

Estudio de fibras colágenas y elásticas del tejido conjuntivo de pacientes con y sin hernia inguinal primaria

Pablo Bórquez M, Luis Garrido O, Carlos Manterola D, Patricio Peña S^a, Carol Schlageter T^b, Juan José Orellana C^c, Hugo Ulloa U^d, Juan Luis Peña R^e.

Collagen and elastic fibers of skin connective tissue in patients with and without primary inguinal hernia

Background: *There are few studies looking for collagen matrix defects in patients with inguinal hernia. Aim:* To study the skin connective tissue in patients with and without inguinal hernia. **Patients and methods:** *Skin from the surgical wound was obtained from 23 patients with and 23 patients without inguinal hernia. The samples were processed for conventional light microscopy. Collagen fibers were stained with Van Giesson and elastic fibers with Weigert stain. Results:* Patients without hernia had compact collagen tracts homogenously distributed towards the deep dermis. In contrast, patients with hernia had zones in the dermis with thinner and disaggregated collagen tracts. Connective tissue had a lax aspect in these patients. Collagen fiber density was 52% lower in patients with hernia, compared to subjects without hernia. No differences in elastic fiber density or distribution was observed between groups. **Conclusions:** *Patients with inguinal hernia have alterations in skin collagen fiber quality and density (Rev Méd Chile 2003; 131: 1273-79).*

(Key Words: *Collagen; Elastin; Hernia inguinal)*

Recibido el 8 de abril, 2003. Aceptado el 11 de julio, 2003.

Trabajo financiado por Proyecto DIUFRO INI # 110204.

Servicio y Departamento de Cirugía, Hospital Regional de Temuco. Unidad de Histología, Departamento de Ciencias, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. CIGES (Capacitación, Investigación y Gestión para la Salud Basada en Evidencias).

^a Tecnólogo Médico, Magíster en Ciencias.

^b Químico Farmacéutico, Alumna del Programa de Magíster en Epidemiología Clínica (CIGES).

^c Profesor de Matemáticas, Magíster en Bioestadística.

^d Estudiante de Medicina.

Correspondencia a: Dr. Pablo Bórquez M. Servicio de Cirugía, Hospital Base de Osorno, X región, Chile. Av. Dr. Guillermo Bühler #1765, Osorno. Fono: 56-064-259200. Fono fax: 56-064-259228. E mail: tellomor@surnet.cl

La patogenia de la hernia inguinal primaria es compleja y multifactorial. Hay una serie de factores asociados a la aparición de esta patología, entre ellos: biomecánicos (ángulo de inserción de las fibras del arco del músculo transversal, la oblicuidad del trayecto inguinal y mecanismo de compuerta)¹, metabólicos como en el tabaquismo que genera en sangre periférica proteasas y elastasas que degradan las fibras colágenas y elásticas en los distintos tejidos conectivos y que por esta vía, se asocia al desarrollo de hernias inguinales². Un tercer grupo de factores está dado por cuadros clínicos como prostatismo, constipación, embarazo, ascitis, desnutrición, obesidad y enfermedades genéticas del tejido conjuntivo como enfermedad de Ehlers Danlos y el síndrome de Marfan, entidades que favorecen la aparición o desarrollo de una hernia inguinal³.

Por otra parte, existen pocos estudios histológicos que demuestren alteraciones en las fibras del tejido conjuntivo de pacientes con hernia inguinal primaria, pero parece ser que su importancia como factor etiológico es mayor del que se estimaba⁴⁻⁹. En relación a ello, nos planteamos si existiría alteración de las fibras elásticas y colágenas del tejido conjuntivo de pacientes portadores de hernia inguinal primaria operados en nuestro servicio al compararlos con un grupo de sujetos sin hernia, empleando histoquímica convencional en el tejido conectivo de pacientes con y sin hernia inguinal primaria para determinar las características (grosor y densidad) de fibras elásticas y colágenas de pacientes con hernia inguinal primaria y compararlos con sujetos sin hernia inguinal.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio de casos controles: sobre una población de pacientes con hernia inguinal y sujetos sin hernia inguinal (se utilizaron como grupo de control pacientes con apendicitis aguda), todos intervenidos quirúrgicamente en el Hospital Regional de Temuco entre abril y diciembre de 2002, de ambos sexos y edad entre 15 y 50 años. El estudio se realizó en muestras de piel debido a que es el principal órgano efector del colágeno y fibras elásticas.

