

DENSIDAD LINEAL DE MITOSIS DE EPIDERMIS DEL PABELLÓN DE OREJA TRAUMÁTICA DE RATONES IOR SOMETIDA A TRATAMIENTO CON QUITINA.

Tania Rodríguez Amador¹, Pedro A Díaz Rojas², Marielin Concepción Osorio³.

1Licenciada en enfermería. Especialista de I Grado en Histología. Profesor Asistente. Facultad de Ciencias Médicas "Mariana Grajales Coello". Universidad de Ciencias Médicas de Holguín. Holguín. Cuba.

Dirección: Calle 27 no 17 e/ 20 y Pepito Tey. Nuevo Llano. Holguín.

Teléfono: 53481567

Correo: taniar@ucm.hlg.sld.cu

2 Especialista de II Grado en Histología. Profesor Titular. Máster en Educación Médica Superior. Universidad de Ciencias Médicas de Holguín. Holguín. Cuba.

3 Especialista de I grado en MGI. Especialista de I Grado en Histología. Profesor asistente. Facultad de Ciencias Médicas "Mariana Grajales Coello". Universidad de Ciencias Médicas de Holguín. Holguín. Cuba.

Resumen

Se estudió la densidad lineal de mitosis en 16 muestras de pabellón auricular traumático de ratones isogénicos IOR que fueron sometidos a cura con crema de quitina. Se dividió la preparación histológica en zonas apical, lateral derecha e izquierda. Se aplicó el método morfométrico para la determinación de la densidad lineal de mitosis de la capa basal. Los resultados mostraron que el comportamiento de la densidad de las mitosis en las diferentes zonas estudiadas se corresponde con los efectos estimulantes que actúan sobre el área de la lesión para garantizar la re-epitelización de la zona del trauma. El incremento de la densidad de mitosis en la capa basal de las zonas dañadas demuestra la acción estimulante de la quitina sobre la cicatrización.

Palabras clave: mitosis, cicatrización, quitina.

INTRODUCCIÓN

La piel constituye el órgano vital más extenso y recubre el cuerpo en su totalidad en un área aproximada de 1,5 m² a 2 m² en un adulto y representa entre el 10 por ciento y el 16 por ciento del peso corporal.^{1-2.}

Consta de dos capas: la epidermis, más externa, de tejido epitelial estratificado plano queratinizado derivado del ectodermo superficial. Formada por cuatro tipos celulares: los melanocitos encargados de la síntesis de melanina; las células de Langerhans,

presentadoras de antígenos y participan en la respuesta inmune; las células de Merckel, de tipo neuroendocrinas que se comportan como mecanorreceptoras y los queratinocitos que son las más abundantes, representan el 90 por ciento, es de tipo epitelial, y mediante un proceso de diferenciación se especializan en la síntesis de la proteína queratina y por ello se disponen en cinco estratos: basal o germinativo, espinoso, granuloso, lúcido y corneo.^{2-6.}

Cada día se producen alrededor de dos mil células nuevas por milímetro cuadrado. El tiempo de tránsito desde la formación hasta su eliminación es de cuatro semanas.¹

En la epidermis se distinguen tres regiones funcionales: la zona proliferativa que corresponde al estrato basal donde hay renovación celular denominada epidermopoyesis, la zona de diferenciación que representa los estratos espinoso y granuloso donde hay diferenciación y maduración celular y la zona funcional que constituye la capa córnea protectora como resultado de la eliminación celular.^{1, 7, 8.}

En el proceso de renovación continua interviene la unidad proliferativa de la piel (UPE) constituida por una célula madre central encargada de dividirse que se relaciona con alrededor de diez células indiferenciadas responsables de la diferenciación en productoras de queratina para formar una estructura en forma de celda hexagonal.

Otro modelo de la unidad proliferativa de la piel plantea la presencia de células ubicadas en la capa basal con características de progenitoras que se dividen un número ilimitado de veces de forma asimétrica para dar lugar a células que se van a diferenciar terminalmente.⁹

La dermis es la capa más profunda, de tejido conectivo, derivada del mesodermo, formada por dos regiones bien definidas, la dermis papilar de tejido conectivo laxo y la dermis reticular de tejido conectivo denso con la presencia de terminaciones nerviosas, vasos sanguíneos y una celularidad específica como el fibroblasto, las células cebadas y plasmáticas y otras células de la sangre que emigran a cumplir sus funciones en el tejido conectivo.^{3, 4.}

La principal función es actuar como una barrera protectora entre el medio interno y el externo, preserva las estructuras subyacentes y a sí misma de agresiones físicas, químicas y de agentes vivos. Contribuye a la regulación homeostática de la temperatura corporal, sintetiza melanina para la protección contra los rayos ultravioletas y permite constante comunicación con el medio externo por la presencia de receptores de la sensibilidad. Tiene un importante papel como órgano inmunocompetente. Su daño desencadena una respuesta de tipo inflamatoria que incide en la cicatrización y regeneración de los tejidos, función reparadora debido a que los componentes celulares de la epidermis son lábiles, con gran poder para la división celular y la síntesis de factores reguladores de los

procesos de proliferación celular por lo que participan activamente en la reparación de heridas, quemaduras y otras lesiones.^{3, 4.}

