

TRABAJOS CIENTÍFICOS

Estudio inmunohistoquímico del colágeno tipo I y tipo III en piel de pacientes con hernia inguinal primaria

Immunohistochemical measurement of type I and III collagen content of the skin of patients with primary inguinal hernia

Dr. PABLO BÓRQUEZ MORALES

Servicio de Cirugía, Hospital Base de Osorno

TRABAJO DE INGRESO

RESUMEN

La etiopatogenia de la hernia inguinal es compleja y multifactorial. Hay factores biomecánicos, metabólicos y genéticos asociados al desarrollo de hernias inguinales pero el sustrato estructural íntimo que determina la aparición de la hernia no se conoce con exactitud. En piel y fascia transversalis hay una composición de colágeno tipo I y tipo III similar que es cuantificable por distintas técnicas, que se mantiene constante en individuos normales y se altera en individuos con hernia. El objetivo de ésta investigación es efectuar un estudio morfológico con inmunohistoquímica, en piel de pacientes portadores de hernia inguinal primaria, operados en el Servicio de Cirugía del Hospital Regional de Temuco entre abril y diciembre de 2002 y compararlos con un grupo de sujetos sin hernia. El diseño propuesto es un estudio de casos y controles con tamaño de muestra estimado en 9 casos y 9 controles. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Frontera. Cada sujeto en estudio firmó un consentimiento informado autorizando la toma de muestra e inclusión en el protocolo. La distribución de las fibras de colágeno tipo I no mostró diferencias significativas. En los pacientes con hernia inguinal encontramos una mayor concentración de fibras de colágeno tipo III en los sectores más superficiales de la dermis (dermis papilar) y alrededor de los anexos de la piel, a diferencia de lo que sucede en los pacientes sin hernia. Al cuantificar la proporción de colágeno I/III por inmunohistoquímica obtuvimos un valor de 1,28 en sujetos sin hernia y 0,79 en pacientes con hernia inguinal primaria, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Como conclusión se puede establecer que hay una alteración de la calidad y cantidad de las fibras colágenas y de la proporción de colágeno I/III en piel de pacientes portadores de hernia inguinal primaria al compararlos con sujetos sin hernia inguinal.

PALABRAS CLAVES: *Hernia inguinal, Estudio Inmunohistoquímico de colágeno*

SUMMARY

Background: The skin contains two types collagen. Collagen I is the most abundant and has a great tension strength and elastic resistance. Collagen III is less resistant and also less abundant. The collagen I/collagen III ratio is reduced in the skin and transversalis fascia of patients with inguinal hernia. *Aim:* To study the collagen composition of the skin of patients with inguinal hernia and matched controls. *Patients and methods:* Twenty three patients with inguinal hernia aged 35.6 ± 9.7 years and 23 controls aged 31.7 ± 8.5 years were studied. A small skin sample as obtained from the surgical wound. Collagen I and collagen III fiber density was measured using an immunohistochemical method. *Results:* No differences between cases and controls were observed in the distribution of collagen I fibers. Among patients with hernia, there was a higher concentration of collagen III fibers in the papillary dermis and around adnexa. The collagen I/collagen III ratio was 1.28 among subjects without hernia and 0.79 among patients with hernia. *Conclusions:* The quality and distribution of collagen fibers in the skin is altered in patients with hernia

KEY WORDS: *Inguinal Hernia, Immunohistochemical Measurement of Collagen*

INTRODUCCIÓN

La hernia inguinal es la variedad más frecuente de hernia de la pared abdominal¹. Hay descritos múltiples factores asociados a la aparición de esta enfermedad. Los factores biomecánicos como son la presencia de una zona débil en la pared posterior del conducto inguinal y la persistencia del conducto peritoneo vaginal², la falla del mecanismo de compuerta³ y los aumentos crónicos de la presión intraabdominal son considerados facilitadores o predisponentes de este cuadro^{4,5,6,7}.