Criterios de exclusión. Se excluyeron en ambos grupos pacientes con prostatismo, constipación

(menos de 3 eliminaciones de deposiciones por semana), tabaquismo, obesidad (índice de masa corporal >30), enfermedades crónicas, neoplasias, embarazo y enfermedades genéticas del tejido conjuntivo como enfermedad de Ehlers Danlos y síndrome de Marfan.

Protocolo de trabajo. A cada paciente se le extrajo, de la incisión quirúrgica (inguinal o de fosa iliaca derecha), un trozo de piel de 3 x 10 mm, que se depositó de inmediato en fijador de Bouin. Las muestras fueron procesadas para la inclusión en paraplast[®]. De cada muestra se realizaron cortes seriados de 5-7 μ m, los cuales se montaron en portaobjetos con poly-l-lysina (Sigma P-1524). El estudio morfológico específico de las fibras se realizó con tinción de van Giesson para fibras colágenas y con Weigert para fibras elásticas¹⁰. Las fotografías se obtuvieron con un microscopio Carl Zeiss, Axiolab, con cámara MC 80 DX.

Para la cuantificación de la densidad de fibras colágenas y elásticas se empleó el procesador de imágenes Image Beta 4.0.2 basado en NIH Image para Macintosh, este programa mide la intensidad de color (píxeles) y los transforma a densidad de tejido o fibras. Las microfotografías de los cortes histológicos amplificados x 40 se digitalizaron con scanner AGFA SnapScan 1212. Se realizaron 4 mediciones de densidad de fibras para cada sujeto (92 mediciones para cada grupo), se procesaron áreas equivalentes en sujetos con y sin hernia evitando medir en zonas con fibroblastos, núcleos, eritrocitos o artefactos histológicos. Se obtuvo una medición promedio de densidad de fibras para ambos grupos separadamente. La medición se efectuó en forma ciega.

Tamaño de la muestra: El cálculo del tamaño de la muestra se hizo para una diferencia en el promedio de la densidad de fibras colágenas de al menos 40%, una variabilidad (desviación estándar) esperada de 60 unidades (píxeles), con un poder de 80% y nivel de significancia de 5%, así obtuvimos una estimación de 9 pacientes con hernia y 9 pacientes sin hernia.

Estadística: Se aplicó el estadístico de t de Student para comparación de promedios de edad, índice de masa corporal y densidades de fibras elásticas y colágenas para el grupo de pacientes con hernia

Tabla 1. Características biodemográficas de los grupos en estudio (t student, prueba exacta de Fisher)

Variable	Con hernia (n=23)	Sin hernia (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	0,36
Sexo (%)			
Hombre	91,3	91,3	0,99
Mujeres	8,7	8,7	
Antecedente familiar de hernia (%)	34,8	13,0	0,083

* promedio ± desviación estándar.

y sin hernia, considerándose como significativo un valor de p inferior a 5%.

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

RESULTADOS

La muestra estudiada se compone de 23 casos y 23 controles. La distribución por edad y sexo en ambos grupos es de 21 hombres (91,3%) y 2

mujeres (8,7%). El 78,3% correspondió a hernia inguinal indirecta y 21,7% de hernia inguinal directa. En 6 casos (26,1%) la hernia fue bilateral y en 3 casos (13,04%) se asociaba con una hernia umbilical; 8 de los 23 sujetos con hernia inguinal tenía al menos un familiar con el antecedente de esta patología (Tabla 1).

La distribución de fibras elásticas en piel no mostró diferencias significativas entre pacientes con y sin hernia en los cortes teñidos con tinción de Weigert, como tampoco al comparar los cortes de dermis superficial y profunda (Figuras 1 y 2).