La cicatrización es el proceso por el cual se genera un nuevo tejido sin las funciones del tejido original y la regeneración implica la creación de tejido nuevo idéntico al primario, que conserva la función. Este proceso está regulado por mediadores que reciben el nombre de citoquinas, proteínas entre las que se encuentran los llamados factores de crecimientos como el epidérmico, el transformante, el derivado de las plaquetas y el del endotelio vascular entre otros.^{10-15.}

Consta de diferentes etapas relacionadas estrechamente: Hemostasia, inflamación, proliferación, remodelación y contracción.

La Hemostasia es la respuesta inicial en la que ocurre una vasoconstricción con la agregación de las plaquetas y la cascada de la coagulación para formar una barrera e impedir la contaminación bacteriana y la pérdida de fluidos.^{13, 15.}

En la Inflamación hay migración de los neutrófilos y los macrófagos hacia los tejidos dañados para la fagocitosis de bacterias, cuerpos extraños y tejido desvitalizado y amplifican la respuesta inflamatoria al actuar como sustancias quimiotácticas que atraen a otras células

En la Proliferación las células endoteliales, queratinocitos y fibroblastos sintetizan factores de crecimiento que estimulan la proliferación celular, la síntesis de proteínas de la matriz extracelular y la angiogénesis.^{13.}

Dentro de esta etapa ocurre la epitelización que comienza rápidamente tras la agresión y es una de las fases fundamentales pues permite la regeneración de la barrera de protección. Está organizada en una serie de eventos: El engrosamiento de la membrana basal. La elongación de las células. La liberación de la membrana basal. La migración en monocapa. La proliferación y la diferenciación.

Los queratinocitos migran desde las zonas no dañadas, los folículos pilosos y glándulas anexas, expresan filamentos de actina que actúan como el motor. Los desmosomas y los hemidesmosomas se desorganizan y las células se desplazan sobre la matriz de la herida que aportan nuevos componentes si la membrana basal está dañada, cuando está íntegra migran sobre ella.^{16-19.}

Las mitosis celulares comienzan entre el primer y segundo día después de la agresión. Si una célula se encuentra con otra idéntica cambia la dirección del movimiento y si se encuentra rodeada de células similares queda en reposo (inhibición por contacto). La estratificación comienza cuando ya se ha cubierto toda el área cruenta de la herida.

La epidermis neoformada no es igual a la intacta puesto que las crestas epidérmicas no son visibles, el epitelio es más grueso en los márgenes de la herida y en la zona central del área re-epitelizada.¹⁹

En la Remodelación hay un balance entre el depósito de colágeno en los tejidos, síntesis de colágeno y la actividad colagenolítica. Aumenta de manera progresiva hasta la cuarta semana y disminuye cuando aumenta la destrucción mediante colagenasas y en 21 días la acumulación de colágeno es estable y la fuerza tensil que es capaz de soportar la cicatriz es de un 15 % respecto a la piel normal y en el 80 % a los seis meses.¹⁷

La Contracción se inicia entre el cuarto o quinto días, con actividad máxima hacia el día 12 ó 15. Se debe a los miofibroblastos que se concentran en los márgenes de la herida y actúan como un esfínter en un proceso que no depende de la síntesis de colágeno.^{13, 20.}

MÉTODO

Se realizó un estudio experimental en 30 ratones isogénicos IOR, que fueron sometidos a una herida traumática con un instrumento perforo-cortante circular en el pabellón auricular derecho a nivel de la base en el sitio de unión de este con la cabeza, a forma de ponche circular de 2 mm de diámetro y fueron curados con crema de quitina diariamente durante 30 días, se tomaron las muestras con esta misma frecuencia y procesaron con una mezcla fijadora de formalina, ácido acético y alcohol, según Reina Ocano 1984. Los pabellones se incluyeron por el método clásico de la parafina, se realizó cortes en sentido longitudinal, de seis a ocho micrómetros, dispuestos en seis cortes por lámina, se utilizó la técnica de coloración de hematoxilina y eosina.

Se capturaron tres imágenes correspondientes a la región de la epidermis de las zonas apical, lateral derecho e izquierdo de cada lámina seleccionada, con una cámara digital marca Canon de ocho Mpx con un lente óptico de 3X, acoplada a un microscopio JENAMED 2 con lente objetivo 40X y lente ocular de 10X para un aumento total de 1200X. Estas imágenes se descargaron en una computadora ASUS y se codificaron para su identificación de la siguiente manera: zona apical (A), zonas lateral derecho (D) e izquierdo (I) de cada lámina respectivamente.

Los indicadores morfométricos se midieron con la aplicación en computación ImageJ del National Institutes of Health, USA, 2011. Para las mediciones se procedió a la calibración con un objetivo micrométrico de la Karl Zeiss.

