



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE TRAUMATOLOGÍA
«DR. VICTORIO DE LA FUENTE NARVÁEZ»**

**RESPUESTA INMUNOGÉNICA DE LOS MELANOCITOS EN
AREAS INJERTADAS HIPERPIGMENTADAS**

**TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL TITULO DE
MÉDICO ESPECIALISTA EN CIRUGÍA PLÁSTICA Y
RECONSTRUCTIVA**

PRESENTA

FELIPE DE JESÚS PEÑA HERNÁNDEZ

TUTOR E INVESTIGADOR RESPONSABLE:

DR. FERNANDO SERGIO LUJÁN OLIVAR

COLABORADORES:

DR. MARIO AYALA ZAVALA

DRA. JAZMÍN DE ANDA GONZÁLEZ

NUMERO DE REGISTRO: R-2012-3401-3



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE TRAUMATOLOGÍA
«DR. VICTORIO DE LA FUENTE NARVÁEZ»

TITULO:

Respuesta Inmunogénica de los Melanocitos en Áreas Injertadas Hiperpigmentadas.

TESIS DEL MÉDICO RESIDENTE DE LA ESPECIALIDAD EN CIRUGÍA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA:

Felipe de Jesús Peña Hernández

AÑO DE RESIDENCIA:

3er año

TUTOR E INVESTIGADOR RESPONSABLE:

Dr. Fernando Luján Olivar. Profesor Titular del Curso. Jefe de Servicio de la Unidad de Quemados. Unidad Médica de Alta Especialidad. Hospital de Traumatología «Dr. Victorio de la Fuente Narváez».

COLABORADORES:

Dr. Mario Ayala Zavala: Jefe del Servicio de Anatomía Patológica. Hospital de Ortopedia de la Unidad Médica de Alta Especialidad «Dr. Victorio de la Fuente Narváez».

Dra. Jazmín de Anda González. Médico Adscrito al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Oncología. Centro Médico Nacional Siglo XXI. México D.F.

Felipe de Jesús Peña Hernández

Gabriel Mancera 1514. Colonia Del Valle. Delegación Benito Juárez. CP 03100. México D.F. Teléfono (55) 55345987

correo electrónico: phillip29@me.com

Dr. Lorenzo Rogelio Barcenas Jiménez

Director General de la Unidad Médica de Alta Especialidad «Dr. Victorio de la Fuente Narváez» México D.F.

Dr. Arturo Reséndiz Hernández

Director Médico del Hospital de Traumatología de la Unidad Médica de Alta Especialidad «Dr. Victorio de la Fuente Narváez» México D.F.

Dr. Uria M. Guevara López

Director de Educación e Investigación de la Unidad Médica de Alta Especialidad «Dr. Victorio de la Fuente Narváez» México D.F.

Dr. Leobardo Roberto Palapa García

Jefe de División de Educación en Salud de la de la Unidad Médica de Alta Especialidad «Dr. Victorio de la Fuente Narváez» México D.F.

Dr. Ruben Torres González

Jefe de División de Investigación en Salud de la Unidad Médica de Alta Especialidad «Dr. Victorio de la Fuente Narváez» México D.F.

Dr. Fernando Sergio Lujan Olivar

Tutor e Investigador Responsable

Jefe Unidad de Quemados. Hospital de Traumatología de la Unidad Médica de Alta Especialidad «Dr. Victorio de la Fuente Narváez» México D.F.

INDICE

Tema	Página
1 RESUMEN	6
2 INTRODUCCION	8
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
<i>Justificación</i>	
<i>Pregunta de Investigación</i>	
4 HIPOTESIS	14
5 OBJETIVOS	14
<i>Objetivo General</i>	
<i>Objetivo Específico</i>	
6 MATERIAL Y METODOS	14
<i>Diseño</i>	
<i>Periodos</i>	
<i>Material y Métodos</i>	
<i>Tamaño de la Muestra</i>	
<i>Definición de Variables</i>	
7 VARIABLES	17
<i>Definición de Variables</i>	
8 PLAN PARA LA RECOPIACIÓN DE LA INFORMACIÓN	20
9 HOJA DE RECOLECCION DE LA INFORMACION	20
10 PLAN DE ANALISIS	20
<i>Descriptivo</i>	
<i>Analítico</i>	
11 CONSIDERACIONES ETICAS	19
<i>Consentimiento Informado por Escrito del Paciente</i>	
<i>Aspectos legales</i>	
<i>Aspectos éticos</i>	
<i>Hoja de consentimiento informado</i>	
12 RESULTADOS	22
13 ANALISIS	24
14 CONCLUSIONES	24
15 BIBLIOGRAFIA	25

1.-RESUMEN:

Introducción: Un proceso interesante y poco conocido que se produce en el injerto cutáneo es la pigmentación. Todos los injertos son susceptibles a la hiperpigmentación, siendo más evidente en individuos con piel morena. Una vez que se produce hiperpigmentación, es difícil de tratar.

Objetivo: Determinar si las células de Langerhans tiene participación junto con los melanocitos en la pigmentación de injertos.

Material y Métodos: Pacientes con quemaduras de 2do grado superficial y profunda, y 3er grado con una extensión del 10 al 25% tratado con excisión temprana y aplicación de injerto cutáneo. Se realizó toma de biopsia dentro del día 15 y 30 posterior a la aplicación de injerto. Los pacientes se encontraban hospitalizados en del periodo del 1 marzo al 31 de diciembre de 2011. Se realizó pruebas de inmunoperoxidasa y conteo celular de melanocitos y células de Langerhans.

Resultados: Se incluyeron 44 pacientes, 34 del sexo masculino y 10 del sexo femenino. El promedio de edad fue de 29 años. No se encontró asociación con la extensión y la profundidad de las quemaduras de los pacientes. Los pacientes con fototipo cutáneo tipo V presentaron mayor pigmentación de las áreas injertadas comparado con los otros fototipos. Se encontró que 19 pacientes presentaron hiperpigmentación del injerto. El incremento numérico de células de Langerhans en el día 30 posterior a la aplicación del injerto fue significativamente mayor en estos pacientes. Existe una mayor expresión de proteína S100 en las muestras de los pacientes con injertos hiperpigmentados.

Conclusiones: Las células de Langerhans tienen un incremento numérico en los pacientes con injertos hiperpigmentados. Los melanocitos y la células de Langerhans participan en la pigmentación de los injertos.

Palabras Claves: injerto, pigmentación, melanocitos, Células de Langerhans, respuesta inmunogénica.

Immunogenic Response of melanocytes and Langerhans cells in the hyperpigmented grafted areas

Introduction: An interesting and little-known process that occurs in the skin graft is the pigmentation. All grafts are susceptible to hyperpigmentation, being more evident in individuals with dark skin. Once hyperpigmentation occurs, it is difficult to treat.

Objective: determine whether Langerhans cells are involved with the melanocytes in skin grafts pigmentation.

Materials and Methods: Patients with 2nd degree superficial and deep burns, and 3rd degree burns with an area of 10 to 25% treated with early excision and skin grafting. Biopsy was performed at day 15 and 30 after skin graft application. Patients were hospitalized in the period from 1 March to 31 December 2011. Immunoperoxidase test was performed and cell count of melanocytes and Langerhans cells.