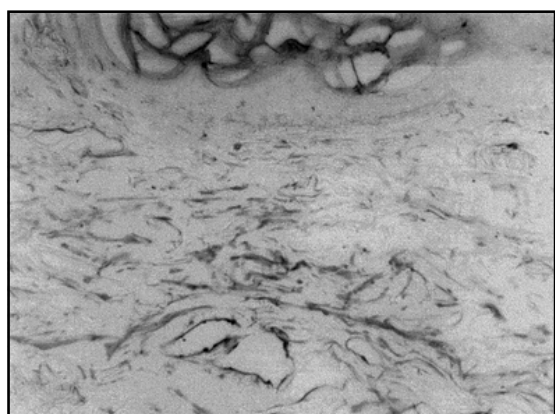


Figura 1. (Amplificación x 40) tinción de Waigert para fibras elásticas de la dermis superficial de paciente con hernia inguinal (caso).

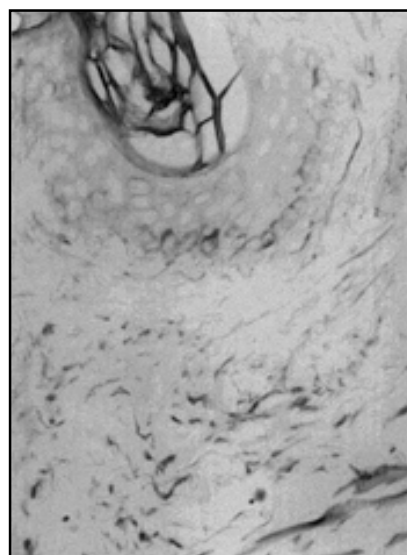


Figura 2. (Amplificación x 40) tinción de Waigert para fibras elásticas de la dermis superficial de paciente sin hernia inguinal (control).

Tabla 2. Cuantificación de la densidad de fibras colágenas y elásticas

Densidad de fibras (píxeles)	Con hernia (n=23)	Sin hernia (n=23)	p
Fibras elásticas*	45,8±7,1	44±7,5	0,72
Fibras colágenas*	115,7±20,1	222±10,1	0,00

* promedio ± desviación estándar.

La cuantificación de la densidad promedio de fibras elásticas en ambos grupos tampoco mostró diferencias significativas (Tabla 2).

La distribución de fibras colágenas en el grupo sin hernia fue homogénea en toda la extensión de la dermis tanto superficial como profunda, se observaron haces de colágeno gruesos y compactos, y en los cortes se apreció la continuidad de las fibras cortadas longitudinalmente. En las zonas con fibras cortadas transversalmente también se observaron haces compactos con poco tejido estromal que separa las fibras (Figura 3). En el grupo de pacientes con hernia, se verificó una composición diferente de fibras colágenas en la dermis superficial y profunda. Se constataron haces de colágeno más delgados y poco compactos con un aspecto "deshilachado". En las zonas de corte transversal de las fibras se corroboraron estos hallazgos. En la mitad de estos casos este patrón se distribuía homogéneamente por toda la dermis, en el resto de los casos se alternaban zonas de tejido compacto con otras de tejido más laxo dándole un aspecto moteado como en mosaico (Figura 4).

La cuantificación de la densidad promedio de fibras colágenas de los pacientes con hernia (115,7±20,1 píxeles) resultó ser 52,1% menor que el valor promedio de la densidad de fibras (222±10,1 píxeles) de los sujetos sin hernia (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Se estudiaron muestras de piel por ser el principal efector del colágeno y de fibras elásticas, además por tener una composición colágena con predominio de colágeno tipo I al igual que la *fascia transversalis* de la pared posterior del conducto inguinal, que es el plano de tejido que falla en una hernia inguinal¹¹. Se consideró como control muestras de piel de pacientes con apendicitis aguda por ser una patología frecuente que facilitó la toma de muestra, por otro lado, es piel muy próxima a la región inguinal e histológicamente la piel de la superficie ventral del organismo es similar sin variaciones regionales. A pesar de ser un cuadro agudo no encontramos evidencia de

