

Panorama. Cuba y Salud 2019;14(1): 99-106

Recibido: 30 de octubre de 2018
Aprobado: 16 de noviembre de 2018

Versión electrónica ISSN: 1991-2684, RNPS: 2136
Versión impresa ISSN: 1995-6797, RNPS: 0560

(Artículo de revisión)

Cuantificación por inmunomicroscopía electrónica del efecto terapéutico del EGF en úlceras del pie diabético

MARITZA GONZÁLEZ BRAVO¹, NELSON ACOSTA RIVERO³, SIRENIA GONZÁLEZ POZOS⁴,
JUAN KOURÍ FLORES⁴, JORGE BERLANGA ACOSTA², VIVIANA FALCÓN CAMA².

¹Escuela Latinoamericana de Medicina, Habana, Cuba. ²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), La Habana, Cuba. ³Centro para el estudio de proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba. ⁴Unidad de Microscopía Electrónica, LaNSE, Cinvestav-IPN. Av. IPN San Pedro Zacatenco, México.

Cómo citar este artículo:

González Bravo M, Acosta Rivero N, González Pozos S, Kourí Flores J, Berlanga Acosta J, Falcón Cama V. Cuantificación por inmunomicroscopía electrónica del efecto terapéutico del EGF en úlceras del pie diabético. Rev Panorama. Cuba y Salud [Internet]. 2019 [citado]; 14(1):99-106. Disponible en: <http://www.revpanorama.sld.cu/index.php/rpan/article/view/>

RESUMEN

Introducción: la Inmunomicroscopía electrónica cuantitativa se aplicó recientemente en el estudio de la cuantificación de las distribuciones de determinadas proteínas en diferentes organelos celulares en fibroblastos de Úlceras de pie diabético tratados con el Factor de crecimiento epidérmico en humanos.

Objetivo: el presente se enfoca en los resultados relacionados con una molécula clave [el antígeno nuclear de proliferación celular] en la señalización inducida por el Factor de crecimiento epidérmico.

Desarrollo: las muestras de Úlceras de pie diabético se analizaron por la inmunomicroscopía electrónica cuantitativa. Las referencias se obtuvieron de la Base de datos Pubmed. En concordancia con una afectación funcional de la señalización mediada por el Factor de crecimiento epidérmico en el tejido de granulación de los individuos diabéticos, se observó poca detección del antígeno nuclear de proliferación celular en los fibroblastos. No obstante, el tratamiento de las Úlceras de pie diabético con el Factor de crecimiento epidérmico indujo una activación temprana del antígeno nuclear de proliferación celular en el núcleo de los fibroblastos de las Úlceras de pie diabético. Se observó, además, un incremento en el inmunomarcaje del antígeno nuclear de proliferación celular en las mitocondrias de los fibroblastos en tiempos tardíos después de la inoculación del Factor de crecimiento epidérmico.

Conclusiones: esta investigación demostró la utilidad y el valor de la cuantificación de las distribuciones de inmunomarcaje en organelos celulares para el estudio de las vías de señalización intracelulares de relevancia terapéutica.

Palabras clave: Inmunomicroscopía electrónica; úlceras de pie diabético; factor de crecimiento epidérmico; antígeno nuclear de proliferación celular.

INTRODUCCIÓN

Una metodología para cuantificar la localización del inmunomarcaje de moléculas obtenidas por inmunomicroscopía electrónica (IME) ha mostrado ser una herramienta útil para el análisis de las distribuciones intracelulares de moléculas de interés biológico.^(1,2) Esta, se basa en los principios de muestreo riguroso, la estimación estereológica y los procedimientos de la evaluación estadística. Además, permite establecer el marcaje preferencial de determinados organelos dentro de una célula o los cambios en los patrones de marcaje asociados con un tratamiento experimental. Esto se obtiene mediante la comparación de las distribuciones de marcaje con partículas de oro de los organelos dentro de

una célula y entre diferentes grupos de ellas. Teniendo en cuenta que esta metodología se aplica con la utilización de la microscopía electrónica de transmisión (MET), las distribuciones espaciales de las moléculas se pueden mapear en el contexto de la ultraestructura celular. De esta forma se puede monitorear de forma eficiente el tráfico intracelular de las proteínas estudiadas y obtener detalles de la ultraestructura de la célula al mismo tiempo. Por esto se plantea la hipótesis de que esta metodología pudiera ser relevante para el estudio de vías de señalización intracelular de interés terapéutico.

Las ulceraciones de las extremidades inferiores y el riesgo asociado de amputación son complicaciones importantes de la diabetes,⁽³⁻⁵⁾ como consecuencia, la diabetes se considera la causa principal de las amputaciones de las extremidades

inferiores.⁽⁶⁾ La afectación del proceso de curación también es una consecuencia importante de la diabetes,⁽⁷⁾ se considera que la hiperglucemia persistente con un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno están involucradas en el daño crónico del tejido, en una respuesta a la curación de heridas (RCH) aberrante y otras complicaciones de la diabetes.^(8,9) Las células semejantes a fibroblastos (FLCs) (subpoblaciones de fibroblastos que incluye a los miofibroblastos) tienen un papel importante en la RCH mediante su capacidad de proliferar, de expresar citoquinas, quimoquinas, factores de crecimiento y secretar proteasas y proteínas de la matriz extracelular.^(10,11,12) Una característica importante de la UPD es que las funciones de los fibroblastos están afectadas.^(13,14,15) Además, una vía de señalización fundamental en la RCH [relacionada con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su receptor (EGFR)] está afectada en la UPD.^(16,17,18)

