

Aumento de la expresión del proteoglicano condroitín-sulfato, fibronectina y fibroblastos en la estenosis hipertrófica de píloro*

C. Pueyo Gil¹, K. Oshiro², J. Elías Pollina¹, J.A. Esteban Ibarz¹, P. Puri²

¹Hospital Infantil Universitario «Miguel Servet», Zaragoza. ²Research Center «Our Lady's Hospital for Sick Children», Crumlin, Dublin

RESUMEN: Introducción. La estenosis hipertrófica de píloro (EHP) se caracteriza por la hipertrofia de la capa muscular del píloro. Su etiología permanece todavía desconocida. En los últimos años ha sido publicado algún trabajo que estudia la matriz extracelular (MEC) en la EHP. Nuestro objetivo fue investigar la expresión de dos moléculas de MEC: el proteoglicano condroitín-sulfato (PGCS) y la fibronectina (FN), así como la de los fibroblastos.

Material y métodos. Las biopsias del píloro fueron obtenidas de 33 pacientes con EHP y 12 controles. Se utilizó inmunohistoquímica indirecta usando anticuerpos monoclonales dirigidos contra el PGCS, la FN y los fibroblastos. Los resultados fueron expresados mediante una escala semicuantitativa, como sigue: fuerte (++), moderada (+), débil (+/-) y ausente (-).

Resultados. Se demostró que la inmunorreactividad para el PGCS se localizaba en el tejido conjuntivo de los septos, y la de la FN en el espacio pericelular. Ambas moléculas estaban muy aumentadas en la capa muscular del píloro con EHP con relación a la capa muscular de los píloros control. También demostramos un marcado aumento en la expresión del número de fibroblastos en la capa muscular del píloro con EHP. Aunque la mayor expresión se localizó en los septos, también observamos gran número entre las células de músculo liso.

Conclusiones. Sugerimos que la EHP, no sólo se caracteriza por la hipertrofia de la capa muscular, sino también por el aumento de varias moléculas de la MEC, como el PGCS y la FN. También sugerimos que el aumento de fibroblastos podría explicar la mayor expresión de estas moléculas de MEC en la capa muscular del píloro con EHP.

PALABRAS CLAVE: Estenosis hipertrófica de píloro; Matriz extracelular; Proteoglicano condroitín-sulfato; Fibronectina; Fibroblasto.

INCREASE OF THE CHONDROITIN-SULFATE PROTEOGLYCAN, FIBRONECTIN AND FIBROBLASTS IN INFANTILE HYPERTROPHIC PYLORIC STENOSIS

ABSTRACT: Introduction. Infantile hypertrophic pyloric stenosis (IHPS) consists of hypertrophy of the muscular layer of the pylorus. Its etiology is still unknown. In the last years only few jobs that studied the extracellular matrix (ECM) in the muscular layer in the IHPS have been reported.

Correspondencia: Dr. Carlos Pueyo Gil, Servicio de Cirugía Pediátrica, Hospital Infantil «Miguel Servet», Pº de Isabel la Católica 1-3, 50009 Zaragoza.

*Presentado en el XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Pediátrica. Santander, 24 al 27 de mayo del 2000.

Financiado con fondos del FIS. Expediente 97/5111.

Our aim was to investigate the expression of two ECM molecules: chondroitin-sulfate proteoglycan (CSPG) and fibronectin (FN), and fibroblasts.

Material and methods. Full-thickness muscle biopsy specimens were obtained from 33 IHPS patients at pyloromyotomy and 12 controls. Indirect immunohistochemistry was performed using CSPG, FN and fibroblasts monoclonal antibodies. The results were showed by a semiquantitative scale as follows: strong (++), moderate (+), weak (+/-), and absent (-).

Results. We demonstrated that the CSPG immunoreactivity was localized in the connective tissue septa and the expression of FN molecules in the pericellular space. Both molecules were significantly the increased in the muscle layer of the pylorus with IHPS in relation to control pylorus. We also demonstrated a marked increased expression in the number of fibroblasts in the muscle layer of the pylorus with IHPS. Eventhough the most striking increase was localized in the septa, we also observed great number of fibroblasts amongst the smooth muscle cells.