Para realizar la medición de la densidad lineal de mitosis se superpuso una rejilla sobre la imagen y mediante la opción distancia lineal de la aplicación ImageJ se trazó una línea predefinida en la capa basal, en ella se contaron el total de células basales y las figuras de mitosis y se calculó el indicador mediante la fórmula:

$$Dm = ((CM / TC) / L) * 1000$$

Donde:

CM representa las células en mitosis en la longitud predefinida.

TC es el total de células contadas en la longitud predefinida.

L es la longitud de conteo predefinida.

Los resultados medidos por imágenes fueron promediados con vistas a obtener el valor definitivo de cada preparación histológica.

Los resultados fueron procesados con el editor estadístico profesional MyStat versión 12,0 del 2009, de la compañía SyStat. Se calculó la media, desviación estándar y el coeficiente de variación como parte de la estadística descriptiva, se desarrolló el test de normalidad para las series de datos (test de normalidad de Lillieford), se elaboraron los plexogramas de la densidad lineal de mitosis, según las zonas estudiadas y se calculó el análisis de varianza para comparar las diferencias entre las zonas estudiadas. Los resultados se muestran en cuadros, gráficos y figuras.

RESULTADOS

En la figura 1 que representa un corte histológico de la zona apical de la herida visto a mayor aumento se observan en la capa basal figuras típicas de mitosis. Este corte representa aproximadamente el sexto día del experimento donde ya se ha concluido la fase inflamatoria y el epitelio se encuentra en plena fase proliferativa.

En la figura 2 que representa un corte histológico de la zona lateral o borde de la herida, visto a mayor aumento, se observan en la capa basal figuras típicas de mitosis, este corte se obtuvo a los seis días del experimento.

En el cuadro 1 se puede observar los resultados de la densidad lineal de mitosis en las zonas estudiadas durante el periodo de tiempo que duró el experimento.

El valor promedio y su desviación estándar de la zona lateral izquierda fue de $1,9 \pm 0,64$, en la zona lateral derecha fue de $1,23 \pm 0,49$ y en la zona apical fue de $0,97 \pm 0,45$. (Cuadro 2).

Los resultados del coeficiente de variación fue de 0,54, 0,40 y 0,46 para las zonas lateral izquierda, derecha y la zona apical respectivamente, estos valores reflejan la poca variabilidad con la que fue medido este indicador (Cuadro 2).

Al analizar el comportamiento de la densidad lineal de mitosis del epitelio de la piel de la zona lateral derecha del pabellón auricular postraumático se aprecia que a las 24 horas del experimento ya encontramos valores elevados de densidad lineal de 2,50 los que descienden hasta el quinto día con valores que se mantienen a un ritmo de 1,0 a 1,50

hasta los trece días aproximadamente que comienzan a descender por debajo de 0,50 (gráfico 1).

El comportamiento de la densidad lineal de mitosis del epitelio de la piel de la zona lateral izquierda del pabellón auricular postraumático, al igual que en la zona lateral derecha desde las primeras horas del experimento se observan valores altos de densidad cercanos a 3,0 los que a partir del segundo día comienzan a descender y se mantienen alrededor de 1,0 hasta los trece días donde descienden hasta alrededor de 0,5.

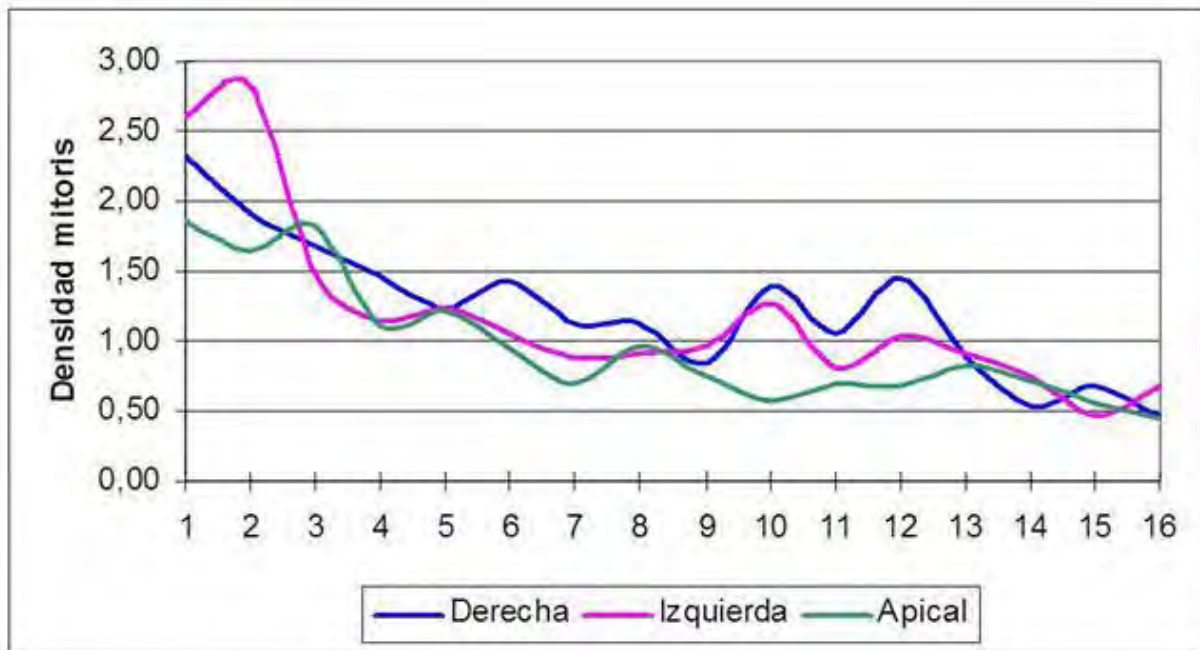
Este comportamiento guarda relación con lo explicado anteriormente sobre el papel que juegan los bordes laterales en el proceso de re-epitelización lo que favorece el espesor del epitelio y garantiza que el desplazamiento celular vaya en sentido a la zona apical.