Desde que Canon y Read⁸ en 1981 demostraron un incremento en el riesgo de presentar una hernia inguinal en pacientes fumadores debido a la presencia en sangre periférica de enzimas que degradan la matriz extracelular, los factores metabólicos han cobrado cada vez más importancia en el estudio de la etiología de la hernia inguinal.

Se han publicado algunos reportes con intentos experimentales por demostrar alteraciones de las fibras del tejido conectivo en piel y tejidos de pacientes portadores de hernia inguinal primaria^{9,10,11}. En la piel se reconocen 2 tipos de colágeno predominantes: el tipo I de gran fuerza tensil y resistencia elástica se encuentra ampliamente distribuido por el organismo y el tipo III también muy resistente pero que se encuentra en menor cantidad que el tipo I. Como elemento de estudio la piel es interesante porque en su configuración histológica con relación a los colágenos predominantes es muy similar a la fascia transversalis de la pared posterior del conducto inguinal¹², por otro lado estos tipos de colágeno han sido cuantificados en piel existiendo una proporción de colágeno tipo I/colágeno tipo III en tejidos normales^{13,14} y habría una significativa reducción de esta proporción en cultivos de tejidos provenientes de pacientes con hernia inguinal¹⁴. En la literatura nacional no hay otras experiencias al respecto.

En relación con lo anterior formulamos la siguiente pregunta de investigación: ¿existe una alteración cuantitativa en las fibras colágenas de la piel de pacientes portadores de hernia inguinal primaria intervenidos quirúrgicamente en el Servicio de Cirugía del Hospital Regional de Temuco entre abril y diciembre de 2002 que sea cuantificable por técnica de inmunohistoquímica?

El objetivo de esta investigación fue comparar, con técnica de inmunohistoquímica, la proporción de colágenos tipo I y tipo III en piel de pacientes con hernia inguinal primaria y compararlos con sujetos sin hernia inguinal.

MATERIAL Y MÉTODO

Diseño del estudio: Casos y controles.

Población: Pacientes con hernia inguinal primaria (casos) y pacientes (sin hernia inguinal primaria) operados por apendicitis aguda (controles) todos intervenidos quirúrgicamente en el Hospital Regional de Temuco entre abril y diciembre de 2002, sin límites de sexo y edad entre 15 y 50 años. El estudio se efectuó en muestras de piel por su gran similitud histológica con la fascia transversalis del conducto inguinal.

Criterios de exclusión: En ambos grupos se excluyeron los pacientes con prostatismo, constipación crónica (menos de 3 eliminaciones de deposiciones por semana), tabaquismo, obesidad (índice de masa corporal o IMC>30), enfermedades crónicas y neoplásicas, embarazo y enfermedades genéticas del tejido conjuntivo como la Enfermedad de Ehlers Danlos y Síndrome de Marfan.

Protocolo de trabajo: Desde la herida operatoria se obtuvo una muestra de piel (inguinal en casos y de fosa ilíaca derecha en controles) de 3x10 mm que fue fijado en Methacarn. Las muestras se incluyeron en Paraplast®. A cada muestra se le practicaron cortes seriados de 5-7 mm los cuales se montaron en portaobjetos con poly-l-lysina (Sigma P-1524). El estudio mediante inmunohistoquímica fue ejecutado con la técnica de peroxidasa antiperoxidasa descrita por Sternberger¹⁵. Para la medición de colágeno tipo I y tipo III se emplearon como primer anticuerpo el anticuerpo monoclonal anticólágeno tipo I y tipo III (Oncogene Research®) en dilución 1:10. Las fotografías fueron obtenidas con un microscopio Carl Zeiss, Axiolab, con cámara MC 80DX.

La densidad de las fibras de colágeno tipo I y tipo III se cuantificó a través del procesador de imágenes Image Beta 4.0.2 el que mide la intensidad de color (píxeles) y los convierte a densidad de tejidos.