Conclusions. We suggest that IHPS is characterized, not only by the muscle layer hypertrophy, but also by the increase of several ECM molecules, such as CSPG and FN. We also think that the increase of fibroblast could explain the higher expression of both ECM molecules in the muscle layer of pylorus in IHPS.

KEY WORDS: Infantile hypertrophic pyloric stenosis; Extracellular matrix; Chondroitin sulfate proteoglycan; Fibronectin; Fibroblast.

INTRODUCCIÓN

La estenosis hipertrófica de píloro (EHP) es una enfermedad pediátrica frecuente que se caracteriza por un cuadro clínico de vómitos alimentarios alrededor del mes de vida y que deriva, si no es tratado precozmente, en una alteración metabólica definida por la presencia de una alcalosis metabólica hipoclorémica. La primera descripción se remonta a 1717 en que el cirujano y botánico escocés Patrick Blair observó que el cuadro clínico se acompañaba con la aparición en las necropsias de un píloro hipertrófico. La incidencia de esta enfermedad se encuentra entre 0,1 y 1% y parece que está aumentando⁽¹⁾ en los últimos años.

Clásicamente, la EHP ha sido definida histopatológicamente por la presencia de hipertrofia y, en menor medida, hiperplasia de las células de músculo liso de la capa muscular del píloro.

Existen muchos trabajos que han intentado explicar el origen de esta enfermedad entre los que destacan aquéllos que describen la disminución de las fibras nerviosas que contienen polipéptido intestinal vasoactivo (VIP)⁽²⁾ o la disminución de óxido nítrico en la capa muscular del píloro hipertrófico⁽³⁾.

En los años 50 se describe el aumento de tejido conjuntivo en la capa muscular del píloro con EHP^(4,5), pero no es hasta la aparición, en 1991, de un trabajo de Cass y Zhang⁽⁶⁾ en el que, con técnicas de inmunohistoquímica, se vuelve a retomar este aspecto y se describe el aumento de determinadas moléculas de la matriz extracelular entre las que destacan el proteoglicano condroitín-sulfato (PGCS) y la fibronectina (FN). El PGCS es una molécula que se encuentra distribuida ampliamente en los tejidos conjuntivos. La FN es una glicoproteína que actúa como ligando entre las células y las fibras y moléculas de la matriz extracelular (MEC) de los tejidos. Es bien conocido que la principal célula que sintetiza y produce las moléculas que van a constituir las fibras y la sustancia amorfa del tejido conectivo son los fibroblastos.

El trabajo intenta confirmar que en la EHP, además de una hipertrofia de las células de músculo liso de la capa muscular del píloro, también existe un aumento de las moléculas de matriz extracelular PGCS y FN, y su asociación a un aumento en la expresión de fibroblastos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Realizamos un estudio de casos-control en el que las biopsias de píloros normales que, en forma de huso estaban constituidas por las 4 capas (mucosa, submucosa, muscular y serosa), fueron obtenidas de 12 necropsias de niños (8 varones y 4 mujeres), con una edad media de 31,8 días (5-150 d) y cuya causa de fallecimiento no tuvo relación alguna con la EHP, y en las que se consideró que el píloro era macroscópicamente normal: 6 muertes súbitas, 3 hernias diafragmáticas congénitas, 2 malformaciones cardíacas complejas y una atresia de esófago con fístula traqueoesofágica distal. Las biopsias de píloros con EHP, que incluían únicamente la serosa y muscular, procedían de 33 niños (25 varones y 8 mujeres) con una edad media de 38,1 días (1-103 d). Todas las biopsias fueron recogidas en una gasa humedecida con suero fisiológico y procesadas en un intervalo inferior a 2 horas desde su obtención. Las muestras utilizadas para el estudio del PGCS fueron fijadas en formalina y embebidas en parafina. Las empleadas para el estudio de la FN y de los fibroblastos fueron congeladas en fresco y fijadas posteriormente en acetona.