Results: We included 44 patients, 34 male and 10 female. The average age was 29 years. No association with the extent and depth of burns patients. Patients with type V skin phototype showed increased pigmentation of the grafted areas compared to other skin types. The increased number of Langerhans cells at day 30 after application of the graft was significantly higher in these patients. There is an increased S100 protein expression in samples from patients with hyperpigmented grafts.

Conclusions: The Langerhans cells have a numerical increase in patients with hyperpigmented grafts. Melanocytes and Langerhans cells are involved in the pigmentation of the grafts.

Keywords: graft pigmentation, melanocytes, Langerhans cells, immunogenic response.

2.- INTRODUCCIÓN

Las quemaduras son lesiones causadas por agentes físicos, químicos o eventualmente biológicos, que provocan alteraciones que varían desde el eritema, hasta la destrucción total de las estructuras afectadas. La principal característica de las lesiones por quemadura es la pérdida de la cubierta cutánea, ya sea en forma parcial o total. La escisión temprana del tejido quemado, esto es, antes del séptimo día de evolución, se ha utilizado en quemaduras por calor seco, flama y escaldaduras, con resección en un solo tiempo quirúrgico del 15% de la superficie corporal total. ¹

Los injertos de piel se utilizan en una variedad de situaciones clínicas. La indicación fundamental para la aplicación de un injerto de piel se cierre de la herida. En general, los injertos de espesor total de piel se aplican a las regiones de la cara, las orejas y las manos. Los injertos de espesor parcial de piel se colocan generalmente en el tronco y los genitales. Los injertos de piel suelen ser el tratamiento inicial de elección para muchas quemaduras. El injerto ofrece el método más simple de cierre de la herida en la escala reconstructiva. ² Los injertos de piel pueden incluir ya sea una porción de la dermis o toda la dermis. Cuando un injerto incluye sólo una parte de la dermis, que se denomina un injerto de piel de espesor parcial. Cuando el injerto contiene toda la dermis, que se llama un injerto de piel de espesor total. La importancia de la dermis en el injerto determina tanto la probabilidad de supervivencia como la contractura. Los injertos de espesor parcial pueden tolerar menos vascularización, pero tienen una mayor cantidad de contractura. Injertos de espesor total requieren un mejor lecho vascular para la supervivencia, pero sufren menos contractura. La recuperación sensorial del injerto de espesor total es superior a la del injerto de espesor parcial. ³

El grosor de un injerto de espesor parcial es de 0.30 a 0.45 mm (0,012 a 0,018 pulgadas). Después la toma de un injerto de espesor parcial, la zona donadora por lo general epiteliza espontáneamente. Las células epiteliales que se encuentran en los folículos pilosos y glándulas sudoríparas reepitelizan la zona donadora alrededor de los 7 a 21 días. ^{2,3} Los melanocitos se derivan de las células de la cresta neural y llegan a la epidermis en la octava semana de vida intrauterina. En el quinto mes, los

melanocitos comienzan a producir melanosomas y luego transferir la melanina a la queratinocitos. Los melanocitos residen en la capa basal de la epidermis, en una proporción de 1 melanocito por cada 10 queratinocitos. La principal función del melanocito es la producción de vesículas llamadas melanosomas que contienen melanina. Estas vesículas migran hacia las puntas de las dendritas de los melanocitos que son fagocitados por los queratinocitos circundantes. Hay dos tipos de melanina: la eumelanina, que tiene un característico color marrón o negro, y la feomelanina, que representa los colores más claros como el rubio o rojizo. La cantidad de melanina es mayor en la cara en comparación con el tronco. La función principal de la melanina es proteger la piel contra los efectos nocivos de la luz solar. También hay alguna evidencia de que la melanina actúa como un neutralizador de radicales libres de oxígeno.³ Estudios experimentales en injertos cutáneos con preparaciones histoquímicas han encontrado la presencia de melanocitos en los injertos cutáneos alrededor del día 13 en promedio. Los primeros melanocitos dendríticos son observados en la membrana basal a los 30 días, así como el desarrollo de melanosomas y organelas, observándose primariamente en el citoplasma.⁴ Los cambios ultraestructurales en los melanocitos, en los injertos cutáneos, son proceso de degradación y regeneración en los melanosomas y el espacio extracelular que rodea al melanocito. Debido a la disminución del aporte sanguíneo después de realizarse el injerto cutáneo los melanocitos no producen melanosomas en las primeras 48 hr. El incremento numérico en los melanocitos se observa entre los 7 a 14 días post-injerto, observándose melanosomas y premelanosomas en varios estadios de desarrollo.⁵

La acumulación de melanosomas en el melanocito quizás dependa del transitorio edema extracelular, y sea ésta condición la que interfiera en el paso de los melanosomas hacia los queratinocitos. A final del doceavo mes el edema extracelular decrece y la actividad de los melanocitos en los injertos hiperpigmentados varía desde relativa hasta inactiva. Esto puede deberse a disminución en el grado de transferencia de los melanosomas o a la disminución en la síntesis.⁶ Una posible explicación del proceso biológico de la célula es el control que ejerce el queratinocito en la síntesis de

melanosomas. El grado de pigmentación no solo se debe a los cambios cuantitativos de los melanosomas, además interviene la distribución, la degradación y el tamaño de los melanosomas dentro de los melanocitos. Recientes estudios han demostrado que los melanosomas se transfieren a los queratinocitos por un proceso altamente especializado de fagocitosis. También se ha demostrado que el queratinocito puede fagocitar otras sustancias como la ferritina. Los melanosomas dentro de los queratinocitos se disponen como complejos simples o agregados. Estos melanosomas exhiben propiedades lisosómicas e hidrolíticas. La propiedad hidrolítica tiene influencia en la degradación del melanosoma después de la descarga de éste hacia los queratinocitos.⁷ La epidermis varía en espesor de 0,04 mm en el párpado a 1,6 mm en las palmas. Se compone de cuatro celdas distintas: la de queratinocitos, los melanocitos, las células de Merkel, y las células de Langerhans. Las células de Langerhans es una célula especializada que se encuentra en las capas intermedias de la epidermis. Las células de Langerhans proporciona las características inmunes de la piel y juega un papel importante en la dermatitis de contacto, el rechazo del injerto, y la vigilancia de la neoplasia.⁸

Las Células de Langerhans (CL) se localizan en las capas basales y suprabasales de la epidermis y representan la principal barrera hematopoyética del medio ambiente externo. Son indistinguibles por procedimientos histológicos convencionales; sin embargo, la expresión de moléculas de superficie asociadas con su función de célula presentadora de antígeno permite su identificación mediante el uso de procedimientos histoquímicos e inmunocitoquímicos.^{9,10}