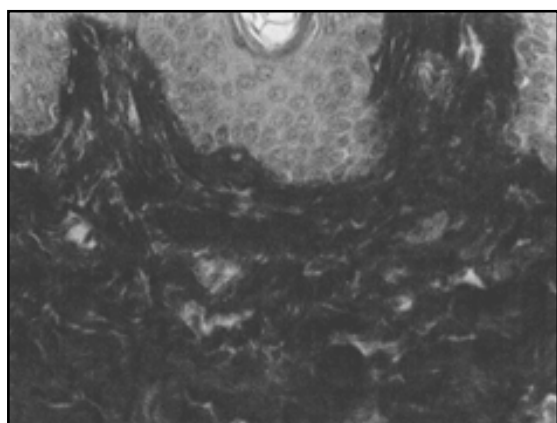


Figura 3. (Amplificación x 40) tinción de van Giesson para fibras colágenas de la dermis superficial de paciente sin hernia inguinal (control).

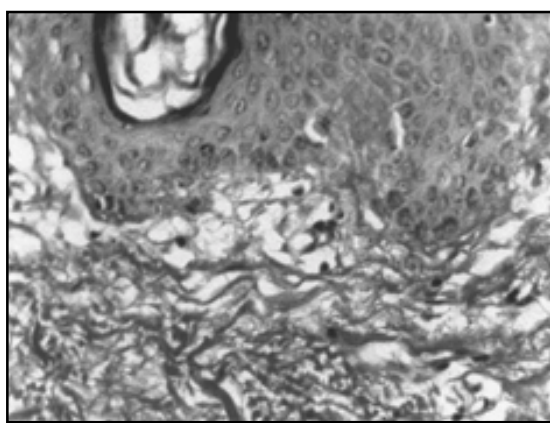


Figura 4. (Amplificación x 40) tinción de van Giesson para fibras colágenas de la dermis superficial de paciente con hernia inguinal (caso).

que produzca una alteración de las fibras colágenas y elásticas secundarias al proceso inflamatorio intraabdominal.

Los rangos de edad definidos se eligieron en base a 2 razones: el límite inferior de 15 años corresponde a la edad mínima de los pacientes atendidos en el Servicio de Cirugía Adultos de nuestro hospital y se consideró los 50 años como edad límite superior, pues está demostrada la alteración de la fibra colágena a partir de los 50 años¹².

No encontramos en la literatura estudios que asocien alteraciones en las fibras elásticas de la piel con una mayor frecuencia de aparición de hernias inguinales primarias. Es conocido el efecto del envejecimiento sobre las fibras elásticas de la piel. Stadler y cols¹³ demostraron los cambios fisiológicos de la piel a partir de los 50 años como la disminución del número de microfibrillas y fragmentación y disgregación de las fibras, estas alteraciones reducen la síntesis de elastina y aumentan los depósitos de lípidos y calcio. Producto de lo anterior, las fibras elásticas muestran una mayor susceptibilidad a la acción de enzimas proteolíticas¹². Este hecho puede explicar por qué no vimos diferencias en la distribución de fibras elásticas en piel de pacientes con y sin hernia.

Rodríguez y cols¹⁴, demostraron las mismas alteraciones de la piel, producto del envejecimiento en la *fascia transversalis* de pacientes portadores de hernia inguinal indirecta. Mediante microscopía electrónica, observaron una disminución de las fibras oxitalan y un aumento de la sustancia amorfa entre las fibras elásticas con la consecuente reducción de la resistencia en la *fascia transversalis*.

Recientemente, Quintas y cols¹⁵ efectuaron un estudio cualitativo y cuantitativo de fibras elásticas en ligamento interfoveolar de la región inguinal en que demostraron que no hay alteraciones en la distribución y calidad de fibras elásticas en *fascia transversalis* de pacientes menores de 50 años. En los mayores de 50 años, la degeneración de la fibra elástica fue similar a lo descrito previamente en piel. Aparentemente el rol de la fibra elástica, en la génesis de la hernia inguinal, estaría en la alteración de la fibra sólo en pacientes mayores y como parte del proceso normal de envejecimiento y probablemente asociado a otros factores de riesgo para hernia inguinal.

