesiones fibróticas (17,19), se decidió investigar si existe una alteración de la síntesis y de la expresión local de esta citocina, en pacientes con EAR.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes. Se estudiaron 9 pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de EAR, en fase aguda (hasta seis semanas de duración) y en fase de remisión, durante un lapso de dieciocho meses. De los pacientes 6 eran de sexo femenino y 3 de sexo masculino. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: edad (21 - 35 años), 4 ó más episodios agudos de EAR al año, ausencia de patologías sistémicas y bucales, y no haber recibido tratamiento con agentes inmunosupresores en los tres meses previos a la toma de las muestras. El grupo control estuvo constituido por 5 individuos sanos, con edades comprendidas entre 21 y 35 años, 4 del sexo femenino y 1 del sexo masculino, sin antecedentes de lesiones bucales.

Recolección de muestras y procesamiento. Previo consentimiento informado se obtuvo, de todos los grupos en estudio (EAR en fase aguda, EAR en remisión y grupo control), una biopsia (punch) de lesiones localizadas en diferentes regiones de la mucosa bucal y de tejido sano. Para todos los grupos, la muestra fue tomada después de un ayuno previo, de al menos 3 horas. En el caso de los pacientes el tejido se obtuvo en los primeros tres días de aparición de la lesión y sin haberse aplicado ningún tipo de tratamiento tópico, anterior a la toma de la muestra. Las muestras fueron fijadas en una solución de formaldehído en PBS (pH 7,4) al 10%, y posteriormente incluidas en parafina.

Determinación inmunohistoquímica de la expresión tisular de TGFβ-1 Los bloques de tejido parafinado fueron cortados en secciones de 5 ∝m y colocados en láminas portaobjeto pre-tratadas con poli-L-lisina (PLL) (dilución 1/10). La inmunohistoquímica fue realizada según el método de la biotina-avidina-peroxidasa (Vector Lab., U.S.A.). Para ello, las secciones, previamente parafinadas y fijadas en formalina, fueron desparafinadas con xilol, rehidratadas y lavadas con PBS. Después de bloquear la actividad endógena de la peroxidasa con metanol-peróxido al 3% durante 5 min., y los sitios de enlace de las proteínas con suero de caballo normal durante 40 min., la muestra de tejido fue incubada (40 min.) con el anticuerpo monoclonal primario, anti-TGFβ-1 dilución 1/100 (Serotec, USA).

Después de lavar con PBS, las secciones de tejido fueron incubadas, a temperatura ambiente, durante 40 min., con un anticuerpo secundario, biotinado, antiinmunoglobulina humana (BHAM, Serotec, USA).

Se procedió a un segundo lavado y, posteriormente, se incubó con el complejo avidina-biotina-peroxidasa durante 15 min. La reacción fue revelada después de incubar con el cromógeno Novared (Vector Lab., U.S.A.), durante 4 min. Las secciones de tejido fueron coloreadas con hematoxilina Gill´s (Vector Lab., U.S.A) durante 5 min., lavadas y secadas. Finalmente, las láminas fueron cubiertas con un medio de inclusión rápida (Entellan de Merck, KGaA. Alemania) para microscopía. Los controles negativos fueron realizados con omisión del anticuerpo primario.

Las secciones de tejido que tomaron en las membranas plasmáticas de las células de la submucosa, epitelio y endotelio, un color marrón-rojizo fueron consideradas positivas. La ausencia de coloración (marrón-rojiza) y la intensidad de la misma, leve, moderada o intensa, en las mismas capas celulares, fueron registradas. Para ello se empleó la siguiente escala ordinal: nulo: 0 cruces (ausencia de color marrón); débil: + (color marrón claro); moderado: ++ (color marrón intenso); fuerte: +++ (color marrón-rojizo) (20). Tomando en cuenta los resultados anteriores, se valoró la intensidad total del marcaje del TGFβ-1 en cada una de las láminas mediante la siguiente escala ordinal: débil: 1-4 puntos; moderado: 5-7 puntos; fuerte: 8-9 puntos. Los puntos equivalen a la sumatoria de las cruces obtenidas en las tres regiones analizadas (submucosa, epitelio y endotelio).

Determinación de las concentraciones séricas de TGFβ-1 (ELISA). Se tomaron muestras de sangre (5mL) a los pacientes, en fase aguda o remisión, y al grupo control. Se obtuvo el suero y alícuotas del mismo fueron almacenadas a -70 ºC hasta el momento de realizar las determinaciones.