En la actualidad nuestro grupo está aplicando la IME cuantitativa en el estudio de la respuesta biológica en pacientes con UPD de la terapia basada en el EGF utilizando una composición disponible comercialmente (Heberprot-P, HeberBiotec S.A., Habana, Cuba).⁽¹⁹⁾ Un estudio reciente mostró que la expresión del EGFR y el PCNA está afectada en los fibroblastos presentes en el tejido de granulación de los individuos diabéticos.⁽¹⁴⁾ PCNA es una proteína multifuncional involucrada en la replicación y la reparación del ADN nuclear, en la recombinación del ADN mitocondrial y en las enfermedades autoinmunes y el cáncer.^(20,21,22) Las distintas funciones del PCNA dependen de su localización y el microambiente celular. Resultó notable el hallazgo de que la infiltración del EGF en las UPDs ya que induce una fuerte activación de la vía de señalización relacionada con el EGFR y un incremento del PCNA en el núcleo de los fibroblastos en las etapas tempranas del tratamiento (entre 15 y 60 min). Por otra parte, se observó que en etapas tardías del tratamiento (entre 6 y 24 horas), el PCNA se detectó de manera fundamental en las mitocondrias de los fibroblastos. Estos descubrimientos indicaron, por vez primera, la relación entre la localización del PCNA en el núcleo y en la mitocondria y el efecto terapéutico del tratamiento con el Heberprot-P en las UPDs. Asimismo, resaltan el valor de aplicar la IME cuantitativa en el estudio de las vías de señalización intracelulares de interés terapéutico.

DESARROLLO

Cuantificación de las distribuciones de los antígenos marcados en los diferentes compartimentos celulares

La evaluación de las distribuciones intracelulares de los antígenos marcados con partículas de oro coloidal se basa en un procedimiento robusto de muestreo, la estimación estereológica y el análisis estadístico. Los diferentes métodos de IME cuantitativos y sus aplicaciones se han descrito en diferentes artículos de revisión.^(23,24) Este trabajo se enfoca en los métodos estereológicos que se utilizan para analizar y cuantificar la localización celular del PCNA antes y después del tratamiento con el EGF en las UPDs.

Muestreo aleatorio de los especímenes experimentales

En el diseño de los experimentos de IME cuantitativa se deben tener en cuenta varias consideraciones importantes como la variabilidad intrínseca de los especímenes biológicos (ej. células y tejidos). Otro aspecto importante es que las estructuras biológicas tienden a variar en apariencia, en dependencia a su posición, (heterogeneidad) y a su orientación (anisotropía).^(25,26)

La MET y la IME analizan secciones de cortes ultrafinos (40–80nm de grosor) para revelar la estructura interna del espécimen con un alto nivel de resolución. Entre las consecuencias de utilizar secciones ultrafinas a partir de estructuras tridimensionales se encuentran:

- 1-) Solo se puede analizar una fracción muy pequeña de cada espécimen;
- 2-) hay pérdida de la información dimensional en la imagen ultraestructural;
- 3-) las áreas, longitudes o los números de estructuras celulares en las imágenes observadas en los planos de las secciones ultrafinas varían en dependencia de la posición y la orientación de estos planos.

Estos factores apoyan la necesidad de seleccionar varios elementos de cada muestra para abarcar una amplia gama de posiciones y orientaciones dentro del espécimen. Debido a esto, se requiere de un esquema de muestreo al azar en cada etapa para el análisis ultraestructural. Esto permite que cada parte y orientación del espécimen tenga la misma posibilidad de selección.

Este proceso produce bloques y a partir de estos, secciones ultrafinas que después de escaneadas generan campos de visión (CV) para ser analizados por MET. La figura 1A muestra el esquema que se utilizó para el estudio de la distribución intracelular del PCNA en los fibroblastos de las UPDs y los pasos en un esquema de muestreo al azar de las múltiples etapas seguido de una cuantificación estereológica.

Primero se selecciona un conjunto de especímenes a partir de las UPDs. Estos se fijan y cortan en fragmentos sucesivos. Se incluyen en la resina (Lowicryl) para formar los bloques; sobre estos se realizan los cortes ultrafinos (secciones) que se seleccionan y se preparan en rejillas para la IME. Después se seleccionan las secciones y los campos de visión (CV) que se visualizan. En los CV se realiza la cuantificación estereológica para contar las partículas de oro y los puntos de prueba en los organelos de volumen (OV). Las frecuencias obtenidas se comparan posteriormente mediante un análisis de tablas de contingencia. En cada paso se realiza una aleatorización de la localización de la muestra (muestreo sistemático uniforme al azar (SUA)).

Se propuso que en este tipo de esquema, se deben obtener al menos dos bloques de tejido por cada espécimen; cada bloque debe generar un mínimo de dos secciones ultrafinas bien separadas y al menos dos CV por

sección.⁽²³⁾ Finalmente, se cuentan las partículas de oro en los diferentes organelos. En este paso la utilización de puntos de prueba estereológicos permite la comparación estadística entre los organelos dentro de una célula o una población de células similares.

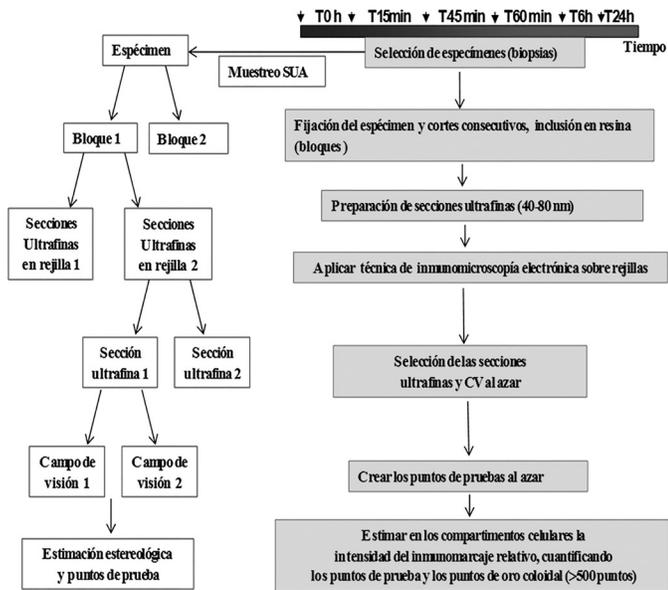


Figura 1 A. Flujo de trabajo de la IME cuantitativa para el estudio del tráfico intracelular del PCNA y pasos en un esquema de muestreo al azar de las múltiples etapas seguido de una cuantificación estereológica.