Respecto a los resultados obtenidos, al comparar fibras colágenas en dermis de pacientes con y sin hernia, apreciamos diferencias notables. En el grupo de pacientes con hernia inguinal primaria apreciamos dos patrones de distribución de las fibras colágenas: uno difuso que afecta a toda la dermis sin excepción y otro moteado o en mosaico con zonas de colágeno alterado, que se alternan con zonas de colágeno más compacto. Sobre este punto no encontramos en la literatura estudios similares para comparar.

Con las técnicas de tinción empleadas no podemos precisar a qué tipo de colágeno corresponden las áreas con fibras menos densas, es probable que correspondan a zonas de sustitución del colágeno tipo I por colágeno tipo III que es un tejido de menor fuerza tensil y resistencia elástica, lo que difiere de las mediciones efectuadas a distintos niveles de la dermis en sujetos sin hernia, en que la proporción de colágeno I/III permanece constante desde la dermis superficial a profunda¹⁶.

Existen algunos reportes de casos aislados con intentos experimentales por demostrar defectos de las fibras del tejido conjuntivo en pacientes con hernia inguinal. Son series pequeñas, descriptivas, pero cuyos resultados han dado luz sobre un tema poco conocido en que la evidencia acumulada es escasa. Klinge y cols⁵ publicaron un reporte de alteraciones del tejido conectivo en piel de pacientes con hernia en el que midieron la proporción de colágeno I/III con Western Blot, inmunohistoquímica y electroforesis de proteína, determinando un valor para controles y otro significativamente menor en pacientes con hernia sin haber diferencias entre hernia inguinal directa e indirecta. Trabajaron con un grupo heterogéneo de pacientes con hernia, con edades promedio entre 63 y 68 años cuando a esa edad los cambios del colágeno corporal se deben mayoritariamente al envejecimiento. Este grupo además no excluyó otras condiciones que claramente inciden en la aparición de una hernia inguinal como son la obesidad, constipación, tabaquismo y prostatismo¹.

Otra aproximación al problema lo dieron Friedman y cols⁴, que comunicaron una disminución de la proporción de colágeno I/III medida a través de electroforesis de proteínas. El defecto se expresó en una alteración del RNAm de ambos colágenos en cultivos celulares de fibroblastos

obtenidos de piel de pacientes con y sin hernia inguinal primaria. Lo interesante de este artículo fue que permitió orientar a que aparentemente el problema radica en la secreción de una proteína que es componente normal de la matriz extracelular, pero en una proporción que no es la adecuada. El gran reparo de este artículo es que fue también un estudio *in vitro* de síntesis proteica y expresión génica de los colágenos I y III que no ha sido repetido *in vivo*. Los hallazgos anteriormente descritos han sido confirmados recientemente, pues Rosh y cols⁸, estudiaron la expresión génica de los colágenos I/III en fibroblastos derivados de piel de 5 pacientes con hernia *versus* 5 controles sin hernia y edad promedio de 58 y 61 años. La medición fue realizada con técnica de RT-PCR para medir RNAm para cadenas de procólageno, obteniendo también una disminución de la proporción de colágeno I/III.

Toda esta evidencia acumulada apunta a que habría un defecto del colágeno en tejidos de pacientes portadores de hernia inguinal primaria, que se expresa en los distintos tejidos efectores del colágeno cuyo máximo exponente es la piel. Hay descritos defectos similares en otros tejidos de la región inguinal, de hecho, Ajabnoor y cols¹⁷, cultivaron fibroblastos derivados del saco herniario,

vaina de los músculos rectos, músculo oblicuo interno y cremáster. Estudiaron la proliferación de estas células a través de la medición de la incorporación de prolina marcada que es uno de los principales aminoácidos específicos involucrados en la síntesis del colágeno. El estudio reveló una menor tasa de incorporación de la prolina marcada en pacientes con hernia *versus* controles, sugiriendo una alteración en la síntesis colágena en ese grupo de pacientes. Confirmando estos hallazgos, Klinge y cols¹⁸ encontraron una disminución de la proporción de colágeno I/III medida por inmunohistoquímica y Western Blot en saco herniario y peritoneo de pacientes con hernia al ser comparado con controles.