Las moléculas fueron detectadas por medio de una técnica que las tiñe en el propio tejido estudiado: la inmunohistoquímica indirecta.

Inmunohistoquímica indirecta (Fig. 1)

Para visualizar las moléculas del PGCS y a los fibroblastos se utilizó una técnica de inmunohistoquímica indirecta. Esta

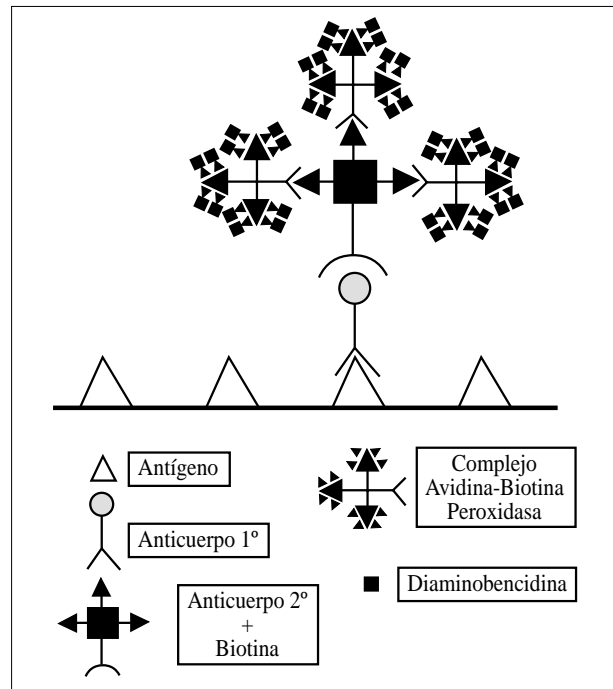


Figura 1. Esquema de la técnica de inmunohistoquímica indirecta, empleando el complejo de amplificación de avidina-biotina-peroxidasa.

técnica se basa en la aplicación de una serie de anticuerpos monoclonales que detectan el PGCS (clón CS-56; dilución 1:200; Sigma Bio-Sciences), la FN (clón IST-4; dilución 1:100; Sigma Bio-Sciences) y la enzima prolil-4-hidroxilasa de los fibroblastos (clón 5B5; dilución 1:50; DAKO). Antes de la aplicación de estos anticuerpos, los cortes histológicos fueron tratados con peroxidasa de hidrógeno para bloquear la peroxidasa endógena de los hematíes y con ello evitar su tinción y mejorar los resultados. Todas las secciones fueron incubadas, primero con un anticuerpo durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido por la aplicación del anticuerpo monoclonal específico a 4°C durante 12 horas. Sobre esta reacción se aplicó un 2º anticuerpo marcado con biotina durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente y aprovechando la gran afinidad que la biotina tiene por la avidina del complejo de amplificación avidina-biotina-peroxidasa los cortes fueron incubados con este complejo. La enzima peroxidasa, a su vez, tiene la capacidad de fijar la diaminobencidina, sustancia cromógena que proporciona una tinción marrón, con lo cual, el resultado o la visualización de la molécula a estudio en el propio corte tisular se pone en evidencia en forma de una tinción marrón.

Los resultados fueron valorados por dos investigadores de forma independiente, atendiendo a una escala semicuantitativa que los dividía en cuatro grupos según la fuerza de expresión de la tinción: ausente (-); leve (+/-); moderada (+); fuerte (++) . Analizamos los resultados mediante microscopio óp-

Tabla I Expresión de la inmunorreactividad en la capa muscular del píloro hipertrófico para el PGCS, la FN y los fibroblastos

		PGCS				FN				Fibroblastos			
		++	+	+/-	-	++	+	+/-	-	++	+	+/-	-
EHP	Músculo	0	0	0	0	15	18	0	0	8	15	8	2
	Tabiques	26	7	0	0	0	0	0	0	17	13	1	2
Control	Músculo	0	0	0	0	0	3	9	0	0	0	4	8
	Tabiques	0	2	10	0	0	0	0	0	0	0	12	0

PGCS: *Proteoglicano condroitín-sulfato*; FN: *Fibronectina*. (++) : Fuerte; (+) : Moderada; (+/-) : Leve; (-) : Ausente.