El muestreo al azar de los especímenes es un requerimiento crítico en cada paso del proceso.(Figura 1B)

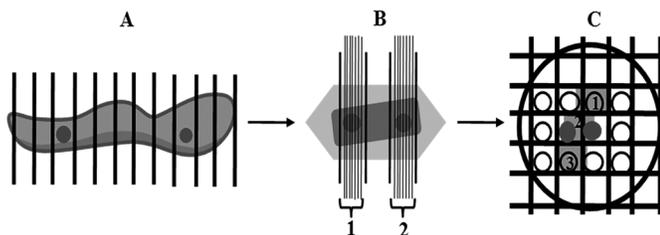


Figura 1 B. Ilustración de la cascada de muestreo SUA en múltiples etapas para el estudio del tráfico intracelular del PCNA.

Leyenda: los círculos rojos representan las muestras seleccionadas para el siguiente paso de muestreo. A) El espécimen de la UPD se corta en partes consecutivas de las que se selecciona una de cada seis fragmentos cortados (un mínimo de dos fragmentos bien separados dentro del espécimen). Estos se someten a un muestreo SUA (no mostrado) para obtener fragmentos de tejido que se incluyen en la resina (Lowicryl) y se obtienen los bloques. B) En cada bloque se superpone una red de líneas (líneas gruesas) para seleccionar un grupo de secciones ultrafinas (líneas finas, 1 y 2), en este caso se seleccionaron cada dos espacios entre las líneas gruesas superpuestas (círculos rojos) (un mínimo de dos grupos de cortes ultrafinos bien separados dentro del bloque). C) En este ejemplo una tira de tres cortes ultrafinos de MET están colocadas sobre un fragmento de rejilla de níquel donde se obtuvo un muestreo SUA de los campos de visión (CV) en una de las secciones ultrafinas (sección 2).

Resulta importante destacar que se considera que el muestreo sistemático uniforme al azar (SUA) es más eficiente que el muestreo independiente al azar. Esto resulta relevante para el análisis de los especímenes heterogéneos

ya que permite abarcar el espécimen completo de una forma más uniforme.^(27,28) En el muestreo SUA se aleatoriza la posición y la orientación del primer elemento, mientras que a partir de un patrón pre-determinado (el intervalo del muestreo) se determinan las posiciones y las orientaciones de los otros elementos. No obstante, para evitar la ineficiencia en el muestreo, el intervalo del mismo no debe coincidir con algún patrón natural de la periodicidad presente dentro del espécimen.⁽²⁸⁾

Cuantificación de las partículas de oro coloidal y la definición de los organelos a estudiar

En general, los compartimentos ultraestructurales pueden incluir aquellos organelos que ocupan un determinado volumen en la célula (OVs) (ejemplos: Mitocondria, núcleo, complejo de golgi, entre otros) y las membranas que abarcan una superficie determinada en la célula (OSs) (ejemplos: membranas mitocondriales, membranas de las cisternas del retículo endoplasmático rugoso, entre otros). Es interesante destacar que cuando solo se estudian OVs resulta suficiente realizar la aleatorización de las posiciones dentro del espécimen. Sin embargo, cuando se investigan los OSs o la mezcla de OVs y OSs, se debe realizar la aleatorización de posición y orientación. En este trabajo de investigación se estudió la cuantificación de la localización intracelular del PCNA en varios OVs por lo que solo se realizó la aleatorización de la posición dentro de los especímenes.

Métodos para la cuantificación de las partículas de oro coloidal

En este trabajo se utilizaron dos métodos para el estudio del tráfico intracelular del PCNA.⁽¹⁴⁾

Método 1: Comparación de las distribuciones de las partículas de oro entre los diferentes organelos dentro de una célula o población de células similares

El objetivo de este método es demostrar si la distribución observada de partículas de oro entre los diferentes organelos dentro de una célula (o población de células similares) es al azar o no.⁽²⁾ Primero se debe seleccionar el conjunto de organelos que se van a estudiar en dependencia al objetivo del estudio (OVs en este trabajo). Después se cuentan las partículas de oro coloidal presentes en los diferentes compartimentos celulares de todos los CV seleccionados. Esto constituye la distribución de la frecuencia de los conteos de las partículas de oro y representa la distribución observada en cada organelo (No).

Un procedimiento adecuado para simular una distribución al azar sobre la superficie de una sección fina de MET es la aplicación de un principio básico de estereología (Figura 2): un grupo de puntos superpuestos al azar sobre planos de secciones ultrafinas de manera aleatoria se localizan en los organelos dependiendo de las áreas relativas de estos. La localización de estos puntos en cada compartimento celular (organelo) representa la distribución que se debe esperar si las partículas de oro estuvieran dispersas al azar a través de la célula. Por esto, la correspondiente distribución de partículas de oro esperada en cada organelo (Ne) se puede

determinar como sigue: $Ne = \text{número de puntos de prueba en ese organelo (Ppo)} \times \text{número total de partículas de oro observadas en la célula (Pot)} / \text{número total de puntos de prueba en la célula (Ppt)}$. $Ne = Ppo \times Pot / Ppt$.

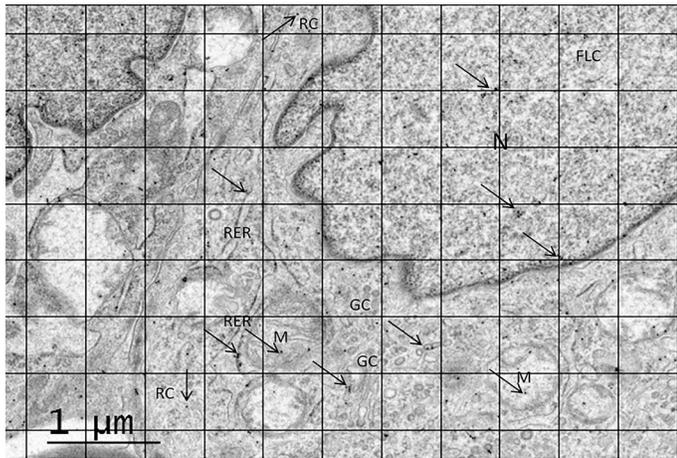


Figura 2. Cuantificación estereológica para analizar el marcaje preferencial en compartimentos de volumen (OVs) dentro de una célula (Método 1).