Las CL se originan de precursores de la médula ósea con fenotipo CD34+ las cuales maduran y se diferencian en células dendríticas y células de Langerhans CD1 al cultivarse en presencia de citocinas como el GM-CSF, TNF α e IL-4.³⁵ Las CL son las encargadas de la captación, procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos en los ganglios linfáticos locales. Su densidad y función en la piel varían en condiciones normales, de acuerdo con la edad, el área anatómica, la exposición solar y se encuentran alteradas en diversas enfermedades de la piel. Una característica específica de esta

estirpe celular son los gránulos de Birbeck, que son organelos citoplásmicos provenientes de la membrana celular, con funciones de transporte intracelular. Además, las CL son las únicas células epidérmicas que tienen receptores a Fc y C3b, expresan antígenos MHC-II y pueden inducir la respuesta proliferativa de los linfocitos T, comparable a la de los macrófagos. Se ha demostrado que los alérgenos aplicados en la piel se acumulan preferentemente en estas células. Además, forman una red casi continua que les permite captar los antígenos que penetran en la piel. Aunque representan menos de 1% de la población celular, con sus largas prolongaciones ocupan hasta 25% de la superficie de la epidermis. ¹¹

Durante la respuesta inmunitaria, las CL pueden generar tres tipos de señales, asociadas con los siguientes factores: - La captura, el procesamiento y la asociación con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-II). - La presentación antigénica: moléculas de adhesión y coestimulación. - La inmunidad local, como la migración y el anidamiento, con la consecuente producción de citocinas, quimiocinas y receptores para componentes de la matriz extracelular. ¹²

La densidad de población de las células de Langerhans varía con respecto a la región anatómica: en la cabeza, la cara, el cuello y las extremidades es de 600 a 1,000 por mm², mientras que en las palmas, las plantas, la región anogenital y la mucosa oral es de sólo 200 por mm². La determinación de la piel como órgano inmunocompetente responsable de la inmunovigilancia en los tejidos normales, se describió como un complejo de células existentes en la piel normal. Es una unidad inmunológica relacionada con un órgano con funciones protectoras y efectoras. Este sistema se compone de elementos estáticos, formado por las células que son parte anatómica de la estructura de la piel, entre las que se encuentran los queratinocitos, los melanocitos, los fibroblastos y las células endoteliales, las cuales proporcionan la base de las reacciones inmunitarias y producen citocinas proinflamatorias. Los elementos dinámicos, como los leucocitos, y las células presentadoras de antígeno (las células de Langerhans, las dendríticas, los macrófagos y los linfocitos T) que tienen un tiempo limitado de permanencia en la piel. ¹³

El mecanismo de respuesta inmunitaria se dividen en innata y adaptativa. La inmunidad innata, también conocida como natural, es la protección con la que nacemos, se considera la primera línea de defensa y está compuesta por células que reaccionan inespecíficamente contra ciertos agresores, e incluye barreras naturales como la piel y las mucosas. Este tipo de respuestas carece de memoria inmunológica y entre las células de la epidermis (queratinocitos, células de Langerhans, melanocitos, linfocitos T y NK).^{14,15}

Los componentes de la inmunidad adaptativa de la piel son una serie de mecanismos antígeno-específicos realizados por varios componentes celulares de la epidermis y la dermis, también utilizados por el sistema inmunitario en otros órganos y sistemas, y cuyas características clave son la especificidad y la memoria.¹⁶

En años recientes la inmunohistoquímica se ha convertido en una importante herramienta para el diagnóstico histopatológico. Según el sitio de localización, la inmunomarcación de antígenos celulares puede presentarse en la membrana, el núcleo o el citoplasma.^{17,18}

En las técnicas de inmunoperoxidasa se utilizan como marcadores enzimas capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro. Por ejemplo, las enzimas más frecuentemente utilizadas son peroxidasa y fosfatasa alcalina y los sustratos diaminobenzidina (color pardo), aminoetilcarbazol (color rojo) y nitroazul de tetrazolio (color azul). Estos marcadores pueden unirse (conjugarse) directamente al anticuerpo primario o bien indirectamente mediante otros anticuerpos (secundarios) o sustancias como biotina o proteína S100.¹⁹ Las técnicas inmunohistoquímicas enzimáticas permite una localización más precisa de las reacciones, ya que la tinción es permanente, estable, puede contrastarse y puede ser evaluada con microscopio de luz. El material así estudiado puede archivar por años sin pérdida de la intensidad de la reacción. Los anticuerpos monoclonales ha permitido aumentar la especificidad, sensibilidad y gama de esta técnica.²⁰

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los pacientes quemados que han sido injertados, presentan varias secuelas, una de las más importantes es la hiperpigmentación que afecta la imagen corporal, con deterioro de su confianza, seguridad y autoestima.

Se estima que el 2-3% de la población sufre quemaduras en alguna etapa de su vida y cerca del 50% requiere de tratamiento en una unidad de quemados. En la Unidad de quemados del HTFVN del IMSS, se egresan 500 paciente por año; el 60% requiere la aplicación de autoinjertos cutáneos. Se ha encontrando que la mayoría desarrolla hiperpigmentación en las áreas injertadas.

Se carece de estudios e investigaciones para conocer durante la integración del injerto, el papel que desempeñan los melanocitos y las células de Langerhans en la respuesta inmunogénica, dando como resultado la pigmentación del injerto, que difícilmente se podrán tratar en el seguimiento del paciente una vez que se ha recuperado de las quemaduras. *Figura 1*

3.1- JUSTIFICACIÓN

En la Literatura Médica *No* hay reportes de estudios de la respuesta inmunológica del los melanocitos y las Células de Langerhans en las zonas injertadas de los pacientes quemados; de demostrar que la respuesta inmunogénica de los melanocitos, esta relacionada a la hiperpigmentación de los injertos; se podrá utilizar una terapia monoclonal, que prevenga o trate esta secuela. Este estudio es factible, ya que se cuenta con la población de estudio, el espacio físico, la factibilidad del procesamiento de las biopsias y los estudios de inmunohistoquímica con el apoyo del servicio de Anatomía Patología de esta UMAE.

- 3.2.-** En base a lo anterior, surgen las siguientes *preguntas de investigación*
- ¿Esta relacionada la respuesta inmunogénica con la pigmentación de los injertos cutáneos de los pacientes quemados?**
 - ¿Cuál es el participación los melanocitos y células de Langerhans en la pigmentación de los injertos cutáneos?**

4.- HIPOTESIS

En el 70% de los injertos cutáneos aplicados a paciente con quemaduras se pigmentan, por la actividad de los melanocitos y las células de Langerhans exacerbada por acción inmunogénica, con un alfa 0.05, una beta de 0.20.

5.- OBJETIVOS

5.1.-OBJETIVO GENERAL

Determinar si las células de Langerhans tiene participación junto con los melanocitos en la pigmentación de injertos los pacientes quemados.

5.2.-OBJETIVOS ESPECIFICOS

Cuantificar a través de los estudios inmunohistoquímicos enzimáticos la distribución de las células de Langerhans y los melanocitos de las áreas injertadas.

Cuantificar a través de los estudios con inmunoperoxidasa los anticuerpos relacionados con las células de Langerhans y los melanocitos en las áreas injertadas.

6.- METODOLOGÍA

6.1.-Diseño de estudio: Prospectivo, observacional, descriptivo.

6.2.-Lugar del estudio: Unidad de Quemados del Hospital de Traumatología Dr. Victorio de la Fuente Narváez.