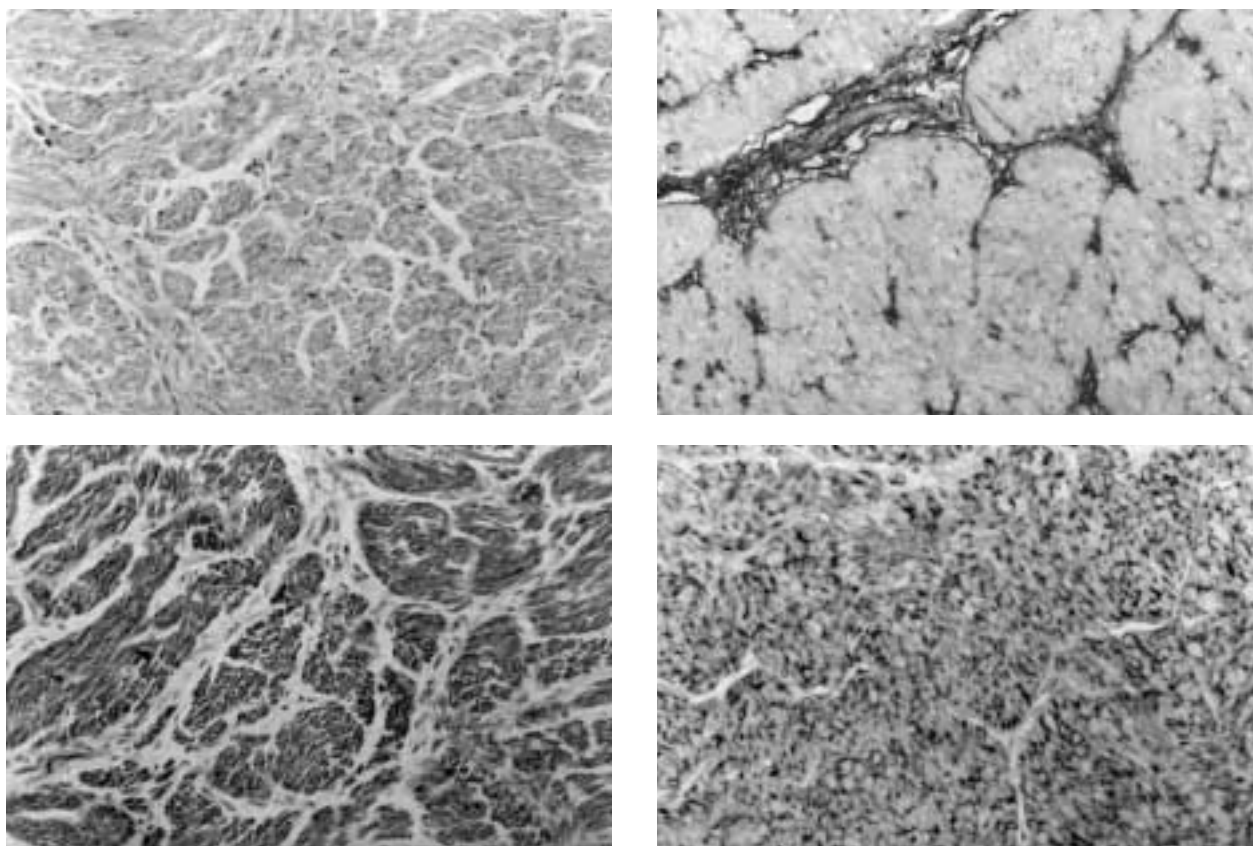


Figura 2. Estudio mediante inmunohistoquímica indirecta de la expresión del PGCS: A) píloro normal; B) píloro con EHP y de la FN; C) píloro normal; D) píloro con EHP (x250). Se observa la distribución del PGCS en los tabiques y de la FN en el espacio pericelular.