Las microfotografías de los cortes histológicos amplificados x40 se digitalizaron con un Scanner AGFA SnapScan 1212. Se realizaron 4 mediciones de la densidad de fibras de colágeno tipo I y 4 mediciones para el colágeno tipo III en cada sujeto obteniéndose 184 mediciones para cada grupo. Se procesaron áreas equivalentes de cortes adyacentes en sujetos con y sin hernia evitando medir en zonas con fibroblastos, núcleos, eritrocitos o con artefactos histológicos. Se obtuvo un valor promedio de la proporción de colágeno tipo I/ colágeno tipo III para ambos grupos separadamente. La medición se realizó en forma ciega.

Tamaño de la muestra: El Cálculo del tamaño

de la muestra se realizó para una diferencia en el promedio de densidad de fibras entre casos y controles de al menos un 40%, una variabilidad (desviación estándar) esperada de 60 unidades o píxeles, un nivel de significancia de 5% y un poder de 80%. Así obtuvimos un tamaño de la muestra de 9 pacientes con hernia y 9 sujetos controles.

Herramientas estadísticas: Se aplicó el estadístico de t de Student para la comparación de promedios de edad, índice de masa corporal y densidad de fibras colágenas tipo I y tipo III en ambos grupos. Se consideró significativo un valor de p menor a 5%.

Aspectos éticos: El protocolo realizado contó con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Frontera de Temuco. Cada paciente incluido firmó un consentimiento informado autorizando su ingreso en el estudio y la obtención y procesamiento del material biológico.

RESULTADOS

Las principales características biodemográficas de la muestra compuesta por 23 casos y 23 controles se observa en la Tabla 1. La edad promedio de ambos grupos no mostró una diferencia significativa al igual que el antecedente familiar de hernia. La distribución por edad y sexo representa la distribución proporcional de hernias inguinales primarias en hombres y mujeres (9:1).

La distribución de fibras colágenas tipo I no mostró una diferencia importante entre pacientes con y sin hernia inguinal en los cortes sometidos a inmunohistoquímica, tanto al comparar cortes de dermis superficial y profunda (Figura 1 y 2).

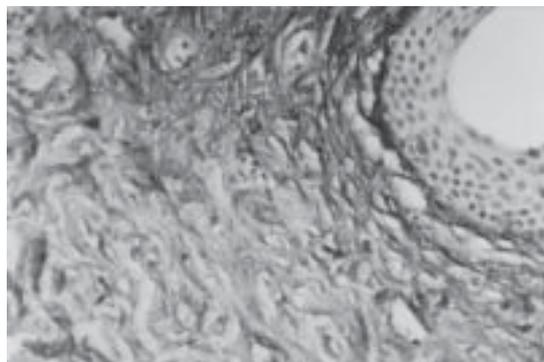


Figura 1. Inmunohistoquímica para colágeno tipo I en piel superficial de paciente sin hernia inguinal(control).

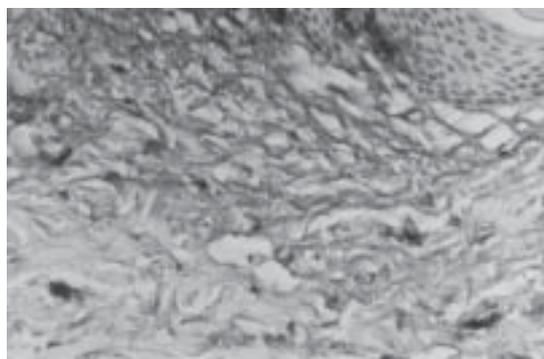


Figura 2. Inmunohistoquímica para colágeno tipo I en piel superficial de paciente con hernia inguinal(caso).

En el grupo de controles la distribución de fibras de colágeno tipo III fue homogénea en todo el espesor de la dermis. En los pacientes portadores de hernia inguinal primaria hubo un aumento de la densidad de las fibras de colágeno tipo III en los sectores más superficiales de la dermis (dermis papilar) y alrededor de los anexos de la piel (Figura 3 y 4).