6.3.-Población de estudio: Pacientes con quemaduras de 2do grado superficial y profunda y 3er grado con una extensión del 10 al 25% dentro del día 15 y 30 posterior a la aplicación de injerto.

6.4.-Periodo: 1 marzo al 31 de diciembre de 2011

6.5.-Criterios de inclusión que hayan sido injertados y que cumplan con los siguientes criterios.

- Pacientes que acepten participar con capacidad de decisión autónoma y que firmen la carta de consentimiento informado
- Pacientes con edad entre 18 a 40 años.
- Quemaduras producidas por líquidos calientes y flama.
- Quemaduras de II grado profundo y superficial y III grado.
- Quemaduras localizadas en cara, tronco y extremidades.

- Quemaduras en una extensión del 10% al 25% de la superficie corporal
- Sin comorbilidad

6.6.-Criterios de exclusión

- Mujeres embarazadas.
- Pacientes con quemaduras no recientes o tratadas en forma previa con tratamiento tópico que incluya antibióticos y factores de crecimiento.
- Pacientes con enfermedades hematológicas o con inmunocompromiso.

6.7.- Criterios de eliminación

- Que el paciente o sus familiares rechacen participar en el estudio.
- Que abandonen el seguimiento.

Nota: Estos pacientes serán tomados como pérdidas y se analizarán por separado, determinando de esta manera si este grupo era diferente al resto de la muestra.

6.7.- Tamaño de la muestra

En la Unidad de quemados del HTFVN del IMSS, se egresan 500 paciente por año; el 60% requiere la aplicación de autoinjertos cutáneos. Aproximadamente un 30% de los pacientes injertados se encuentra dentro del grupo con los criterios de inclusión y representa un numero de 105 pacientes al año^{1,22}. Para determinar el tamaño de la muestra se utilizó la siguiente fórmula: $N = \frac{Z^2 pq}{NE^2 + Z^2 pq}$

Donde:

n es el tamaño de la muestra;

Z es el nivel de confianza con un valor de 1.96

p es la variabilidad positiva con valor de 0.5

q es la variabilidad negativa con valor de 0.5

N es el tamaño de la población con un valor de 105

E es la precisión o el error con valor 5%

Para calcular Z se utilizo la tabla de distribución normal estándar

El resultado obtenido para realizar el estudio fue un tamaño de muestra de 43 pacientes.

6.8.-Formación de grupo de estudio

Los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión y que ingresen a la Unidad de Quemados del Hospital de Traumatología Dr. Victorio de la Fuente Narváez, en el período de 01 de marzo al 31 diciembre de 2011, serán integrados previa autorización y consentimiento informado.

6.8.-Descripción de la maniobra de estudio

6.9.1.- Evaluación clínica: un médico previamente capacitado en la evaluación de los pacientes y en el llenado de la hoja de recolección de datos realizará la evaluación clínica para determinar la pigmentación de los injertos, el fototipo, el tiempo de evolución, y las fechas en que se tomen las biopsias

6.9.2.- Procedimiento quirúrgico inicial: Los pacientes serán sometidos a escisión temprana del tejido quemado dentro de las primeras 72 hrs. Las heridas resultantes serán cubiertas con injertos de espesor parcial.

6.9.3.- Toma de biopsia: Después que el paciente sea operado, para evaluar las células de Langerhans y los melanocitos en los injertos se realizará la toma de biopsia del área injertada, bajo técnica quirúrgica estéril el día 15 y 30 de evolución.

6.9.4.- Análisis de inmunohistoquímica: El estudio será realizado a partir de muestras de biopsias incluidas en bloques de parafina, los cortes de 5 µm serán desparafinados y rehidratados en escala descendiente de etanol hasta agua destilada. Aquellos cortes que posean una intensa pigmentación serán sometidos a un blanqueamiento de melanina en una solución de permanganato de potasio al 0.05%, durante 1 a 2 horas y luego revelados en una solución de ácido oxálico al 0.1% hasta la desaparición del color.

La inmunohistoquímica se realizará utilizando el Kit Universal LSAB Peroxidase, de acuerdo a las recomendaciones técnicas correspondientes.

Además se utilizará una tinción cruzada para los melanocitos posterior al preparado con inmunoperoxidasa.

6.9.7.- Evaluación de la maniobra: Dos Médicos Patólogos expertos encargados de la manipulación y la preparación de las muestras analizarán la distribución y porcentaje de inmunoreactividad de los melanocitos y las células de Langerhans serán evaluada en un microscopio óptico, utilizando una escala semicuantitativa basada en la coloración, mientras que las

fotografías serán obtenidas a través de un sistema digital de captura de imágenes, que permitirá el registro y presentación de resultados.

6.9.8.-Insumo de investigación: Las muestras de tejido serán obtenidos del mismo paciente. El equipamiento y los reactivos necesarios para su procesamiento, así como las tinciones y los reactivos de inmunoperoxidasa serán proporcionadas por el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital. El material de curación, los instrumentos y aparatos de toma de biopsia, son insumos y materiales que se utilizan en el servicio.

7.- VARIABLES

- **Independiente:**

Aplicación de injerto cutáneo.

- **Dependiente:**

Respuesta inmunogénica

- **Otras variables de estudio:**

Extensión, profundidad, edad, sexo, fototipo cutáneo.

7.1.-DEFINICIÓN DE VARIABLES

Variable Independiente:

- **Aplicación del injerto cutáneo:**

Definición conceptual: Es un procedimiento quirúrgico para trasladar piel de una parte del cuerpo a otra, sin llevar su propio riego sanguíneo con él.

Definición operacional: Los pacientes serán sometidos a escisión temprana del tejido quemado, las heridas resultantes serán cubiertas con injertos cutáneos autólogos de espesor parcial.

Variable Dependiente:

- **Respuesta inmunogénica:**

Definición conceptual: Capacidad de inducir una respuesta inmune específica, humoral y/o celular

Definición operacional: Representada por el número de las células de Langerhans y melanocitos en cortes de las biopsias de las áreas injertadas.

Otras Variables de estudio:

- **Extensión**

Definición conceptual: es calculada como el porcentaje de la superficie corporal total; dividiendo al cuerpo en áreas de tamaño constante, tomando en cuenta la edad y desarrollo del individuo. La tabla de cálculo más conocida para la extensión es la de "Pulansky-Tennison" o regla de los "nueve", dividiendo las áreas corporales en múltiplos de nueve para dar un total de 100% a la superficie corporal, utilizándola preferentemente para el adulto.

Definición Operacional: En el presente estudio se refiere a la amplitud de la afección corporal comprendida entre el 15 y 25% de superficie corporal.

Escala de Medición: se medirá en porcentaje de acuerdo al esquema de Tennison- Pulansky (Regla de los 9).

Tipo de Variable: numérica

- ***Profundidad***

Definición Conceptual: Nivel de lesión de una quemadura según la piel y tejidos comprometidos.

Definición Operacional: En el presente estudio se considera como 2º grado profundo (lesión de epidermis, dermis papilar y reticular), con características de color rojo perlado, no exudativas, sin flictenas, de 3er grado (lesión de epidermis, dermis, tejido celular subcutáneo, arterias, nervios y hueso) con características de color blanquecino, presencia de vasos trombosados.