Esta imagen muestra un ejemplo de cuantificación estereológica en una célula semejante a fibroblasto (FLC) presente en parte de un campo de visión (CV) seleccionado al azar a partir de secciones ultrafinas de una UPD y utilizando el programa Imagen J 1.48v. Primero se cuentan las partículas de oro coloidal (flechas) presentes en los OVs (núcleo (N), retículo endoplasmático rugoso (RER), complejo de golgi (GC), mitocondria (M), resto del citoplasma (RC)) que representan la distribución observada (No). Para evaluar si hay algún OVs que está marcado de forma preferencial, se simula una distribución esperada aleatoria de partículas de oro mediante la superposición y el conteo de puntos de prueba (puntos de intersección en cada cuadro) en los organelos. Posteriormente se comparan las distribuciones observadas y esperadas de las partículas de oro mediante un análisis de tabla de contingencia y Chi-cuadrado.

A partir de las dos distribuciones se puede calcular el índice de marcaje relativo (RLI) para cada organelo como sigue: $RLI = No / Ne$. Se espera que el RLI sea igual a 1 cuando las No son al azar y mayor que 1 cuando hay un marcaje preferencial en un organelo particular. Una forma alternativa de calcular RLI consiste en comparar los valores de densidad de marcaje (LD) de los organelos estudiados (LDo) con la LD de la célula (LDcel): LDo / LD_{cell} . Los valores de LD de cada OV se pueden expresar como: $LDo = No / Ppo$; los de la célula como: $LD_{cell} = Pot / Ppt$; y $RLI = LDo / LD_{cell}$.

Una prueba estadística apropiada para evaluar el nivel de significación entre las distribuciones observadas y esperadas de las partículas de oro (ordenadas en columnas), dentro de un grupo de estudio con "r" compartimentos celulares (ordenadas en filas), es la prueba chi-cuadrado (X^2) de dos muestras con r-1 grados de libertad. Para un compartimento dado, el valor parcial de X^2 se calcula como: $X^2 = (No - Ne) / 2$

Ne. Entonces, se debe calcular el valor total de X^2 (suma de los X^2 parciales) para determinar si se acepta o no la hipótesis nula (de no diferencias entre las distribuciones o que la distribución de partículas de oro observadas es aleatoria) para r-1 grados de libertad. Se debe tener en cuenta que este análisis es válido si: a) los compartimentos que tienen entre 1-5 de Ne no son más del 20% de los compartimentos estudiados; b) ningún valor de Ne debe ser <1. Si las No y Ne son diferentes, entonces se pueden identificar los organelos con marcaje preferencial como se describió anteriormente.(2) Para esto se establecieron dos criterios a cumplir: 1) el valor de RLI debe ser >1; 2) el valor parcial de X^2 correspondiente, debe contribuir de forma importante al valor total de X^2 (aproximadamente el 10% de X^2 total).

Marcaje preferencial del PCNA en los OVs dentro de las células semejantes a fibroblastos (FLCs)

La tabla 1 muestra el ejemplo de la aplicación de este método en la cuantificación del marcaje del PCNA dentro de diferentes compartimentos de la población de las FLCs analizadas a T15-60. En este trabajo las secciones ultrafinas del tejido de granulación se incubaron con un anticuerpo monoclonal IgG de ratón específico para el PCNA seguido del marcaje con anticuerpos IgG anti-ratón acoplados a oro coloidal (15 nm). Todas las secciones se tiñeron y analizaron por MET como se describió anteriormente.(14)

Tabla 1. Índice de marcaje relativo (RLI) para PCNA marcado con partículas de oro en diferentes compartimentos de la población de células semejantes a fibroblastos (FLCs) analizadas entre T15 y T60 después del tratamiento con EGF.Uriurae patum ta tam simus

Compartimento	No	Tpc	LDc (No/Tpc)	RLI (LD/LDcell)	Ne	χ^2	χ^2 as %
ER+GC	184	137	1,34	1,34	136	16,54	66,84
M	35	27	1,29	1,30	27	2,44	9,86
RC	300	343	0,87	0,87	342	5,09	20,56
N	273	288	0,94	0,95	287	0,67	2,72
Total	792	795	0,99		792	24,74	100

Para grados de libertad (gl)= 3 (2-1 columnas x 4-1 filas), y valores totales de X^2 para PCNA, (X^2)=24,74, $P < 0,001$. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula ya que los patrones de inmunomarcaje difieren significativamente de una distribución al azar. El inmunomarcaje de ER+GC (RLI=1,34 y 66,84% de X^2 total) y mitocondria (RLI=1,29 y 9,86% de X^2 total) cumplieron con los dos criterios de marcaje preferencial: 1) RLI es mayor que 1, y 2) los valores parciales de X^2 tienen una contribución substancial en el X^2 total, $X > 10\%$. RLI; Índice de marcaje relativo; X^2 : valores de chi-cuadrado. X^2 %: valores de chi-cuadrado expresados como por ciento. Retículo endoplasmático (ER); complejo de golgi (GC); Mitocondria (M); Resto del Citoplasma (RC); Núcleo (N).

El ejemplo de la figura 3 es de un espécimen de UPD obtenido en un tiempo temprano (T45) después del tratamiento con EGF. Note que el PCNA se localizó fundamentalmente en las mitocondrias, en el retículo endoplasmático, en el complejo de golgi y en el núcleo.

Para evaluar si la distribución de las partículas de oro observadas entre los organelos dentro de las FLCs fue aleatoria o no, se seleccionaron varios OVs para este estudio. Se contaron las partículas de oro en cada compartimento

celular (No) [retículo endoplasmático (ER) y complejo de golgi (GC) (ER+GC), mitocondria (M), núcleo (N) y resto del citoplasma (RC) (incluye el resto de los compartimentos residuales en el citoplasma) utilizando el programa ImageJ 1.48v (sitio web: rsb.info.nih.gov/ij/).