En el comportamiento de la densidad lineal de mitosis del epitelio de la piel de la zona apical del pabellón auricular postraumático, donde observamos una tendencia al descenso desde los primeros días del experimento con un valor inicial de 1,5 a 2,0 y a partir del sexto día oscila entre 0,50 y 1,0.

Estos resultados demuestran el efecto estimulante sobre la zona apical de la herida sin embargo debemos tener presente que el incremento del espesor del epitelio en la zona apical está influenciado como señalamos anteriormente por el aporte que realizan los bordes a este proceso pero también consideramos que este epitelio neoformado y en fase de maduración puede presentar hipertrofia celular característica de los inicios de su conformación hasta su constitución definitiva.

Gráfico 1

Comportamiento de la densidad lineal de mitosis ($\mu\text{m}^{-1} \times 10^3$) del epitelio de la piel de la zona lateral derecha del pabellón auricular post traumático de ratones isogénicos IOR tratado con crema de quitina según tiempo del experimento.

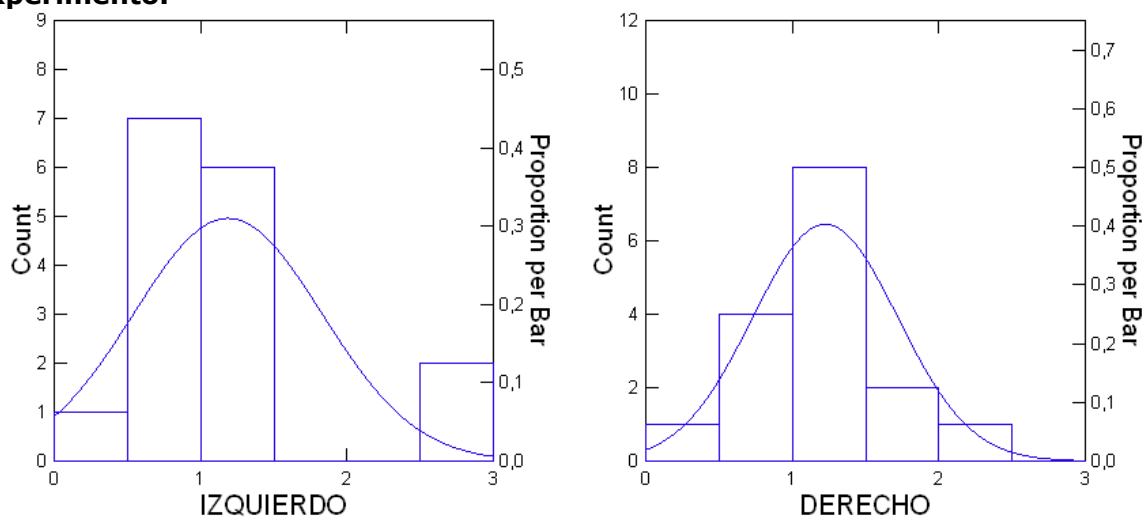


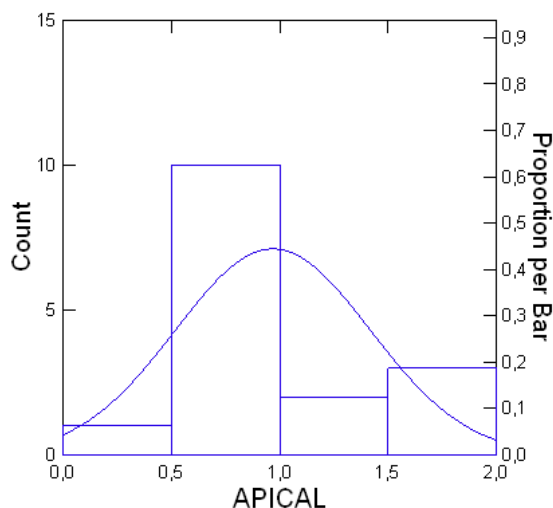
Fuente: Datos del autor.