En el grupo de casos también encontramos un adelgazamiento del estrato celular de la epidermis, llegando las papilas dérmicas casi a contactarse con los estratos más superficiales de la piel, dándole al extremo apical de las papilas dérmicas una ubicación muy superficial (Figuras 5 y 6).

La cuantificación del valor de la proporción de colágeno tipo I/ tipo III puede observarse en la Figura 7, siendo la diferencia muy significativa.

DISCUSIÓN

Respecto a la disminución de la proporción de colágeno tipo I/ colágeno tipo III encontrada vemos que esta serie es comparable con lo obtenido por el grupo de Klinge y cols.¹⁴, quienes determinaron un

Tabla 1

CARACTERÍSTICAS BIODEMOGRÁFICAS DE LOS GRUPOS EN ESTUDIO (t student, test exacto de Fisher)

Variable	Casos (N = 23)	Controles (N = 23)	p
Edad (años)	35,6 ± 9,7	31,7 ± 8,5	0,152
IMC (promedio)	25,2 ± 2,6	25,9 ± 2,7	0,3601
Sexo (%)			
Hombres	91,3	91,3	0,99
Mujeres	8,7	8,7	
Antecedente familiar(+) de hernia (%)	34,8	13,0	0,083

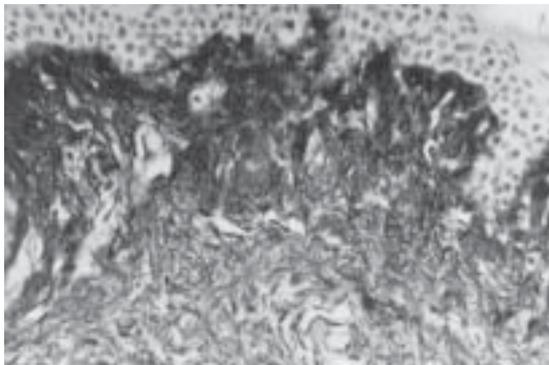


Figura 3. Inmunohistoquímica para colágeno tipo III en piel superficial de paciente con hernia inguinal (caso).

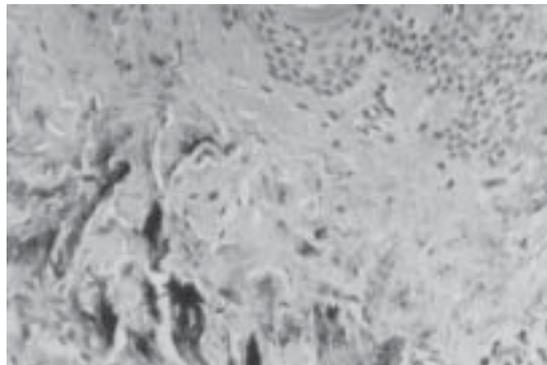


Figura 4. Inmunohistoquímica para colágeno tipo III en piel superficial de paciente sin hernia inguinal (control).

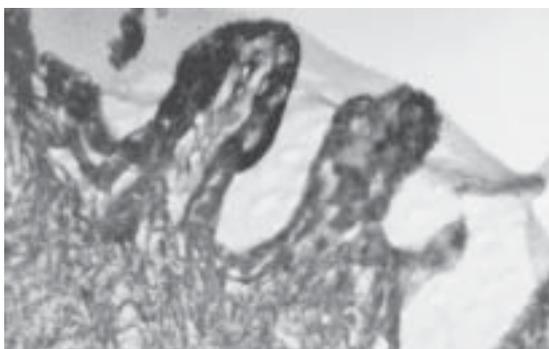


Figura 5. Inmunohistoquímica para colágeno tipo III, papila dérmica anormal (caso).