Creemos que hay un grupo de pacientes jóvenes, sin factores de riesgo para desarrollar una hernia inguinal, que debido a un defecto estructural en la fibra colágena puede desarrollar una hernia inguinal primaria. La comprobación de estos resultados permitiría concebir la enfermedad herniaria como una enfermedad sistémica con expresión local en la región inguinal, hecho que quizás podría ser un argumento más para el uso de material protésico como primera alternativa en la reparación quirúrgica de la hernia inguinal primaria en este tipo de pacientes.

REFERENCIAS

1. ABRAHAMSON J. Etiology and pathophysiology of primary and recurrent groin hernia formation. *Surg Clin North Am* 1998; 78: 953-72.
2. CANNON D, READ R. Metastatic emphysema. A mechanism for acquiring inguinal herniation. *Ann Surg* 1981; 194: 270-8.
3. LIEM MS, VAN DER GRAAF Y, BEEMER FA, VAN VOROONHOVEN TJ. Increased risk for inguinal hernia in patients with Ehlers Danlos Syndrome. *Surgery* 1997; 122: 114-5.
4. 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: 754-60.
5. KLINGE U, ZHENG H, SI Z, SCHUMPELICK V, BHARDWAY RS, MUYS L, KLOSTERHALFEN B. 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 J Surg Res* 1999; 31: 480-90.
6. PANS A, ALBERT A, LAPIÈRE C, NUSGENS B. Biochemical study of collagen in adult groin hernia. *J Surg Res* 2001; 95: 107-13.
7. PANS A, PIERARD GE, ALBERT A, DESAIVE C. Adult groin hernias: a new insight into their biomechanical characteristics. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 863-8.
8. ROSH R, KLINGE U, SI Z, 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>.
9. BELLÓN J, BUJÁN J, HONDUVILLA NG, JURADO F, GIMENO MJ, TURNAY J ET AL. Study of biochemical substrate and role of metalloproteinases in fascia transversalis from hernial proceses. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 510-16.

10. WEIGERT C. Uber eine Methode zur Färbung elastischer Fasern. *Zbl Allg Path Anat* 1898; 9: 289-92.
11. KLINGE U. Altered collagen synthesis in fascia transversalis of patients with inguinal hernia. *Hernia* 1999; 3: 181-7.
12. VITELLARO-ZUCCARELLO L, CAPPELLETTI S, DAL POZZO ROSSI V, SARI-GORLA M. Stereological analysis of collagen and elastic fibers in the normal human dermis: variability with age, sex, and body region. *Anat Rec* 1994; 238: 153-62.
13. STADLER R. Maturation and aging of elastic fibers. *Z Hautkr* 1989; 64: 952-6.
14. RODRIGUES JUNIOR AJ, DE TOLOSA EM, DE CARVALHO CA. Electron microscopic study on the elastic and elastic related fibers in the human fascia transversalis at different ages. *Gegenbaues Morphol Jahrb* 1990; 136: 645-52.
15. QUINTAS ML, RODRIGUES CJ, HWAN YOO J, JUNQUEIRA A. Age related changes in the elastic fiber system of the interfoveolar ligament. *Rev Hosp Clin* 2000; 55: 83-6.
16. EPSTEIN E, MUNDERLOH N. Human skin collagen. Presence of type I and type III at all levels of the dermis. *J Biol Chem* 1978; 253: 1336-7.
17. AJABNOOR MA, MOKHTAR AM, RAFEE AA, TAHA AM. Defective collagen metabolism in Saudi patients with hernia. *Ann Clin Biochem* 1992; 29: 430-6.
18. 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: 219-27.