Escala de Medición: presencia o ausencia de quemaduras de 2º grado profundo y 3er grado.

Tipo de Variable: nominal

- ***Edad***

Definición Conceptual: Tiempo transcurrido desde el nacimiento de un ser vivo

Definición Operacional: En el presente estudio se valora en años cumplidos

Escala de Medición: años

Tipo de Variable: numérica

- ***Sexo***

Definición Conceptual: Conjunto de características genéticas y anatómicas que diferencian a un hombre y a una mujer

Definición Operacional: En el presente estudio se valora en Hombre o Mujer

Escala de Medición: Hombre, Mujer

Tipo de Variable: nominal

- ***Fototipo cutáneo***

Definición Conceptual: es la capacidad de la piel para asimilar la radiación solar. Su clasificación oscila entre I y VI.

Fototipo I.—Personas de piel muy blanca, con pecas, generalmente pelirrojos, con una piel que presenta intensas quemaduras solares y casi nunca se pigmentan.

Fototipo II.—Personas de piel blanca, en general de cabellos rubios, con una piel que presenta severas quemaduras solares y se pigmenta ligeramente.

Fototipo III.— Personas de piel blanca, en general de cabellos claros, con una piel que presenta moderadas quemaduras solares y pigmentación.

Fototipo IV.— Personas de piel morena, en general de cabellos oscuros, con una piel que presenta mínimas quemaduras solares y con facilidad se pigmentan.

Fototipo V.— Personas de piel amarronada, en general de cabellos oscuros, con una piel que presenta raramente quemaduras solares y con facilidad e intensidad se pigmentan.

Fototipo VI.— Personas de piel negra, cabellos oscuros, con una piel que no presenta quemaduras solares y con intensidad se pigmentan.

Definición Operacional: En el presente estudio se consideran los fototipos cutáneos III al V

Escala de Medición: se medira de acuerdo a la escala del fototipo cutáneo

Tipo de Variable: nominal

8.- PLAN PARA LA RECOLECCION DE LA INFORMACION

Los datos serán anotados en hoja de recolección de la información. Los datos obtenidos de las muestras posterior a la tinción serán capturados en hojas de cálculo Excel para posteriormente aplicar las pruebas estadísticas. La información obtenida se vaciará a una base de datos computarizada para su análisis.

HOJA DE RECOLECCION DE LA INFORMACION	
Folio	
Nombre:	Afiliación:
Sexo: ()	
I. Hombre	
II. Mujer	
Edad: () años	
Extension:	
I. 10%	
II. 15%	
III. 20%	
IV. 25%	
Profundidad: ()	
I. 2° grado superficial	
II. 2° grado profundo	
III. 3° grado	
Fototipo cutáneo: ()	
I. Piel blanca lechosa	
II. Piel blanca	
III. Piel morena clara	
IV. Piel morena	
V. Piel amarronada	
VI. Piel negra	

9.- PLAN DE ANALISIS

9.1.- Descriptivo: Los datos obtenidos se describirán por medio de frecuencias simples, proporciones y medidas de tendencia central y dispersión (promedio y desviación estándar) de las variables a medir. Se presentarán los datos que muestren la distribución de la coloración inmunoreactividad de las células de Langerhans y los melanocitos en los injertos. El impacto obtenido se presentará por medio de una tabla de salida.

9.2.- Analítico: Para determinar la significancia estadística en las variables cuantitativas, se utilizo t student; para las variables cualitativas, la X2 y se realizo una correlación entre variables empleando el software SPSS 20.

10.- ASPECTOS ETICOS Y LEGALES

10.1.- Consentimiento por el Paciente: El grupo de investigadores explicarán la naturaleza del estudio al paciente. El paciente y sus familiares recibirán una hoja de información (consentimiento informado) para que la

pueda leer con cuidado antes de aceptar su participación en el estudio. El Consentimiento Informado será revisado, firmado y fechado por el paciente y sus familiares, y será contra-firmado al mismo tiempo por el Investigador. Una copia de la declaración será proporcionada al paciente, otra anexada al expediente y el original será mantenido en un archivo.

10.2.- Confidencialidad del paciente: Todos los reportes y comunicaciones relacionadas con los pacientes en el estudio se identificarán únicamente por sus iniciales y por el número de estudio del paciente. El material fotográfico será tomado con la autorización del paciente y sus familiares; no se tomarán las caras o estructuras anatómicas peculiares que permitan identificar a la persona, respetando su confidencialidad.

10.2.- Aspectos legales: El presente trabajo de investigación se llevará a cabo en pacientes mexicanos, la cual se realizará en base al reglamento de la Ley General de Salud en relación en materia de investigación para la salud, que se encuentra en vigencia actualmente en el territorio de los Estados Unidos Mexicanos.


Título segundo: De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, capítulo 1, Disposiciones generales. En los artículos 13 al 27.

Título tercero: De la Investigación de Nuevos Recursos Profilácticos, de Diagnósticos, Terapéuticos, y de Rehabilitación. Capítulo I: Disposiciones comunes, contenido en los artículos 61 al 64. Capítulo III: De la Investigación de Otros Nuevos Recursos, contenido en los artículos 72 al 74.

Título Sexto: De la Ejecución de la Investigación en las Instituciones de Atención a la Salud. Capítulo único, contenido en los artículos 113 al 120.

10.3.- Aspectos éticos: **La presente investigación está basada en los principios éticos de la declaración de Helsinki y de las modificaciones y agregados que se realizaron en las asambleas médicas en Tokio Japón, Venecia Italia, Hong Kong, Edimburgo Escocia.** *En la unidad de quemados, la toma de cultivos biopsias, para determinar la profundidad de la lesión, la presencia de respuesta inflamatoria y la cuantificación de bacterias; un fragmento de esta biopsia será utilizado para el análisis inmunohistoquímico del presente estudio, el cual se llevará a cabo en el Departamento de Anatomía Patológica de este Hospital.*

10.4.- Hoja de consentimiento informado (se anexa hoja con formato institucional):

 INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL	
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN PROTOCOLO	
Nombre del estudio:	Respuesta Inmunogénica de los melanocitos en áreas injertadas hiperpigmentadas
Lugar y fecha:	Hospital de Traumatología "Victorio de la Fuente Narvaez" México D.F.
Número de registro:	
Justificación y objetivo del estudio:	<p>He sido informado en forma amplia, sencilla y comprensible, acerca de mi padecimiento que consiste en heridas (áreas cuentadas) secundarias a quemaduras tratadas mediante injertos cutáneos y en pleno conocimiento declaro que estoy de acuerdo en participar en el trabajo de investigación denominado: "Respuesta Inmunogénica de los melanocitos en áreas injertadas hiperpigmentadas".</p> <p>En la unidad de quemados, se realiza en forma rutinaria, la toma de muestras (cultivos biopsias), para determinar la profundidad de la lesión, la presencia de inflamación y de bacterias; un fragmento de esta muestra será utilizado para pruebas especiales (Inmunohistoquímica).</p> <p>El objetivo del estudio es determinar si las células (melanocitos y células de Langerhans) presentes son las responsables de la coloración (hiperpigmentación) de las heridas (áreas injertadas) de los pacientes quemados. De demostrar que la respuesta de las células está relacionada con la coloración de los injertos, se podrá utilizar un tratamiento (terapia monoclonal) en forma posterior.</p>
Procedimientos:	Un fragmento del cultivo-biopsia, procedimiento rutinario en la unidad de Quemados, será utilizado para el análisis histológico del presente estudio.
Posibles riesgos y molestias:	En relación a este estudio no existen riesgos adicional, ya que como se me ha explicado, se tomara un fragmento del cultivo-biopsia para el estudio, no implica un riesgo o complicación posterior en mi evolución y recuperación de las heridas.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Si la respuesta inmunogénica de los melanocitos, esta relacionada a la coloración (hiperpigmentación) de los injertos, se podría utilizar un tratamiento que prevenga o trate esta seuela.
Privacidad y confidencialidad:	<p>Autorizo para que durante el estudio, sean tomados material fotográfico y video, con fines de seguimiento clínico, de presentación en foros médicos y de publicación. Se me ha informado que en este material no tiene fines de logros económicos y que no aparecerá mi cara o alguna región anatómica que permita identificarme y que se mantendrá mi derecho de confidencialidad.</p> <p>También he sido informado que puedo abstenerme de participar en este estudio y que soy libre de retirar mi consentimiento de participar en el en cualquier momento, sin deterioro de la Atención Médica.</p>
Acepto participar en el trabajo de investigación y Autorizo en forma plena para que me traten de acuerdo al protocolo de estudio. En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a: Investigador Responsable: Dr. Fernando Luján Olivar Colaboradores: Dr. Mario Ayala Zavala Dra. Jazmin de Anda González Dr. Felipe de Jesús Peña Hernández	
EN CASO DE ALGUNA DUDA RELACIONADA CON EL ESTUDIO YO PODRE SER ATENDIDO A CUALQUIER HORA EN EL HOSPITAL AL TELEFONO (55) 57473500. LOS COLABORADORES, ESTARAN DISPONIBLES PARA ATENDER MI LLAMADA.	
_____ Nombre y firma del sujeto Testigo 1	_____ Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento Testigo 2
_____ Nombre, dirección, relación y firma	_____ Nombre, dirección, relación y firma
Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de Investigación, sin omitir información relevante del estudio	
Clave: 2810-009-013	

12.- RESULTADOS

Se incluyeron 44 pacientes, 34 del sexo masculino y 10 del sexo femenino. El promedio de edad fue de 29 años. *Figura 2*. En relación a la extensión de las quemaduras en la superficie corporal, 22 pacientes presentaron una extensión del 10%, 8 pacientes una extensión del 15%, 14 pacientes una extensión de un 20% y 10 pacientes una extensión de un 25%. En relación a la profundidad de las quemaduras, 24 paciente presentaron quemaduras segundo grado superficiales, 10 pacientes con quemaduras de segundo grado profundas, 8 pacientes con quemaduras de segundo grado superficiales y profundas, y 2 pacientes con quemaduras de tercer grado. En relación al fototipo cutáneo, 10 pacientes presentaron fototipo III, 28 pacientes con fototipo IV, y 6 pacientes con fototipo V.

El seguimiento promedio fue de 45 días para cada paciente tomando muestras para estudio histopatológico los días 15 y 30 posterior a la aplicación del injerto cutáneo. Todos los paciente completaron el seguimiento. No se presentaron complicaciones con la toma de biopsia.

No se encontró asociación con la extensión y la profundidad de las quemaduras de los pacientes.

Los pacientes con fototipo cutáneo tipo V presentaron mayor pigmentación de las áreas injertadas comparado con los otros fototipos.

En relación a la pigmentación de los injertos cutáneos 19 pacientes presentaron una hiperpigmentación comparada al área receptora y se encontraron los siguientes resultados respecto al conteo de melanocitos, en el día 15 fue un promedio de 2.04 células/mm³, y en el día 30 fue un promedio de 2.97 células/mm³. Respecto al conteo de Células de Langerhans, en el día 15 fue un promedio de 1.75 células/mm³, y en el día 30 fue un promedio de 2.01 células/mm³. *Figura 3*

En 25 pacientes presentaron una pigmentación similar del área receptora, se encontraron los siguientes resultados respecto al conteo de melanocitos en el día 15 fue un promedio de 0.89 células/mm³, y en el día 30 fue un promedio de 1.01 células/mm³. Respecto al conteo de células de Langerhans en el día 15 fue un promedio de 0.75, y en el día 30 fue un promedio de 0.80.

La diferencia en promedio de melanocitos entre ambos grupos para el día 15 es de 1.15, con una p=0.03 significativa; y en el día 30 es de 1.96, con una p=0.01 significativa. *Figura 4*

La diferencia en promedio de células de Langerhans entre ambos grupos para el día 15 es de 1, con una p=0.03 significativa; y en el día 30 es de 1.21, con una p=0.01 significativa.

En las muestras del grupo de pacientes con hiperpigmentación de los injertos cutáneos se encontró una mayor expresión de la proteína S100 en un 95% comparado con un 32% de expresión en el grupo de pacientes con injertos normopigmentados.

13.- ANÁLISIS

El incremento numérico de melanocitos fué mayor posterior a los 15 días, siendo más significativo a los 30 días con un promedio de 2.97 células por mm^3 en el grupo de pacientes con injertos hiperpigmentados y una diferencia de 1.96 con respecto al grupo de pacientes con normopigmentación.

Respecto a las células de Langerhans el incremento numérico de células de Langerhans fué discretamente mayor posterior a los 30 días con un promedio de 2.01 células por mm^3 en el grupo con injertos hiperpigmentados y una diferencia de 1.21 con respecto al grupo con normopigmentación. Estos resultados son significativos para nuestro estudio confirmando la participación de las células de Langerhans en la fisiología de los injertos cutáneos.

Existe una mayor expresión de la proteína S100 en los pacientes con hiperpigmentación de los injertos. Si bien la proteína S100 no es un marcador específico, es conocida su participación en los procesos inflamatorios y resulta relevante su expresión en los melanocitos. *Figuras 5 y 6*

14.- CONCLUSIONES

Estudios previos han demostrado la migración de los melanocitos a las áreas injertadas alrededor del día 7 a 14⁵⁻⁶. Es notable el incremento del número de melanocitos dentro de los primeros 30 días posterior al colocarse el injerto, observaciones previas de Tsukada, extienden este periodo hasta los 90 días.

Nuestros hallazgos se corroboran con investigaciones previas donde se encuentran un incremento en el número de melanocitos de manera secuencial. Hemos aportado la observación, que las células de Langerhans tienen un mayor incremento posterior a los 30 días.

Existe la tendencia actual de que los melanocitos y las células de Langerhans no tienen solo una relación de vecindad anatómica, si no que participan en coordinación para mantener la homeostasis de la piel.

Es factible avanzar las investigaciones hacia la parte molecular, para determinar la participación de receptores, mediadores y ligandos en la interacción celular.