Se obtuvieron las concentraciones séricas de TGFβ-1 siguiendo las instrucciones del kit comercial (Quantikine, R&D Systems, USA) para ELISA. La lectura se realizó a 450 nm con filtro diferencial de 600 nm.

Análisis estadístico. Los resultados de la inmunohistoquímica fueron expresados en frecuencias relativas de expresión ± error estándar, tomando en cuenta la localización (capa) y la intensidad de la expresión. Se utilizó la prueba Z para comparar porcentajes. Se calcularon las medias aritméticas y el error estándar de las concentraciones séricas de TGFβ-1 y se compararon las medias usando la *t*-Student. Se consideraron significativos los valores de P<0,05.

RESULTADOS

TGFβ-1 se expresó en la totalidad de los individuos estudiados (grupo control y pacientes). En la figura 1 se muestran las secciones teñidas de la mucosa bucal. En la Fig. 1, la fotografía Nº 1 muestra la típica coloración violeta correspondiente a ausencia de expresión de TGFβ-1. Las fotografías 2, 3 y 4 representan la expresión débil, moderada y fuerte de la citocina en submucosa, epitelio y endotelio.

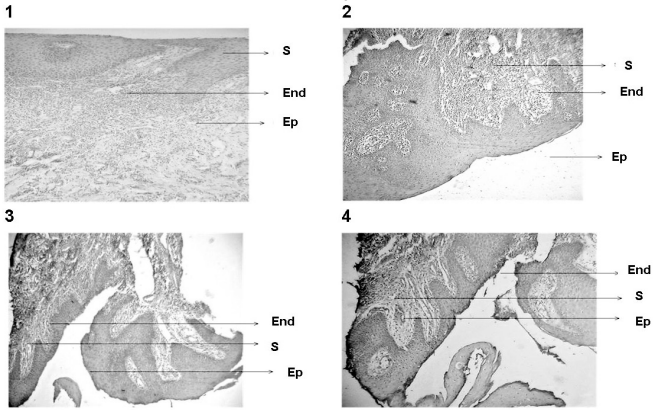

Fig 1. Expresión de TGF beta-1 en endotelio, submucosa y epitelio en mucosa oral de pacientes con estomatitis aftosa recurrente: 1: control negativo; 2: expresión débil de TGF-beta-1, en todas las capas; 3: expresión moderada en epitelio y fuerte en submucosa y endotelio; 4: expresión fuerte en epitelio y moderada en submucosa y endotelio (40X). (S: submucosa, End.: endotelio, Ep.: epitelio)

Al discriminar la expresión por capas se observó que los 9 (100%) de los pacientes expresaron TGFβ-1 en submucosa, epitelio y endotelio. El grupo control sano 5 (100%) la expresó en epitelio y submucosa y 2 (40%) en endotelio (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia relativa de expresión de TGF beta 1 en estomatitis aftosa recurrente (EAR)

Capas	Pacientes (n)	%	Controles Sanos (n)	%
Epitelio	9	100	5	100
Submucosa	9	100	5	100
Endotelio	9	100	2	40

En los pacientes, la intensidad de expresión de la citocina varió en cada una de las capas analizadas. En la Tabla 2 se muestra la intensidad de expresión de TGFβ-1, por capas, en pacientes y controles, observándose en la submucosa de los pacientes que, la expresión fue fuerte en 33,3% de casos, moderada en 44,4% y débil en 22,2%, de igual manera, en el epitelio 44,4% de los casos la expresó de manera fuerte, 33,3% de manera moderada y 22,2% de manera débil.

Tabla 2. Frecuencia relativa de expresión de TGF beta 1, en mucosa bucal según intensidad, en pacientes con estomatitis aftosa recurrente (EAR)

Capas	Intensidad de expresión	Pacientes (n)	%	Controles (n)	%
Epitelio	Fuerte	4	44,4	0	0
	Moderada	3	33,3	0	0
	Débil	2	22,2	9	100
Submucosa	Fuerte	3	33,3	0	0
	Moderada	4	44,4	0	0
	Débil	2	22,2	9	100
Endotelio	Fuerte	6	66,6	0	0
	Moderada	1	11,1	0	0
	Débil	2	22,2	9	100

Cuando se comparó la intensidad de expresión por capa, entre pacientes y controles, se observó que, en epitelio y endotelio el porcentaje de pacientes que expresó TGFβ-1 con fuerte intensidad, fue significativamente mayor que el de los controles sanos (P<0,05). Todos los casos del grupo control mostraron una intensidad de expresión débil, en todas las capas analizadas.