Después se sobreponen un conjunto de puntos al azar sobre todos los compartimentos celulares que se cuentan ('Puntos de prueba', Ppo) para cada organelo utilizando el programa ImageJ 1.48v como se muestra en la Figura 2. Los valores de Ne (distribución al azar) y RLI de cada compartimento se calculan como se describe para el método 1.

La tabla 1 ilustra el análisis de X^2 de dos muestras con dos columnas (No y Ne) y "r" compartimentos celulares (ordenados en filas) que se utilizó para comparar No y Ne calculados en la población de FLCs analizadas en T15-T60 (Figura 4A). Para los datos mostrados en esta tabla, el valor total de X^2 es 24,74 y para 3 grados de libertad el nivel de significación es $P < 0,001$. Esto significa que se rechaza la hipótesis nula (la distribución de partículas de oro es aleatoria). Tanto el ER+GC como las mitocondrias cumplen con los dos requisitos de marcaje preferencial: 1) tienen valores de RLI > 1 ; 2) sus valores correspondientes de X^2 parcial se aproximan o representan más del 10% del total de X^2 . (Tabla 1)

Por otro lado, la Figura 4A muestra el marcaje preferencial del PCNA marcado con partículas de oro en diferentes compartimentos de los grupos de FLCs analizados en T15-T60 y T6-T24 después del tratamiento con el EGF. Los resultados solo muestran aquellos compartimentos que cumplen con los criterios de marcaje preferencial. Note que mientras el ER+GC y la mitocondria se marcaron de forma preferencial en las FLCs a T15-T60, sólo el ER+GC mostró un marcaje predominante entre T6 y T24.

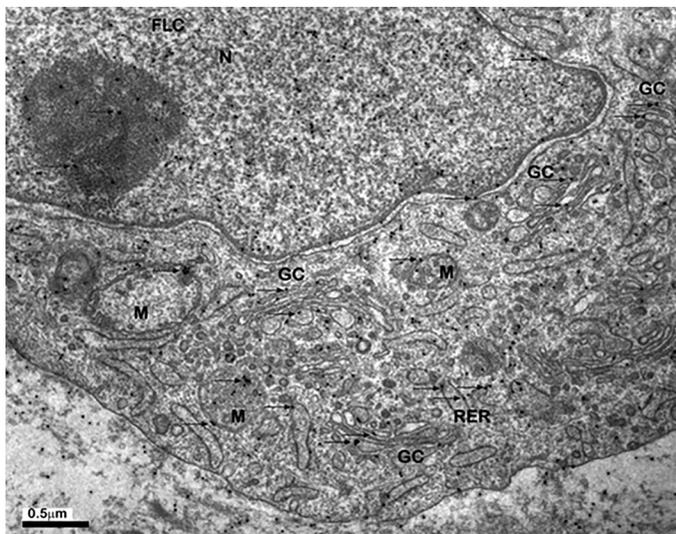


Figura 3. Inmunomarcaje de PCNA (flechas) en parte de una célula semejante a fibroblastos (FLC) de una biopsia obtenida en la etapa temprana (T45) después de la infiltración con el EGF. El inmunomarcaje se detectó fundamentalmente en el retículo endoplasmático (RER), complejo de Golgi (GC), mitocondrias (M) y núcleo (N). (Barra=0.5 μm).

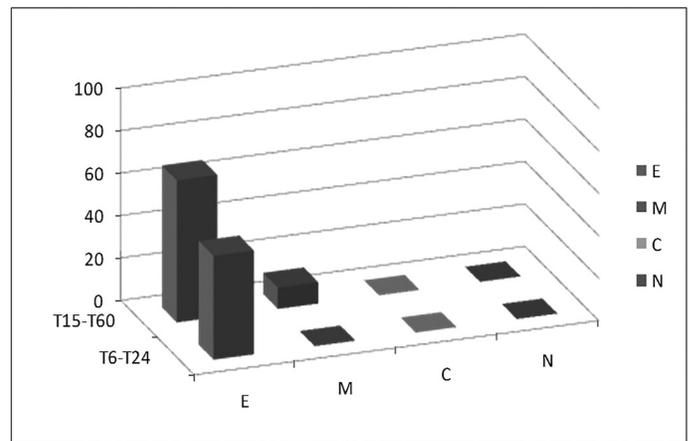


Figura 4A. Marcaje preferencial de PCNA del análisis del conteo de partículas de oro en diferentes compartimentos de células semejantes a fibroblastos (FLCs) en los tiempos T15-T60 y T6-T24 después del tratamiento con EGF.

Se muestran los valores expresados como porcentajes % (X^2 de cada organelo como % de X^2 total) para aquellos compartimentos celulares que cumplen con los dos criterios de marcaje preferencial: 1) Índice de marcaje relativo (RLI) mayor que 1, y 2) valores parciales de X^2 contribuyen de forma considerable al total de X^2 ($X > 10\%$). Para grados de libertad (gl)=3 (2-1 columnas por 4-1 filas), y valores totales de X^2 : T15-T60: $X^2=24,74$, $P < 0,001$; T6-T24: $X^2=40,15$, $P < 0,001$; por lo que los patrones de distribución de partículas de oro es significativamente diferente a una distribución al azar. Las muestras T15-T60, ER+GC (RLI=1,34 y 66,84% de X^2 total) y mitocondria (RLI=1,29 and 9,86% de X^2 total); T6-T24, ER+GC (RLI=1,43 y 48,78% de X^2 total); mostraron marcaje preferencial. X^2 : valores de chi-cuadrado. $X^2\%$: valores de chi-cuadrado de cada organelo expresados como porcentaje de X^2 total. Retículo endoplasmático y complejo de golgi (E); Mitocondria (M); Resto del citoplasma (C); Núcleo (N).