En relación con la densidad lineal de mitosis y la comprobación de que los resultados se distribuyen normalmente, se elaboraron las gráficas de normalidad según el test de Lillieford (gráfico 4) donde se obtuvo valor significativo ($p \leq 0,02$) lo que demuestra que la densidad lineal de mitosis se inscribe como una curva normal.

GRÁFICO 4

Comportamiento de la normalidad de la densidad lineal de mitosis ($\mu\text{m}^{-1} \times 10^3$) del epitelio de la piel del pabellón auricular post traumático de ratones isogénicos IOR tratado con quitina según zonas estudiadas y tiempo del experimento.





Fuente: Procesamiento estadístico. Test de normalidad de Lillieford = 0,135 $p \leq 0,02$

Para evaluar la posibilidad de diferencias entre las zonas en relación con la densidad lineal de mitosis se aplicó el análisis de varianza donde se demuestra que no existen diferencias significativas, lo que se traduce en que la respuesta celular a los estímulos de la división inciden a lo largo de todo el epitelio con características similares (cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis de varianza de la densidad lineal de mitosis ($\mu\text{m}^{-1} \times 10^3$) del epitelio de la piel del pabellón auricular post traumático de ratones isogénicos IOR tratado con quitina según zonas estudiadas y tiempo del experimento.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor de F	Valor de p
Densidad	0,611	2	0,305	1,064	0,354
Error	12,907	45	0,287		

Fuente: Procesamiento estadístico.

La respuesta encontrada a los valores altos de la altura de la epidermis independientemente que estén relacionadas con las unidades proliferativas de la piel de reemplazar las células perdidas guarda relación estrecha también con el lógico proceso de maduración e hipertrofia celular que ocurren en estos procesos.

Bibliografía.

1. Jorcano Noval JL, Portal Publicaciones. Monografía 8. Aspectos biotecnológicos: Aplicaciones preclínicas y clínicas de piel generada a partir de células madre epidérmicas [monografía en Internet]. España: Real Academia Nacional de Farmacia; 2010: 223-257. [Citada 7 julio 2011]. Disponible en: <http://www.analesranf.com/index.php/mono>

2. Ross M H, Romrell LJ, Kaye G I. Histología Texto y Atlas a color. 4ta ed. México. Editorial Médica Panamericana, 2005. 402-435.
3. Junqueira L C; Carneiro J. Histología Básica. 6ta ed. Barcelona: Masson, 2005. 359-370.
4. Genecer F. Histología. [Monografía en CD-ROM]. 3ra ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 2000: p.445-464. [Consulta: 28 oct 2010].
5. Kotovski E F. Piel y sus derivados. En: Eliseiv V G. Histología. Moscú: Editorial Mir, 1983: p. 515-529.
6. Lancraft TM, DePecol Sanner M. Tortora Grabowski. Principios de Anatomía y fisiología. OXFORD University Press. 9na ed. 2002.
7. Manchelo Heinert J. Capitulo I. Morfofuncionalismo y embriogénesis cutánea. En: Calero Hidalgo G, Ollague Torres J.M. autores. Dermatología práctica actualización de conocimientos y experiencia docente. Ecuador; 2007. p. 10-28.
8. Palomino Yamamoto M. Fisiología de la piel Revista Peruana de Dermatología. 2001;11(2):120-134.
9. Olmos L, de Prada M.A. Epidermopoyesis y fisiología general. Departamento de. [monografía en Internet]. España: Dpto. Dermatología de la Universidad Complutense; 2010; 26 p. [Citada 2 julio 2011]. Disponible en: <http://www.dermocosmos.com/espanol/articulos/epidermocoi.pdf>
10. Gayton AC, Hall JE. Tratado de Fisiología Medica. 11na ed. España, ELSEVIER; 2007. p. 276, 433, 890, 983.
11. Marini MA y col. Consenso sobre cicatrización de heridas. Dermatología Argentina. 2008;14(4): 41 p.
12. Chiappe A. Cicatrización [monografía en Internet]. Colombia: Sociedad Colombiana de Cirugía Plástica. 2004. [Citada 7 julio 2011]. Disponible en: http://www.susmedicos.com/art_cicatrices_Chiaappe.htm.
13. Murfhy G F; Mihm M C. Capítulos III y IV. En: Cotran R S, Kumar V, Collins T. Patología Estructural y Funcional. 6ta ed. España: McGraw- Hill. Interamericana, 2000: p. 53-120.
14. Valencia Basto C. Cicatrización: Proceso de reparación tisular. Aproximaciones terapéuticas. Investigaciones Andinas. 2010;12(20):85-98.
15. Corrales Gomez C. Ingeniería tisular aplicación de células madre en reparación de defectos epidérmicos. Tesis doctoral [monografía en Internet]. España: Universidad de Alcala de Henares. 2006. [Citada 1 julio 2011]. Disponible en: <http://dspace.uah.es/jspqi/handle/10017/236>