Se debe extender el periodo de seguimiento para conocer los cambios celulares a largo plazo, esto permitirá conocer la fisiología celular y su expresión molecular.

15.- BIBLIOGRAFIA

1. Cuenca-Pardo J, Álvarez-Díaz CJ. Costo-Beneficio de la cirugía precoz del paciente quemado comparado con cirugía tardía. *Cirugía Plástica* 2000; 10:5-7
2. Valencia IC, Falabella AF, Eaglstein WH: Skin grafting. *Dermatol Clin* 2000;18:521-30.
3. Rees TD, Casson PR: The indications for cutaneous dermal overgrafting. *Plast Reconstr Surg* 1966; 38:522-29.
4. Ragnell A: The secondary contracting tendency of free skin grafts. *Br J Plast Surg* 1952;5:6-11
5. Paletta C., et al. *Skin Grafts. Plastic Surgery. Mathes.* 2nd ed. Elsevier. 2006;Vol 1 Chap 14:293-304
6. Cochran AJ: The incidence of melanocytes in normal skin. *J Invest Dermatol* 1970;55:65-72
7. Boissy RE: The melanocyte: its structure, function, and subpopulation in skin, eyes, and hair. *Dermatol Clin* 1988; 6:161-72.
8. Chin Whan Kim et al. Experimental study on the hyperpigmentation of the skin. *J. Kor. Soc. Plast. Reconstr. Surg.* 1988;15: 433.
9. Tsukada S: The melanocytes and melanin in human skin autografts. *Plast Reconstr Surg* 1974;53:200-12
10. Mottz, J.H. et al. Response of the epidermal melanocyte to the minor trauma. *Arch Dermat* 1971;104:611-18.
11. Fitzpatrick, T.B., et al. The evolution of concepts of melanin biology. *Arch Dermat* 1967;96:305-11.
12. Rudolph R, Ballantyne DL Jr: Skin grafts. In McCarthy JG, ed: *Plastic Surgery.* Philadelphia, WB Saunders, 1990:221.
13. Iglesias M. Las células dendríticas y su papel de centinelas del sistema inmune. *Reumatología* 2003;19:168-74.

14. Daynes R.A., et al. Regulation by the skin of lymphoid cell recirculation and localization properties. *J Invest Dermatol* 1985;85:14-21.
15. Pivarcsi A., Innate immunity in the skin: How keratinocytes fight against pathogens. *Curr Op Rev* 2005;1:29-34.
16. Janssens S, Beyaert R. Role of toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microb Rev* 2003;16:637-42.
17. Meyer T, Stockfleth E, Christophers E. Immune response profiles in human skin. *Br J Derm* 2007;157:1-6.
18. Chan JK. Advances in immunohistochemistry: impact on surgical pathology practice. *Semin Diagn Pathol* 2000;17:170-7.
19. Taylor CR. Principles of immunomicroscopy. In: *Immunomicroscopy. A diagnostic Tool for surgical pathologists. Mayor problems in Pathology.* 3rd ed. New York: Saunders, 2006;pp:1-46.
20. Kohler G, Milsten C. Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* 1974;256:495-97.
21. Boyce, ST, Greenhalgh DG, Kagan, RJ, et al: Skin anatomy and antigen expression after burn wound closure with composite grafts of cultured skin cells and biopolymers. *Plast Reconstr Surg* 1993;91:632–41.
22. Moscoso-Maza V, Cuenca-Pardo J, Álvarez-Díaz CJ. Análisis de la morbi-mortalidad del quemado extenso adulto. *Cirugía Plástica* 2002;12:71 – 73



Figura 1 Paciente con pigmentación de injertos en cara. (Dr. Felipe Peña Hernández, con Autorización)

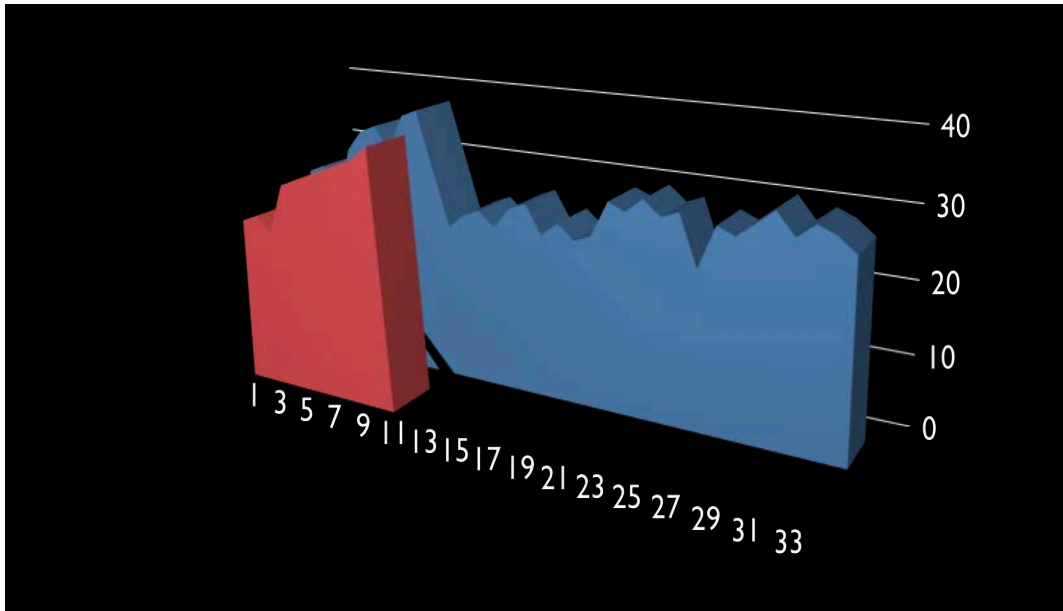


Figura 2 Distribución de pacientes por sexo y edad, en rojo pacientes del sexo femenino, en azul pacientes del sexo masculino.

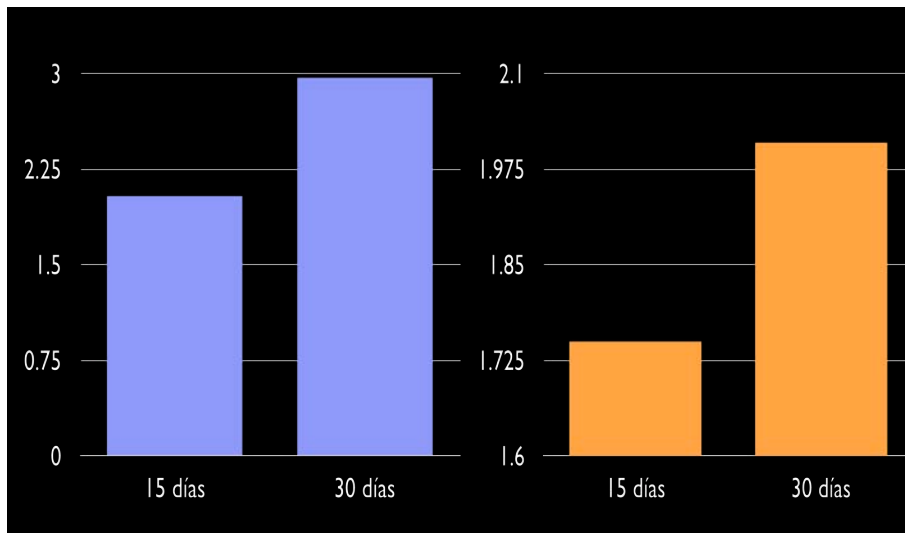


Figura 3 En barras color violeta promedio de melanocitos en pacientes con hiperpigmentación al área receptora los días 15 y 30. En barras color naranja promedio de células de Langerhans en pacientes con hiperpigmentación al área receptora los días 15 y 30.