tico, empleando aumentos x80, x250, x400. Para comparar estos resultados y valorar la existencia o no de diferencias significativas entre el grupo control y el de niños con EHP utilizamos la prueba estadística no paramétrica U de Mann-Whitney, con un nivel de significación inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Los resultados están resumidos en la tabla 1. Cuando valoramos los resultados obtenidos al estudiar las

moléculas PGCS pudimos observar que su expresión en niños con EHP se encontraba limitada a los septos de tejido conectivo que atraviesan la capa muscular propia del píloro. Su expresión fue mucho más manifiesta que la encontrada en los septos de la capa muscular de los píloros normales, debido a que, mientras en el 100% de los casos de píloro hipertrófico existía una expresión fuerte o moderada, sólo en el 16,7% de los controles se alcanzaba una manifestación, al menos, moderada. La diferencia de expresión de la molécula de PGCS entre el grupo control y el de la EHP era estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Fig. 2A, B).

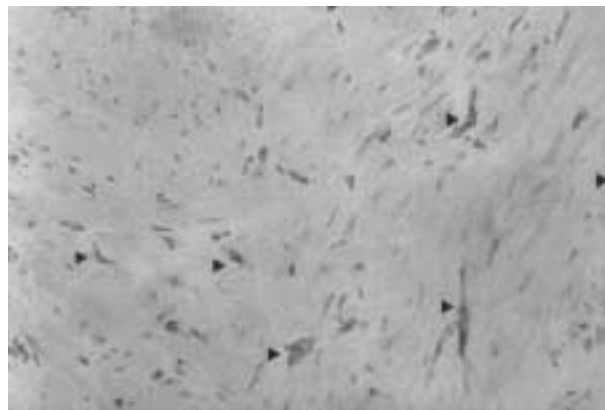
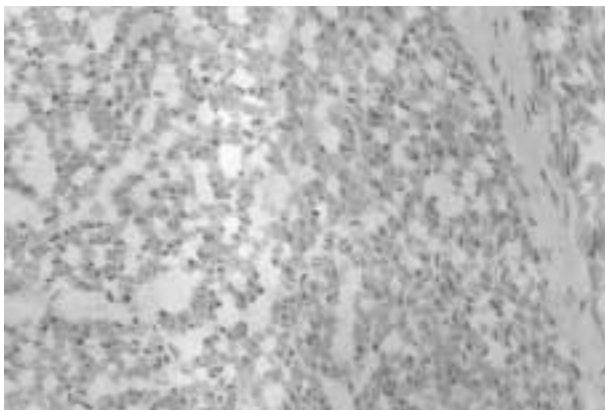


Figura 3. Estudio mediante inmunohistoquímica indirecta de la expresión de los fibroblastos en la capa muscular de: A) píloro normal, y B) píloro de niño con EHP. Nótese la abundancia de estas células (►) (x250).

Cuando analizamos los cortes histológicos de la capa muscular de píloros normales y con EHP a los que habíamos aplicado el anticuerpo dirigido contra la FN, observamos que esta molécula se distribuía en el espacio pericelular, rodeando a las propias células de músculo liso, pero estaba ausente en los septos. Observamos que la expresión de la tinción era intensa o moderada en el 100% de las biopsias procedentes de los píloros de niños con EHP, mientras que sólo el 25% alcanzaba a ser moderada en las biopsias de los píloros normales, correspondiendo a unas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Fig. 2C, D).

Por último, analizamos la presencia de fibroblastos en la capa muscular de los cortes histológicos de las biopsias de aquellos píloros procedentes de niños con EHP y de los procedentes de necropsias de niños sin esta patología. En el primer grupo pudimos apreciar un incremento en la expresión de estas células, con una expresión fuerte o moderada en el 90% de los tabiques de tejido conjuntivo que atravesaban la capa muscular del píloro y en el 70% de los propios fascículos musculares que estos tabiques delimitaban. Por el contrario, en el grupo control la expresión en la cantidad de fibroblastos estaba mucho más limitada, tanto en los tabiques, como entre las propias células de músculo liso de la capa muscular (Fig. 3A, B). Estas diferencias, al igual que con las moléculas anteriores, también eran significativas ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