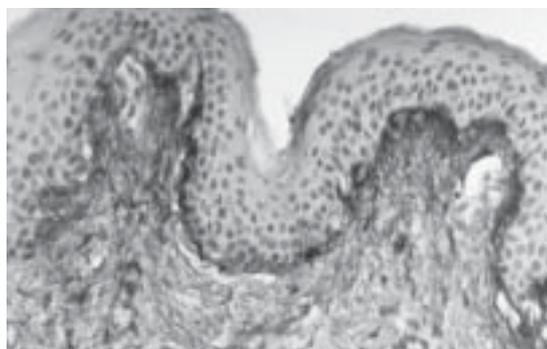


Figura 6. Inmunohistoquímica para colágeno tipo III, papila dérmica normal (control).

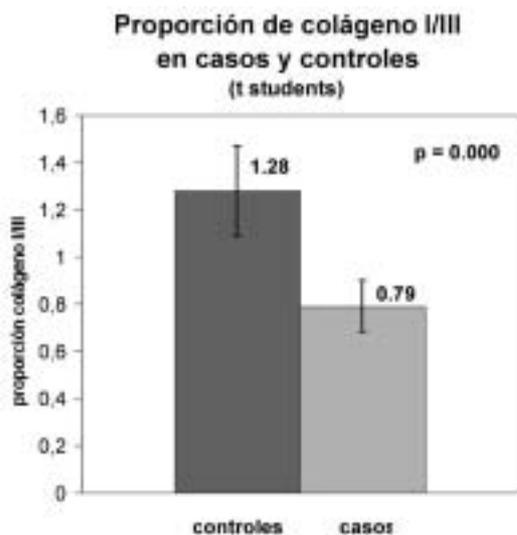


Figura 7.

valor para sujetos normales y otro significativamente menor en pacientes portadores de hernia inguinal (los rangos fueron de 1,7 y 1,3 respectivamente) y difieren un poco de nuestros resultados probablemente por la técnica de medición empleada, además trabajaron con una población con edad promedio mayor a 60 años y no excluyeron otras condiciones que claramente inciden en la aparición de una hernia inguinal como son la obesidad, la constipación crónica, el tabaquismo y la patología obstructiva prostática.

Friedman y cols.¹⁶ comunicaron en 1999 una mayor expresión de precursores proteicos de colágeno tipo III en piel de pacientes con hernia inguinal estudiados en cultivos celulares de fibroblastos *in vitro*. Estos hallazgos van en nuestra misma dirección. Recientemente Rosh y cols.¹⁷ confirman los resultados de Friedman al repetir la experiencia pero con técnicas de ingeniería genética midiendo RNAm para cadenas de procolágeno a través del uso de RT-PCR y demostraron un aumento de la expresión de colágeno tipo III.

Otro aspecto interesante de esta investigación es que encontramos un adelgazamiento aparente del estrato celular de la epidermis que deja a la porción apical de las papilas dérmicas en posición superficial. Este hecho asociado al aspecto disgregado y desestructurado de la dermis descrito previamente¹¹ nos hace recordar los cambios en la piel producto del envejecimiento normal. Hay descritas alteraciones macroscópicas como son la aparición de arrugas, aumentos de la sequedad, disminución de la elasticidad de la piel y alteraciones microscópicas como adelgazamiento de la dermis, epidermis y disminución de las cantidades relativas de colágeno tipo I a expensas de un aumento del colágeno tipo III. Estos resultados abren una interesante línea de investigación en relación a los trastornos del colágeno, la patogenia de la hernia inguinal y el envejecimiento.

Como conclusión, demostramos un defecto estructural en la fibra colágena de la piel de pacientes portadores de hernia inguinal primaria sin factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad. Repetir estos resultados en otros tejidos aportaría más evidencia para concebir la enfermedad herniaria como una enfermedad de los tejidos colágenos y no como una enfermedad local debido a factores puramente mecánicos.