16. Diego Polo V. Estudio planimetrico y autorradiografico de la epidermopoyesis humana normal. Tesis doctoral [monografía en Internet]. España: Universidad Complutense de Madris; 1986. 160 p. [Citada 12 junio 2011]. Disponible en: <http://tesis.com.es/documentos/estudio-planimetrico-autorradiografico-epidermopoyesis-humana-normal/>
17. Chirinos R, et col. Cicatrización inducida por el factor de crecimiento epidérmico. Dermatología Venezolana. 1992; 30(2): 99-104.
18. Andrades Gómez J.A. Un FGF-2 modificado acelera la cicatrización de las heridas [monografía en Internet]. España: Universidad de Malaga; 2000. [Citada 1 julio 2011]. Disponible en: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros72/fgf2.htm>
19. De la Cruz Vargas J.A. Receptor del factor de crecimiento epidérmico y cáncer. Tesis doctoral [monografía en Internet]. México: Universidad Nacional de la Plata; 2007. 148 p. [Citada 1 junio 2011]. Disponible en: http://www.med.unlp.edu.ar/link_publicaciones.php
20. Peng LH, Tsang SY, Tabata Y, Gao JQ. Genetically-manipulated adult stem cells as therapeutic agents and gene delivery vehicle for wound repair and regeneration. J Control Release. 2011;8(27):23-67.

ANEXOS

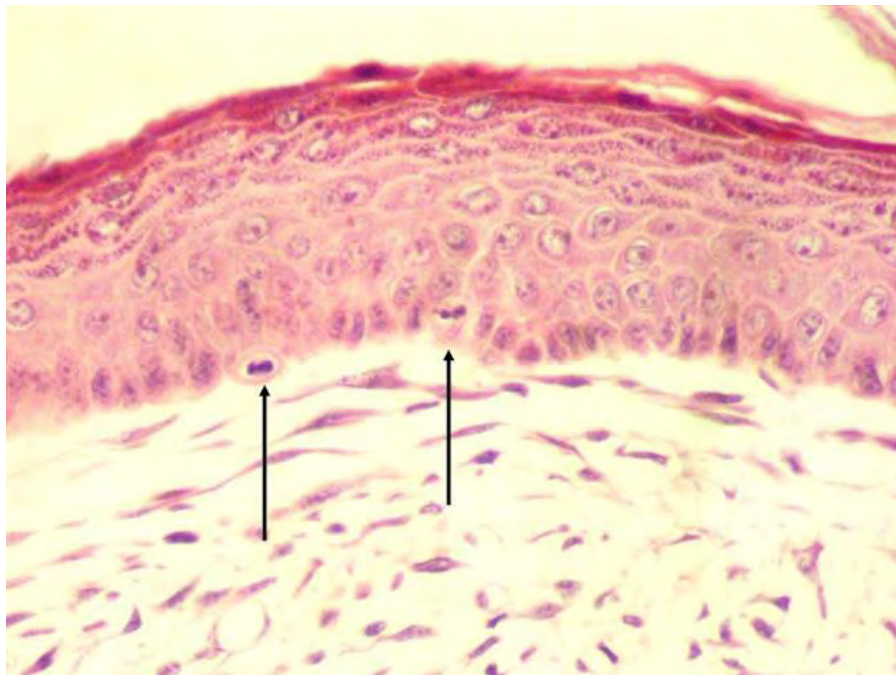


Figura 1. Microfotografía a 400x de la zona apical de piel del pabellón auricular traumático de orejas de ratones isogénicos línea IOR sometidos a tratamiento con crema de quitina donde se aprecian células en mitosis en etapa de profase (flechas). Tinción