Método 2: Comparación de las cantidades de las partículas de oro observadas en compartimentos de diferentes grupos celulares o grupos experimentales

El objetivo de este método es determinar si la distribución de las partículas de oro en los diferentes compartimentos cambia en los diferentes grupos de células. El primer paso es seleccionar los compartimentos celulares en dependencia de los objetivos del estudio (OVs en este trabajo). El segundo paso es contar las partículas de oro en todos los CVs seleccionados al azar a partir de todas las muestras tomadas de forma aleatoria en cada paso del muestreo para cada grupo de estudio. Se debe destacar que este método no necesita tener en cuenta el tamaño de los compartimentos celulares. La frecuencia numérica de estas partículas para cada organelo representa el valor de No. Entonces, los conteos de las partículas de oro observadas se pueden analizar utilizando una tabla de contingencia con "g" grupos (ordenados en columnas) y "r" compartimentos (ordenados en filas) que generarán las partículas de oro esperadas (Ne) y por tanto los valores parciales de X^2 , para cada grupo y compartimento. Como se mencionó en el método 1, los organelos asociados con valores de Ne no deben ser menores de 1, y los valores de Ne entre 1 y 5 no deben representar más del 20% de los compartimentos estudiados. Los valores parciales y totales de X^2 se calculan como se describió en los párrafos anteriores.

La evaluación del valor total de X^2 , para $(g-1) \times (r-1)$ grados de libertad indica si las distribuciones de las partículas de oro son diferentes. Si estas son diferentes, el análisis de los valores parciales de X^2 identifica los compartimentos que contribuyen con una proporción substancial del total de X^2 (aproximadamente el 10%).

Evaluación de los cambios del marcaje del PCNA en los compartimentos de las FLCs analizadas a diferentes tiempos después del tratamiento con el EGF

Para comparar la distribución del marcaje del PCNA en los diferentes organelos de las FLCs en los tiempos tempranos y tardíos (temprano: T15-T60 y tardío: T6-T24 tiempos) después de la inoculación del EGF en las UPDs, se utilizó un análisis de tabla de contingencia.(Tabla 2) Se evaluó la hipótesis nula de "no diferencia de las distribuciones de partículas de oro entre las FLCs analizadas en tiempos diferentes después del tratamiento con el EGF". Para esto se originó la tabla de contingencia (g columnas \times r filas) que se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Distribuciones observadas y esperadas del inmunomarcaje de PCNA en compartimentos de células semejantes a fibroblastos (FLCs) obtenidos en tiempos diferentes (T15-T60; T6-T24) después del tratamiento con EGF. Se muestran los valores de Chi cuadrado (X^2) en un análisis de tabla de contingencia.

Organelos	T15-T60		T6-T24		Total en Filas	T15-T60		T6-T24	
	No	Ne	No	Ne		χ^2	$\chi^2\%$	χ^2	$\chi^2\%$
ER+GC	184	174,6	148	157,40	332	0,51	0,84	0,56	0,93
M	35	59,43	78	53,57	113	10,04	16,69	11,14	18,51
RC	300	339,20	345	305,8	645	4,53	7,53	5,03	8,35
N	273	218,77	143	197,23	416	13,44	22,34	14,91	24,79
Total	792	792	714	714	1506	-	-	60,15	100

En este estudio se calcularon los valores de Ne de cada compartimento de las FLCs para un tiempo determinado a partir del producto del total de una columna (total de partículas de oro observadas en todos los compartimentos de las FLCs analizadas en un tiempo determinado (T15-T60 o T6-T24)) por el total de una fila (total de partículas de oro observadas para un determinado compartimento en todas las FLCs analizadas en los diferentes tiempos (T15-T60 o T6-T24)) dividido por el gran total (total de partículas de oro observadas en todos los compartimentos y en todas las FLCs). Por ejemplo: el valor de Ne (ER+GC) en T15-T60 (236.62) se calculó de la siguiente forma: No total en T15-T60 (951) \times No total para ER+GC en T15-T60 y T6-T24 (473) dividido por el gran total (1901). Los valores parciales y totales de X^2 se calcularon como se describió en el método 1.

Para los datos mostrados en la Tabla 2, los grupos representan las FLCs analizadas a T15-T60 y a T6-T24. Se debe notar que en este método estadístico los resultados se pueden distorsionar si hay grandes discrepancias en los totales de partículas de oro observadas entre los grupos. Por esto, para obtener sumas similares de columnas en los totales de conteos de las partículas para cada grupo

de las FLCs (Tabla 2), los conteos de las partículas de oro del trabajo original se normalizaron para obtener aproximadamente 950 por grupo. El valor total de X^2 para estos dos grupos es de 60,15 y para 3 grados de libertad, el nivel de probabilidad es de una $P < 0.001$. Por esto, se rechaza la hipótesis nula, de no diferencia entre los grupos.

El análisis de los valores parciales de X^2 indica que el núcleo y la mitocondria son responsables de esta diferencia (Tabla 2 y Figura 4B). Los datos sugieren un cambio en el patrón de marcaje del PCNA entre los tiempos tempranos y tardíos después de la terapia con el EGF. Se observaron menos partículas de oro que las esperadas en las mitocondrias y más inmunomarcaje del PCNA que el esperado en el núcleo a T15-T60 (Tabla 2 y Figura 4B). Resultó interesante que a T6-T24 se obtuvo un cambio en el marcaje del PCNA con más partículas de oro que las esperadas en las mitocondrias y menos marcaje que el esperado en el núcleo. Este análisis sugiere un tráfico intracelular del PCNA del núcleo a T15-T60 hacia las mitocondrias a T6-T24.