REFERENCIAS

1. Pérez P, Amat J, Korn O. Hernias de la región inguinal. En *Hernias Abdominales*. Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda. Santiago 1999; 45-77.
2. Abrahamson J. Etiology and pathophysiology of primary and recurrent groin hernia formation. *Surg Clin North Am* 1998; 78(6) : 953-72.
3. Broggi MA, Salva JA. Fisiopatología de la Región Inguinal. En *Hernia Inguinocrural*. Editorial JIMS, Barcelona 1982; 75-85.
4. Liem MS, van der Graaf Y, Zwart RC, Geurt SI, van Vroonhoven TJ. Risk factors for inguinal hernia in women: a case control study. The Coala Trial Group. *Am J Epidemiol* 1997; 146: 721-6.
5. Gofin J, Hopp C, Makler A, Epstein M. The epidemiology of inguinal hernia. A survey in Western Jerusalem. *J Epidemiol Community Health* 1978; 2(1): 59-67.
6. Kang SK, Burnett CA, Freund E, Sestito J. Hernia: is it work related condition? *Am J Ind Med* 1999; 36(6): 638-44.
7. Abdalla RZ, Mittelstaedt WE. The importance of the size of Hessert's triangle in the etiology of the inguinal hernia. *Hernia* 2001; 5(3): 119-23.
8. Cannon DJ, Read R. Metastatic enfisema. A mechanism for acquiring inguinal herniation. *Ann Surg* 1981; 194(3): 270-78.
9. Ajabnoor MA, Mokhtar AM, Rafee AA, Taha AM. Defective collagen metabolism in Saudi patients with hernia. *Ann Clin Biochem* 1992; 4: 430-36.
10. Klinge U, Zheng H, Si ZY, Schumpelick V, Bhardwaj R, Klosterhalfen B. Synthesis of type I and III collagen, expression of fibronectin and matrix metalloproteinases-1 and -13 in hernial sac of patients with inguinal hernia. *Int J Surg Investig* 1999; 1(3): 219-27.
11. Bórquez P, Garrido L, Manterola C, Peña P, Schlageter C, Orellana J *et al*. Estudio de fibras colágenas y elásticas del tejido conjuntivo de pacientes con y sin hernia inguinal primaria. *Rev Med Chile* 2003; 131: 1273-79.
12. Klinge U. Altered collagen synthesis in fascia transversalis of patients with inguinal hernia. *Hernia* 1999 ; 3: 181-87.
13. Vitellaro-Zuccarello L, Garbelli R, Rossi VD. Immunocytochemical localization of collagen types I, III, IV, and fibronectin in the human dermis. Modifications with ageing. *Cell Tissue Res* 1992; 268(3): 505-11.
14. Klinge U, Zheng H, Si Z, Schumpelick V, Bhardwaj RS, Muys L *et al*. Expression of the extracellular matrix proteins collagen I, collagen III and fibronectin and matrix metalloproteinase - 1 and -13 in the skin of patients with inguinal hernia. *Eur Surg Res* 1999; 31: 480-90.
15. Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970; 18: 315-33.
16. Friedman D, Bayd Ch, Norton P, Greco R, Bayarsky A, Mackenzie J *et al*. Increased in type III collagen gene expression and protein synthesis in patients with inguinal hernias. *Ann Surg* 1993; 218(6): 754-60.
17. Rosch R, Klinge U, Zhongyi S, Junge K, Klosterhalfen B, Schumpelick V. A role for the collagen I/III and MMP-1/-13 genes in primary inguinal hernia? *BMC Medical Genetics* 2002, 3:2 en [http:// www.biomedcentral .com/1471-2350/3/2](http://www.biomedcentral.com/1471-2350/3/2).

INFORME

Sr. Presidente de la Sociedad de Cirujanos de Chile, Srs. Miembros del Directorio, agradezco la designación para informar el trabajo de ingreso del Dr. Pablo Bórquez M. Estudio Inmunohistoquímico

del colágeno tipo I y III en piel de pacientes con hernia inguinal primaria.