Hematoxilina y Eosina

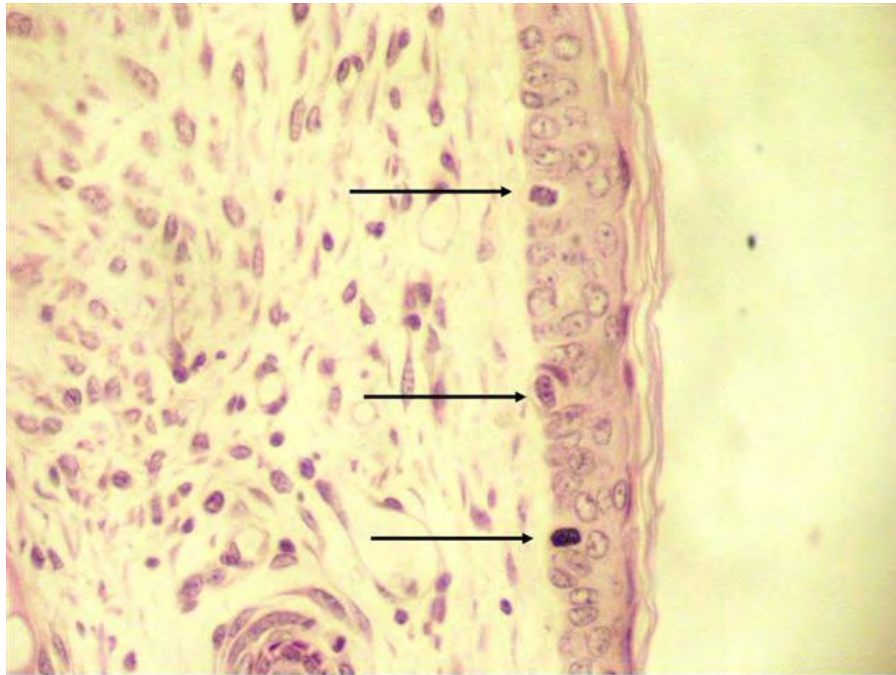


Figura 2. Microfotografía a 400x de la zona lateral de piel del pabellón auricular traumático de orejas de ratones isogénicos línea IOR sometidos a tratamiento con crema de quitina donde se aprecian células en mitosis en etapa de profase (flechas). Tinción Hematoxilina y Eosina.

Cuadro 1. Resultados de la densidad lineal de mitosis ($\mu\text{m}^{-1} \times 10^3$) del epitelio de la piel del pabellón auricular post traumático de ratones isogénicos IOR tratado con crema de quitina según zonas estudiadas y tiempo del experimento.

Tiempo en días	Zonas del pabellón		
	Izquierda	Derecha	Apical
1	2,60	2,31	1,85
2	2,82	1,91	1,65
3	1,47	1,68	1,83
4	1,14	1,46	1,11
5	1,24	1,24	1,21
6	1,05	1,43	0,94
7	0,88	1,12	0,71
8	0,90	1,13	0,96
9	0,96	0,84	0,75
10	1,27	1,39	0,56
11	0,81	1,05	0,69
12	1,03	1,45	0,68

13	0,91	0,90	0,83
14	0,76	0,54	0,72
15	0,46	0,69	0,55
15	0,68	0,46	0,46

Fuente: Datos primarios.

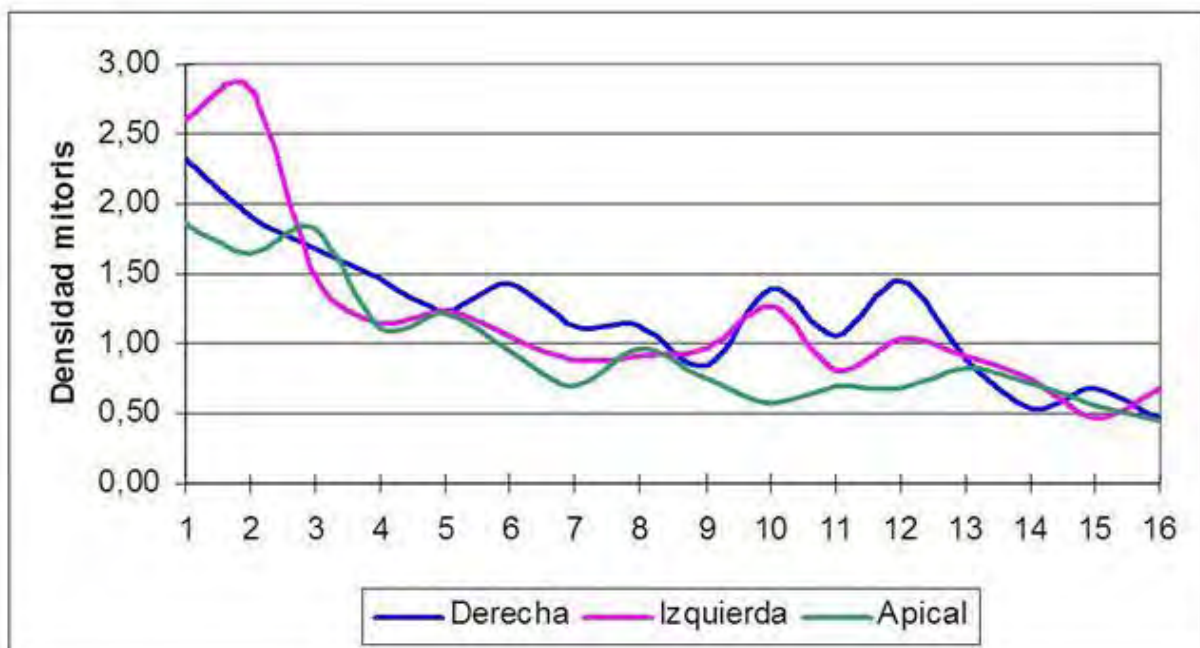
Cuadro 2. Resultados del promedio y su desviación estándar de la densidad lineal de mitosis ($\mu\text{m}^{-1} \times 10^3$) del epitelio de la piel del pabellón auricular post traumático de ratones isogénicos IOR tratado con crema de quitina según zonas estudiadas.

Estadísticos	Zonas del pabellón		
	Izquierda	Derecha	Apical
Promedio	1,19	1,23	0,97
Desviación estándar	0,64	0,49	0,45
Coeficiente de variación	0,54	0,40	0,46

Fuente: Procesamiento estadístico.