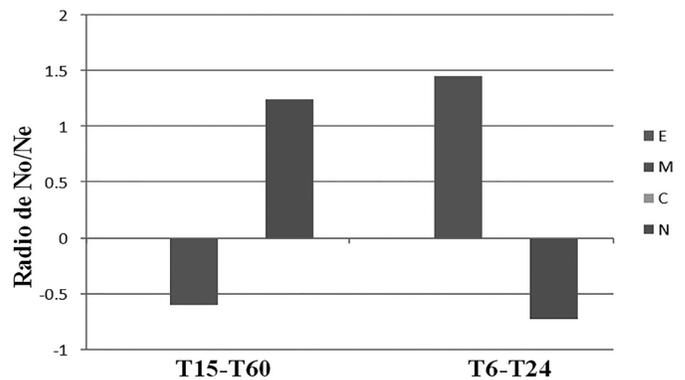


Figura 4B. Radio de las distribuciones observadas (No) y esperadas (Ne) de las partículas de oro para PCNA en diferentes organelos de células semejantes a fibroblastos (FLCs) que contribuyen a las diferencias observadas a tiempos diferentes después del tratamiento con el EGF

Se muestran los radios de No/Ne para aquellos compartimentos celulares que contribuyen a las diferencias entre las distribuciones de marcajes obtenidas en tiempos diferentes. Los valores negativos representan los radios No/Ne menores que 1. Note que los FLCs en T15-T60 tienen menos partículas de oro que las esperadas en las mitocondrias (No/NeX0,59; 16,69% del total de X^2) y más partículas de oro que las esperadas en el núcleo (No/NeX1,25; 22,34% del total de X^2); mientras que las FLCs analizadas en T6-T24 tienen más partículas de oro que las esperadas en mitocondria (No/NeX21,46; 18,51% % del total de X^2) y menos partículas de oro que las esperadas en el núcleo (No/Ne ratioX0,72; 24,79% del total de X^2). Retículo endoplasmático y complejo de golgi (E); Mitocondria (M); Resto del citoplasma (C); Núcleo (N).

No obstante, este método tiene la desventaja de que posee una capacidad limitada para inferir interpretaciones del mecanismo de cambio en los patrones de marcaje.^(23,29,30) Esto se debe a que un compartimento celular puede contener muchas partículas de oro por su gran tamaño o si tiene un tamaño pequeño, pudiera tener una alta densidad de localización de partículas de oro. En estos casos se recomienda complementar estos resultados con los análisis de RLI.⁽²³⁾ Para el estudio del PCNA, el marcaje preferencial

observado en las mitocondrias a T15-T60 (Figura 4A) constituye un ejemplo de las limitaciones del método 2 cuando se utiliza solo sin tener en cuenta el método 1. Note que el método 2 sugiere una acumulación en las mitocondrias a T6-T24.(Figura 4B)

Al analizar ambos métodos en conjunto, una posible explicación puede ser que hay un incremento en el número y/o área de las mitocondrias estudiadas a T6-T24 en comparación a T15-T60. Al realizar el cálculo del área relativa de las mitocondrias se obtiene que estas representan el 9% del área total de las FLCs a T6-T24 comparado con un 3,7% a T15-T60 ($P < 0.001$, prueba z de proporciones). Esto concuerda con los resultados adicionales de este trabajo que sugieren un aumento en las funciones mitocondriales del EGFR (14) y otras moléculas en los FLCs a T6-T24 y un incremento en la biogénesis de las mitocondrias a este tiempo, inducidas por el EGF (resultados no publicados). Por otro lado, los valores de RLI para el PCNA en el núcleo sugieren que las partículas de oro se distribuyen casi de forma aleatoria a T15-T60 (RLIX0,95), mientras que el valor de RLI disminuyó a T6-T24 (RLIX0,69). Estas evidencias en su conjunto apoyan que hubo un cambio en el marcaje del PCNA en los organelos de las FLCs (de núcleo a mitocondria) analizados en tiempos diferentes después del tratamiento con el EGF.

El desarrollo reciente de procedimientos rigurosos de muestreo, estimación estereológica y evaluación estadística han fortalecido los análisis cuantitativos de las imágenes de IME. Este estudio describió que el PCNA se acumula en las mitocondrias mientras que disminuye en el núcleo de las FLCs entre las 6 y 24 horas del tratamiento. La aplicación de la metodología descrita en esta revisión se refiere al estudio de la localización dinámica intracelular del PCNA que permitió identificar que la terapia de las UPD con el EGF induce la activación y la localización nuclear del PCNA en las FLCs en la primera hora después de la administración del EGF

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante la investigación sugieren que las funciones del PCNA en el núcleo prevalecen en tiempos tempranos, mientras que, predominan en las mitocondrias en tiempos tardíos después de la infiltración con el EGF. Esto posiblemente está relacionado con la biogénesis de las mitocondrias. La utilización de los dos métodos cuantitativos descritos, demuestra que estos se complementan, lo que apoya su aplicación para el estudio de las vías de señalización intracelulares de interés terapéutico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mayhew TM, Lucocq JM. *Developments in cell biology for quantitative immunoelectron microscopy based on thin sections- a review. Histochem Cell Biol.* 2008;130:299-313.
2. Mayhew TM, Lucocq JM, Griffiths G. *Relative labelling index: a novel stereological approach to test for non-random immunogold labelling of organelles and membranes on transmission electron microscopy thin sections. J Microsc.* 2002;205:153-64.
3. Berlanga-Acosta J, Mendoza-Marí Y, Fernández-Mayola M, García-Ojalvo A, Valdés-Pérez C, Savigne-Gutierrez W, et al. *Torpid Diabetic Wound Healing: Evidence on the Role of Epigenetic Forces. Int J Diabetes Clin Res.* 2015;2:020.
4. Bobircē F, Mihalache O, Georgescu D, al. e. *The new prognostic-therapeutic index for diabetic foot surgery--extended analysis. Chirurgia* 2016;111:151-5.
5. Zhang P, Lu J, Jing Y, al. e. *Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis. Ann Med.* 2016;49:106-16
6. *International Diabetes Federation. Atlas de la Diabetes de la FID.* 2017.
7. Berlanga-Acosta J, López-Saura P, Guillen-Pérez I, Guillen-Nieto G, Acevedo-Castro B, Herrera-Martínez L. *Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM): Biological Overview from Pathways to Organelles and its Translation toward a Torpid Wound Healing Process. J Diabetes Metab.* 2013;4(7):285.
8. Brownlee M. *The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. Diabetes.* 2005;54:1615-25.
9. Groop L, Pociot F. *Genetics of diabetes--are we missing the genes or the disease? Mol Cell Endocrinol.* 2014;382(1):726-39.
10. Bagalad BS, Kumar KPM, Puneeth HK. *Myofibroblasts: Master of disguise. J Oral Maxillofac Pathol.* 2017;21:462-3.
11. Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G, Hinz B. *The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions. F1000 Research.* 2016;5:752.
12. Gerarduzzi C, Di Battista JA. *Myofibroblast repair mechanisms post-inflammatory response: a fibrotic perspective. Inflamm Res.* 2017;Doi: 10.1007/s00011-016-1019-x.
13. Berlanga-Acosta J, Schultz GS, Lopez-Mola E, Guillen-Nieto G, García-Siverio M, Herrera-Martínez L. *Glucose Toxic Effects on Granulation Tissue Productive Cells: The Diabetics Impaired Healing. BioMed Res Int.* 2013;2013:15.
14. Falcón-Cama V, Fernández-Mayola M, Mendoza-Mari Y, Acosta-Rivero N, García-Ojalvo A, Bringas-Pérez R, et al. *Epidermal Growth Factor based Therapy Promotes Intracellular Trafficking and Accumulation of its Receptor in the Nucleus of Fibroblasts from Diabetic Foot Ulcers. J Diabetic Complications Med.* 2016;1(3):111.
15. Portou MJ, Baker D, Abraham D, Tsui J. *The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: A review, Vascular Pharmacology Vascular Pharmacol.* 2015;doi: 10.1016/j.vph.2015.02.007.