Esta nominación me llena de satisfacción por ser un tema que captura mi interés en la Hernia y

sus innovaciones de manejo, como también me remonto al inicio de la década del ochenta que me vi fuertemente motivado por el Profesor Patricio Pérez en la técnica de Shouldice, que el nos presentaba como la de mas baja recurrencia, como así mismo estimulado porque la cirugía de la Hernia continúa siendo una de las mas discutidas de las operaciones realizadas por cirujanos generales. Ahora mas que antes, la reparación de una simple hernia inguinal o una hernia incisional complicada no es solo la sutura superficial de un tejido en el organismo, sino que requiere hoy en día la participación de un cirujano que comprenda en mayor grado la anatomía funcional, junto con la fisiopatología de la pared abdominal. Un cirujano de hernias debe estar familiarizado con la bioquímica básica del metabolismo de los componentes que integran la matriz extracelular.

El Dr. Borquez , nos presenta un tema novedoso que ha tomado fuerza en estas ultimas décadas, el autor ha presentado gran interés en el tema, publicando un articulo anterior de la misma serie con un análisis cualitativo de fibras elásticas y colágeno, logrando financiamiento para realizar cuantificar con anticuerpos monoclonales la presencia de colágeno, que es el motivo de esta presentación.

Las técnicas convencionales sin uso de prótesis debían enfrentarse a recurrencias sobre el 10%, problema que esta parcialmente resuelto al bajar estas cifras a cercanas al 1%, con el uso de mallas; pero presentan morbilidades relacionadas con los materiales de los cuales están hechas. Además del problema técnico, siempre ha existido un problema metabólico de alteración de la síntesis del colágeno que antes era nombrado sin mayor comprensión y ahora es reconocido como jugador de un rol importante en la génesis del problema herniario. En tejidos normales el colágeno entrega fuerza, integridad y estructura. Existen alrededor de 20 diferentes tipos de colágeno cada uno de estos codificados en un gen propio, estos genes se encuentran en una variedad de cromosomas, transcribiéndose por intermedio del RNA mensajero que genera una serie de pasos para obtener el código final del tipo específico de colágeno. Su arquitectura triple helicoidal le implica una tremenda fuerza a la proteína.

El trabajo presenta criterios de exclusión que limpian la muestra, al ingresar pacientes con un rango de edad adecuado, dejando fuera edades con distribución de colágenos en proporcionalidad distinta como es el caso de las personas ancianas y niños, como así mismo la exclusión de patologías predisponentes o favorecedoras de debilidad de la pared abdominal, enfermedades genéticas y hábitos relacionados. Especial mención de selección esta en la elección de hernias primarias, ya que las recidivadas presentan además del problema primario del metabolismo del colágeno una cicatriz previa que no alcanzó la alta estructura organizacional de la síntesis de esta proteína, la que será siempre mas débil que el colágeno original.

El trabajo demuestra una alteración estructural en la fibra del colágeno en los pacientes portadores de hernia inguinal primaria, situación publicada por otros autores, con técnicas de inmunohistoquímica, escenario que juega un importante rol en la génesis de la hernia inguinal.

Revisando el tema quedan algunas dudas, por ejemplo; si las hernias inguinales directas e indirectas tienen una etiopatogenia diferente. Mi impresión es que el defecto indirecto se encuentra mas relacionado a factores biomecánicos estructurales y las hernias directas son mas de alteración bioquímica genética, en este estudio no se hace referencia a las proporciones de los colágenos en ambos casos.

Finalmente, el tema es de tan alta importancia, ya que en un futuro próximo se podrá hacer un estudio genético determinando los potenciales candidatos con defectos herniarios y posiblemente existirán terapias génicas o bioquímicas que permitan estabilizar esta proteína fundamental de la matriz extracelular logrando un balance entre la síntesis y la degradación evitando su manifestación deficitaria en la pared abdominal.

El Dr. Borquez y su grupo destacaron con este estudio, contribuyendo y motivando al estudio moderno de la cirugía herniaria en nuestro medio. Por lo anterior, Sr. Presidente recomiendo al postulante para ser acogido en el seno de nuestra Sociedad como socio titular.

Dr. CRISTIÁN BARDAVID S.