Las concentraciones séricas de TGFβ-1 (fig. 1) en fase aguda y en fase de remisión fueron 1.835,6 ± 495,9 pg/dL y 1.805,8 ± 388,1 pg/dL, respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos (P> 0,05). Al comparar el grupo de pacientes con el grupo control sano (1.414 ± 66,7 pg/dL) se observó que las concentraciones séricas de TGFβ-1 fueron significativamente mayores en los pacientes, fase aguda y remisión, que en el grupo control sano (P<0,05).

DISCUSIÓN

Las lesiones ulcerosas de la EAR son procesos inflamatorios cuya etiopatogenia no está completamente dilucidada; algunos factores desencadenantes incluyen alteraciones inmunológicas, infecciones, traumas, factores psicológicos, genéticos y medioambientales. Se ha propuesto que la EAR puede ser la consecuencia de una alteración de la RI contra elementos no patógenos de la flora de la mucosa bucal del hospedador, o bien una alteración de la síntesis de citocinas proiinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF-β) y antiinflamatorias como el TGFβ-1, y de la inmunidad celular contra áreas de la mucosa bucal (17,19,21-24). Asimismo, otros reportes sugieren que las alteraciones de la síntesis, expresión y función de citocinas como el factor de crecimiento epidérmico, TGFβ-1, y prostaglandinas como E2, pueden estar implicadas en la patogenia de enfermedades multifactoriales, tan variadas como EAR, psoriasis y fibrosis pulmonar (25-27). En un estudio *In vitro* se reportó que, en el sobrenadante de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con EAR, hubo un incremento de la producción de citocinas proiinflamatorias (Il-2, IFNγ, TNFα, IL-5, IL-6 e IL-8) con disminución de las antiinflamatorias (IL-10 y TGFβ-1) en comparación con individuos sanos (22). En este trabajo se demuestra que TGFβ-1 se expresa en mucosa normal y patológica, con una intensidad de expresión variable en las diferentes capas de la mucosa en pacientes con EAR, así mismo, que sus niveles séricos son significativamente mayores en pacientes con EAR que en el grupo control sano, en contraposición con lo reportado por Lewkowicz, N. y col (22).

Estos hallazgos al igual que los de otros investigadores (8,9,21,22) sugieren que alteraciones de la regulación, sistémica y en la mucosa bucal, de la cascada de las citocinas, puede efectivamente generar un microambiente potencialmente patogénico, que favorecería la aparición y recurrencia de lesiones en los pacientes con EAR. Este es, hasta se conoce, el primer reporte sobre la determinación conjunta de niveles séricos y expresión de TGFβ-1 en mucosa bucal de pacientes con EAR.

AGRADECIMIENTO: *Al Dr. Marco Tulio Mérida (†), quien aportó ideas y conocimientos, y dio un invalorable impulso al desarrollo del presente trabajo.*