Gráfico 1

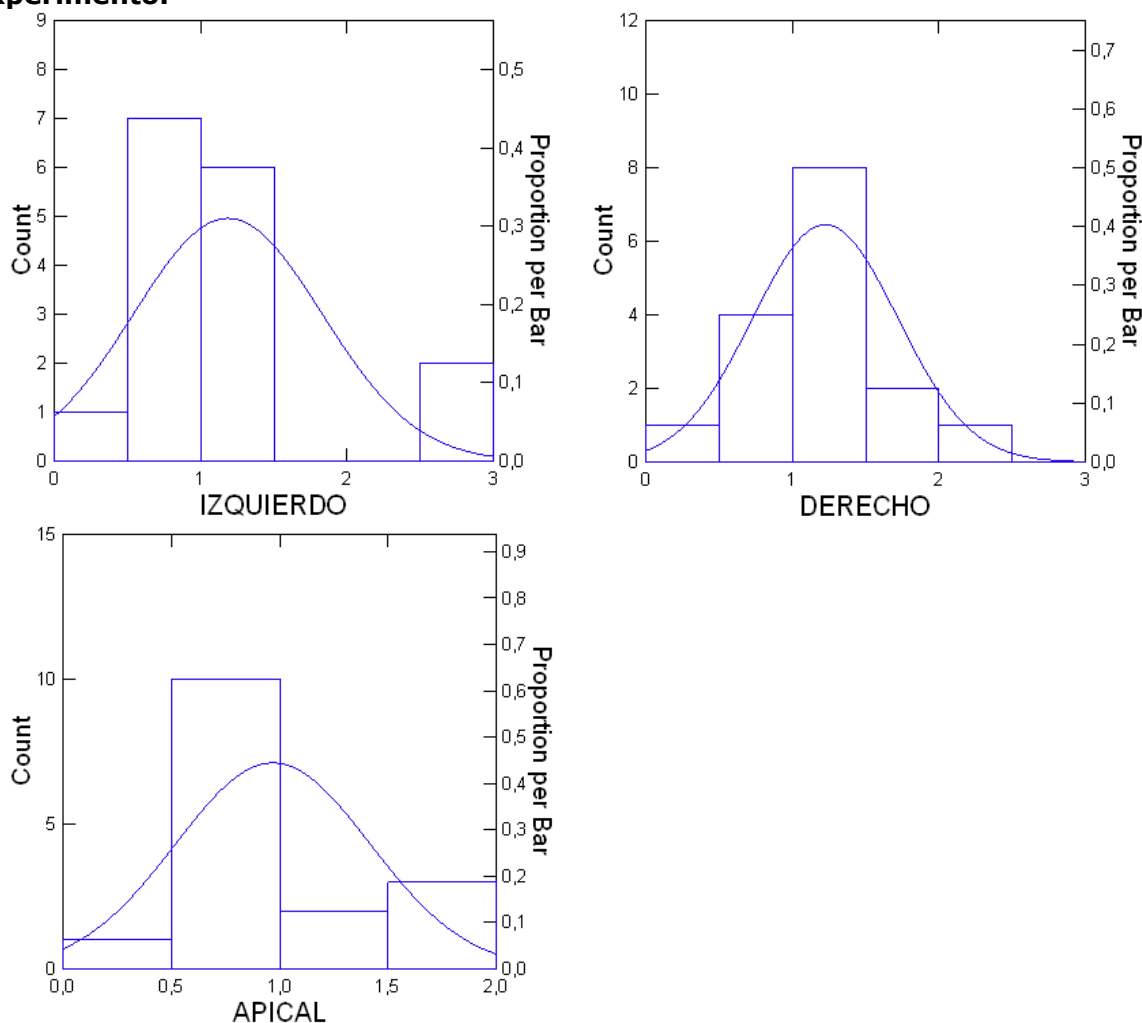
Comportamiento de la densidad lineal de mitosis ($\mu\text{m}^{-1} \times 10^3$) del epitelio de la piel de la zona lateral derecha del pabellón auricular post traumático de ratones isogénicos IOR tratado con crema de quitina según tiempo del experimento.



Fuente: Datos del autor.

GRÁFICO 4

Comportamiento de la normalidad de la densidad lineal de mitosis ($\mu\text{m}^{-1} \times 10^3$) del epitelio de la piel del pabellón auricular post traumático de ratones isogénicos IOR tratado con quitina según zonas estudiadas y tiempo del experimento.



Fuente: Procesamiento estadístico. Test de normalidad de Lillieford = 0,135 $p \leq 0,02$

Cuadro 3. Análisis de varianza de la densidad lineal de mitosis ($\mu\text{m}^{-1} \times 10^3$) del epitelio de la piel del pabellón auricular post traumático de ratones isogénicos IOR tratado con quitina según zonas estudiadas y tiempo del experimento.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor de F	Valor de p
Densidad	0,611	2	0,305	1,064	0,354
Error	12,907	45	0,287		

Fuente: Procesamiento estadístico.