La EHP es una patología típica del lactante, caracterizada histológicamente por la hipertrofia de las células del músculo liso de la capa muscular del píloro. A estos claros hallazgos se les ha intentado proporcionar una base etiopatogénica. En este sentido existen trabajos que, mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas, han intentado ha-

llar el origen de esta enfermedad. Entre ellos destacan los que estudian la inervación de esta zona distal del estómago, encontrando disminución de las fibras nerviosas o de los ganglios de los plexos entéricos⁽⁴⁾, disminución de las células intersticiales de Cajal⁽⁷⁾ o reducción en la capa muscular de determinados neurotransmisores con función de relajación del músculo liso, como el VIP⁽²⁾ o más recientemente el óxido nítrico^(3, 8).

Nuestro trabajo estudia el espacio extracelular de la capa muscular del píloro de niños con EHP. Este espacio contiene dos componentes: el celular y la MEC. El último está formado por fibras, como las de colágeno y elastina y por una sustancia fundamental amorfa compuesta por una serie de glicoproteínas. Aunque ya en los años 50^(4, 5) se había descrito que en la capa muscular del píloro con EHP existía un aumento del tejido conjuntivo, no es hasta la llegada de nuevas técnicas de tinción, como la inmunohistoquímica o la inmunofluorescencia y la utilización de anticuerpos monoclonales, cuando se retoma el interés por el tejido conjuntivo de la capa muscular del píloro hipertrófico, como lo demuestra el trabajo de Miyazaki que describe el aumento de la expresividad de procolágeno⁽⁹⁾, y el de Cass y Zhang⁽⁶⁾ que demuestran el aumento de determinadas moléculas de la MEC en la capa muscular del píloro de niños con EHP con relación al píloro normal e incluso con relación a la capa muscular hipertrófica de segmentos intestinales proximales a una obstrucción demostrada durante el período neonatal, en la que la hipertrofia muscular se desarrollaría secundariamente al esfuerzo por intentar vencer la dificultad o la imposibilidad del tránsito. De sus hallazgos dedujeron que el aumento de estas moléculas sería específico de la EHP.

Nuestros resultados, como los de Cass y Zhang, demuestran un aumento del PGCS y la FN en la capa muscular del píloro de pacientes con EHP. Las moléculas de la MEC intervienen en la adherencia, proliferación, migración y di-

ferenciación celular, actividades demostradas en la migración de las células de la cresta neural⁽¹⁰⁾, en el desarrollo embrionario⁽¹¹⁾, en la cicatrización de heridas⁽¹²⁾ y en la evolución de algunos tumores⁽¹³⁾. En ciertos trabajos experimentales se ha descrito que concentraciones elevadas del PGCS podrían impedir que los precursores de neuronas y células gliales llegaran a regiones potencialmente ganglionares⁽¹⁴⁾. Debido a que las células del músculo liso pueden producir grandes cantidades de PGCS, la distribución anormal de esta molécula podría reflejar un desarrollo alterado de las células precursoras de las células del músculo liso intestinal⁽¹⁵⁾. En este sentido, también se ha descrito un aumento de FN en las láminas basales de las células de músculo liso de la «muscularis mucosae» y en la muscular propia del intestino agangliónico⁽¹⁶⁾.

Además del aumento de determinadas moléculas de la matriz extracelular en la capa muscular del píloro hipertrofico, también hemos demostrado el aumento de la expresión de la célula principal del tejido conjuntivo, el fibroblasto. Este incremento celular podría explicar el aumento de la expresión del PGCS y la FN, o también, como describió Miyazaki⁽⁹⁾, del colágeno. Entre los factores que han intentado explicar el aumento de los fibroblastos destaca la capacidad de la propia FN para producir quimiotaxis de estas células⁽¹⁷⁾, como sucede en enfermedades pulmonares intersticiales⁽¹⁸⁾ o en glomerulonefritis inducidas en conejos⁽¹⁹⁾.

En conclusión, proponemos que la EHP no sólo está formada por la hipertrofia de las células del músculo liso de la capa muscular, sino también por un aumento de determinadas moléculas de la matriz extracelular, como el PGCS y la FN. También sugerimos que el aumento de fibroblastos en este tejido podría explicar la mayor manifestación de estas moléculas en la capa muscular del píloro.