BIBLIOGRAFÍA

1. Hornstein OP. Aphtae and aphthous lesions of the mouth mucosa. HNO. 1998; 46: 102-111
2. Toche P, Salinas J, Guzmaán A, Afani A y Jadue N. Úlceras orales recurrentes: clínicas y diagnóstico diferencial. Rev Chil Infect.2007; 24(3): 215-219
3. Sistigs S, Cekic-Arambasin A, Rabatic S, Vucicevic-Boras V, Hleinheinz S and Piffko J. Natural immunity in recurrent aphthous ulceration. J Oral Pathol Med 2001; 30:275-280
4. Greenberg MS and Pinto A. Etiology and management of recurrent aphthous stomatitis. Curr Infect Dis Rep 2003; 5:194-198
5. Buno IJ, Huff JC, Weston WL, Cook DT and Brice SL. Elevated levels of interferon gamma, tumor necrosis factor alpha, interleukins 2, 4, and 5, but not interleukin 10, are present in recurrent aphthous stomatitis. Arch Dermatol 1998; 134: 827-831
6. Sun A, Chu CT, Liu BY, Wang JT, Leus GS and Chiang CP. Expression of interleukin-2 receptor by activated peripheral blood lymphocytes upregulated by the plasma level of interleukin-2 in patients with recurrent aphthous ulcers. Proc Natl Sci Counc Repub China B. 2000; 24:116-122
7. Bachtiar EW, Cornain S, Siregar B and Raharjo TW. Decreased CD4+/CD8+ ratio in major type of recurrent aphthous ulcers: Comparing major to minor types of ulcers. Asian Pac J Allergy Immunol. 1998; 16:75-79
8. Natah SS, Hayrinen-Immonen R, Hietanen J, Malmstrom M and Konttinen YT. Immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha expressing cells in recurrent aphthous ulcer lesions. J Oral Pathol Med. 2000; 29:19-25
9. Borra C, Andrade PM, Silva ID, Morgun A, Weckx LL, Smirnova AS and Franco M. The Th1/Th2 immune-type response of the recurrent aphthous ulceration analyzed by cDNA microarray. J Oral Pathol Med. 2004; 33:140-146
10. Sun A, Chang YF, Chia JS and Chiang CP. Serum interleukin-8 level is a more sensitive marker than serum interleukin-6 level in monitoring the disease activity of recurrent aphthous ulcerations. J Oral Pathol Med. 2004; 33:133-139
11. Brozovic S, Vucicevic-Boras V, Mravak-Stipetic M, Kleinheinz and Lukac J. Salivary levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in recurrent aphthous ulceration. J Oral Pathol Med. 2001; 31:106-108
12. Borra RC, de Mesquita Barros F, de Andrade Lotufo M, Villanova FE, Andrade PM. Toll-like receptor activity in recurrent aphthous ulceration. J Oral Pathol Med. 2009; 38 (3):289-298.
13. Aminabadi NA. Plasma rich in growth factors as a potential therapeutic candidate for treatment of recurrent aphthous stomatitis. Med Hypotheses. 2008; 70 (3):529-531.
14. Bazrafshani MR, Hajeer AH, Ollier WE and Thornhill MH. IL-1beta and IL-6 gene polymorphisms encode significant risk for the development of recurrent aphthous stomatitis (RAS). Genes Immun. 2002; 3:302-305
15. Barnard JA, Lyons RM and Moses HL. The cell biology of transforming growth factor beta. Biochem Byophys Acta. 1990;1:79-87
16. Roberts AB and Spoorn MB. Regulation of endothelial cell growth, architecture and matrix synthesis by TGF-beta. Am Rev Respir Dis 1989;140:1126-1128
17. Wahl SM, Costa GL, Mizel DE, Allen JB, Skaleric U and Mangan DF. Role of transforming growth factor beta in the patophysiology of chronic inflammation. J Periodont. 1993; 64 (5 Suppl):450-455
18. Miyazono K and Heldin CH. Structure, function and possible clinical aplication of transforming growth factor-beta. J Dermatol. 1992;19:644-647
19. Antóon JW and Miller RL. Aphthous Ulcers: A survey of published studies on their ethiology, pathogenesis, diagnosis and treatment. Chir Dent Fr. 1981; 51:45-49
20. Schillin B and Yeh J. Transforming growth factor-b1, -b2, -b3 and their type I and II receptors in human term placenta. Gynecol Obstet Invest. 2000; 50: 19-23
21. Lewkowicz N, Lewkowicz P, Kurnatowska A, Banasik M, Glowacka E, Cedzynski M, Swierzko A, Lauk-Puchala B, Tchorzewski H. Innate immune system is implicated in recurrent aphthous ulcer pathogenesis. J Oral Pathol Med. 2003; 32:475-481
22. Lewkowicz N, Lewkowicz P, Banasik M, Kurnatowska A and Tchorzewski H. Predominance of type 1 cytokines and decreased number of CD4(+)CD25(+high) T regulatory cells in peripheral blood of patients with recurrent aphthous ulcerations. Immunol Lett. 2005; 99(1): 57-62
23. Vicente M, Soria A, Mosquera A, Perez J, Lamas A, Castellano T and Ramos A. Immunoglobulin G subclass measurements in recurrent aphthous stomatitis. J Oral Pathol Med. 1996; 25:538-540.
24. Piskin S, Sayan C, Durukan N and Senol M. Serum iron, ferritin, folic acid and vitamin B12 levels in recurrent aphthous stomatitis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2002; 16:66-67
25. Wu-Wang CY, Patel M, Feng J, Milles M and Wang SL. Decreased levels of salivary prostaglandin E2 and epidermal growth factor in recurrent aphthous stomatitis. Arch Oral Biol. 1995; 40:1093-1098.
26. Cai JP, Falange V, Taylor JT, and Chin YH. Transforming growth factor–beta receptor binding and function are decreased in psoriatic dermal endothelium. J Inv Dermatol. 1996; 106:225-234
27. Lee CG, Cho SJ, Kang MJ, Chapoval SP, Lee PJ, Noble PW, Yehualaeshet T, Lu B, Flavell RA, Milbrandt J, Homer RJ and Elias JA. Early growth response gene 1 mediated apoptosis essential for transforming growth factor beta-1 induced pulmonary fibrosis. J Exp Med. 2004; 200: 377-389.