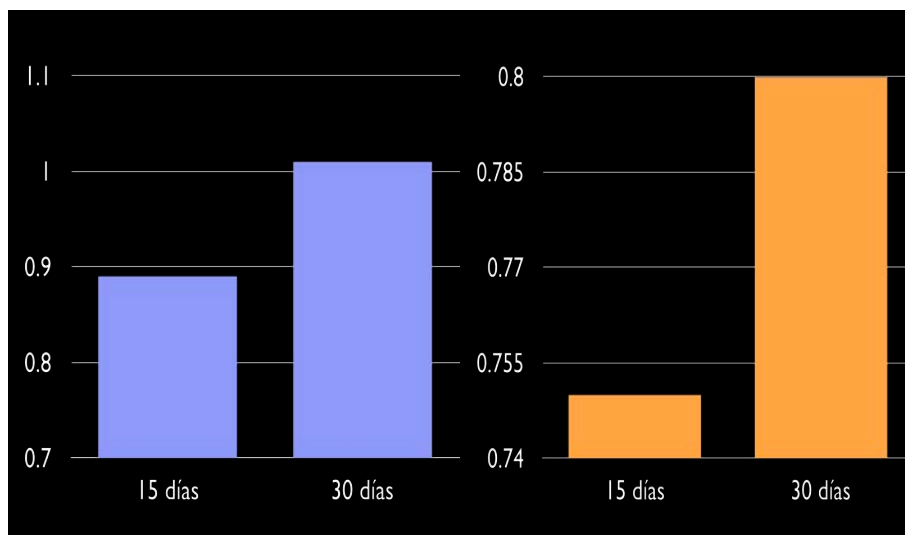


Figura 4 En barras color violeta promedio de melanocitos en pacientes con pigmentación similar al área receptora los días 15 y 30. En barras color naranja promedio de células de Langerhans en pacientes con pigmentación similar al área receptora los días 15 y 30.

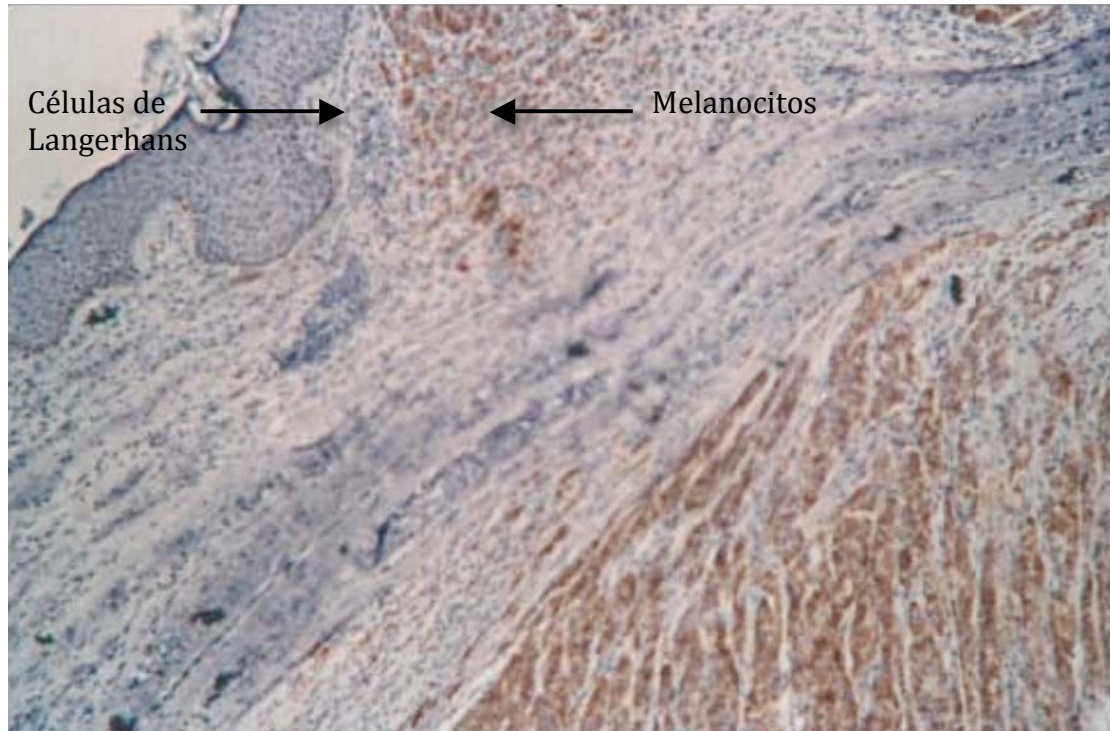
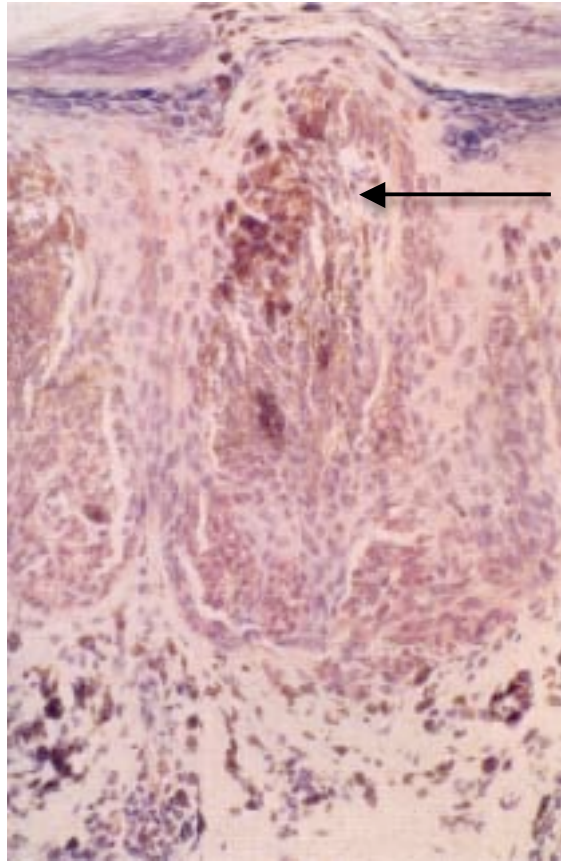


Figura 5 incremento en numero de melanocitos y células de Langerhans en muestras de paciente con hiperpigmentación del injerto (*Muestra en tinción cruzada Inmunoperoxidasa, Melanina*)



Melanocitos

Figura 6 Incremento en el número de melanocitos en muestra de pacientes con hiperpigmentación del injerto (*Muestra en tinción cruzada H&E, Melanina*)