16. Berlanga-Acosta J. Diabetic lower extremity wounds: the rationale for growth factors-based infiltration treatment. *Int Wound J.* 2011;8(1742-481X (Electronic)):612-20.
17. Buckley A, Davidson JM, Kamerath CD, Wolt TB, Woodward SC. Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82(21):7340-4.
18. Yu FS, Yin J, Xu K, Huang J. Growth factors and corneal epithelial wound healing. *Brain Res Bull.* 2010;81(2-3):229-35.
19. Berlanga-Acosta J, Fernández-Montequín J, Valdés-Pérez C, Savigne-Gutiérrez W, Mendoza-Marí Y, García-Ojalvo A, et al. Diabetic Foot Ulcers and Epidermal Growth Factor: Revisiting the Local Delivery Route for a Successful Outcome. *Biomed Res Int.* 2017;2017: 2923759.
20. Naryzhny SN. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(23):3789-808.
21. Park SY, Jeong MS, Han CW, Yu HS, Jang SB. Structural and functional insight into proliferating cell nuclear antigen JMB. 2015.
22. Stoimenov I, Helleday T. PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem Soc Trans.* 2009;37:605-13.
23. Mayhew TM. Quantitative immunocytochemistry at the ultrastructural level: a stereology-based approach to molecular nanomorphomics. *Cell Tissue Res.* 2015;360(1):43-59.
24. Mayhew TM, Lucocq JM. From gross anatomy to the nanomorphome: stereological tools provide a paradigm for advancing research in quantitative morphomics *J Anat.* 2015;226:309--21.
25. Lucocq JM, Mayhew TM, Schwab Y, Steyer AM, Hacker C. Systems biology in 3D space – enter the morphome. *Trends Cell Biol.* 2015;25(2):59-64.
26. Mayhew TM. Morphomics: An integral part of systems biology of the human placenta. *Placenta.* 2015;36:329e40.
27. Gundersen HJG, Jensen EB, Kieu K, al. e. The efficiency of systematic sampling in stereology reconsidered. *J Microsc.* 1999;193:199–211.
28. Mayhew TM. Taking tissue samples from the placenta: an illustration of principles and strategies. *Placenta.* 2008;29:1–14.
29. Borjigin G, Yamamoto S, Sugiyama T, Nishiumi T, Suzuki A. Changes in the immunogold electron-microscopic localization of calpain in bovine skeletal muscle induced by conditioning and high-pressure treatment. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006;70:1249–54.
30. Schmiedl A, Ochs M, Muhlfeld C, Johnen G, Brasch F. Distribution of surfactant proteins in type II pneumocytes of newborn, 14-day old, and adult rats: an immunoelectron microscopic and stereological study. *Histochem Cell Biol* 2005;124:465–76.

Quantitative immunoelectron microscopy to the study of EGF therapeutic effect on diabetic foot ulcers

ABSTRACT

Objective: in this work we focused on the methodology used to investigate the differential cellular distribution of a key protein (cellular proliferation nuclear antigen) involved in the signalling induced by under epidermal growth factor.

Development: samples from diabetic foot ulcers were analysed using quantitative IEM. References were obtained from the Pubmed data base. In agreement with an under epidermal growth factor functional failure in the diabetic granulation tissue, cellular proliferation nuclear antigen was scarcely detected in fibroblasts. Interestingly, under epidermal growth factor treatment of diabetic foot ulcers induced an early activation of cellular proliferation nuclear antigen (from 15 min to 60 min) in the nucleus of diabetic foot ulcers fibroblasts. Notably, augmented labeling of cellular proliferation nuclear antigen was observed in mitochondria of fibroblasts at later times following under epidermal growth factor therapy (from 6 hours to 24 hours).

Conclusions: this research demonstrated the value of applying quantitative immunogold labeling distributions of cellular compartments to the study of relevant therapeutic intracellular signaling pathways.

Keywords: Immunoelectron microscopy; diabetic foot ulcers; epidermal growth factor; cellular proliferation nuclear antigen.

Dirección para la correspondencia: Dra. Viviana Falcón Cama, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Habana, Cuba, Tel: 537-250-44-79; Fax: 537-25074-79.

Dr. Jorge Berlanga, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Habana, Cuba, Tel: 537-250-44-79; Fax: 537-25074-79.

Correo electrónico: viviana.falcon@cigb.edu.cu, jorge.berlanga@cigb.edu.cu.

Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0