BIBLIOGRAFÍA

- Jedd MB, Melton LJ III, Griffin MR, Kaufman BH, Hoffman AD, Broughton DD, y cols. Trends in infantile hypertrophic pyloric stenosis in Olmsted County, Minnesota, 1950-1984. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1988;**2**:148-157.
- Grisoni E, De Agustin JC, Kalhan SC. Vasoactive intestinal polypeptide causes relaxation of the pyloric sphincter in rabbit. *J Pediatr Surg* 1993;**29**:1117-1120.
- Vanderwinden JM, Mailleux P, Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ, De Laet MH. Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *N Engl J Med* 1992;**327**:511-515.
- Belding HH, Kernohan JW. A morphologic study of the myenteric plexus and musculature of the pylorus. *Surg Gynecol Obstet* 1953;**97**:322-334.
- Alarotu H. The histopathologic changes in the myenteric plexus of the pylorus in hypertrophic pyloric stenosis of infants (pyloros-pasm). *Acta Paediatr* 1956;**45**(Suppl 107):1-131.
- Cass DT, Zhang AL. Extracellular matrix changes in congenital hypertrophic pyloric stenosis. *Pediatr Surg Int* 1991;**6**:190-194.
- Vanderwinden J-M, Liu H, De Laet M-H, Vanderhaeghen J-J. Study of the interstitial cells of Cajal in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Gastroenterology* 1996;**111**:279-288.
- Grisoni E, Dusleag D, Super D. Nitric oxide synthesis inhibition: The effect on rabbit pyloric muscle. *J Pediatr Surg* 1996;**31**:800-804.
- Miyazaki E, Yamataka T, Ohshiro K, Taira Y, Puri P. Active collagen synthesis in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Pediatr Surg Int* 1998;**13**:237-239.
- Fujimoyto T, Hata J, Yokoyama S, Mitomi T. A study of the extracellular matrix protein as the migration pathway of neural crest cells in the gut: analysis in human embryos with special reference in the pathogenesis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1989;**24**:550-556.
- Peterson P, Pow T, Wilson DB, Hendrickx AG. Distribution of extracellular matrix components during early embryonic development in the macaque. *Acta Anat* 1993;**146**:3-13.
- Welch MP, Odland GF, Clark RAF. Temporal relationship of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol* 1990;**10**:133-145.
- David L, Nesland JM, Holm R, Sobrinho-Simoes M. Expression of laminin, collagen IV, fibronectin and type IV collagenase in gastric carcinoma. *Cancer* 1994;**73**:518-527.
- Tennyson VM, Payette RF, Rothman TP, Gershon MD. Distribution of hyaluronic acid and chondroitin sulfate proteoglycans in the presumptive aganglionic terminal bowel of ls/ls fetal mice: an ultrastructural analysis. *J Comp Neurol* 1990;**291**:345-362.
- Chang Y, Yanagishita M, Hascall VC, Wight TN. Proteoglycans synthesized by smooth muscle cells derived from monkey (Macaca nemestrina) aorta. *J Biol Chem* 1983;**258**:5679-5688.
- Parikh DH, Tam PKH, Van Velzen D, Edgar D. The extracellular matrix components, tenascin and fibronectin in Hirschsprung's disease: an immunohistochemical study. *J Pediatr Surg* 1994;**20**:1302-1306.
- Albini A, Adelmann-Grill B, Müller PK. Fibroblast chemotaxis. *Coll Rel Res* 1985;**5**:283-296.
- Rennard SI, Hunninghake GW, Bitterman PB, Crystal RG. Production of fibronectin by the human AM: Mechanism of the recruitment of fibroblasts to sites of tissue injury during interstitial lung diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;**78**:7147-7151.
- Gharaee-Kermani M, Wiggins R, Wolber F, Goyal M, Phan SH. Fibronectin is the major fibroblast chemoattract in rabbit anti-glomerular basement membrane disease. *Am J Pathol* 1996;**148**:961-967.