

Estudio inmunohistoquímico en la estenosis hipertrófica del píloro

R.M. Paredes Esteban, J. Salas Molina, J.M. Ocaña Losa, M. García Ruiz

Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital «Reina Sofía» de Córdoba. Sección de Cirugía Pediátrica del Hospital «Ciudad de Jaén» de Jaén. Servicio de Anatomía Patológica del Hospital «Reina Sofía» de Córdoba.

RESUMEN: Introducción: A pesar de la experiencia clínica sobre la estenosis hipertrófica del píloro (EHP), los conocimientos sobre su etiopatogenia son muy limitados. Los trabajos actuales se han centrado en las técnicas de inmunohistoquímica para valorar el desarrollo neuronal en la capa muscular pilórica, objetivo de nuestro trabajo.

Pacientes y métodos: Se tomaron biopsias de la capa muscular pilórica de 10 pacientes con EHP y de 8 pacientes fallecidos por otras causas ajenas a dicha patología. Las biopsias se estudiaron mediante técnicas de inmunohistoquímica utilizando un panel de anticuerpos (Acs) monoclonales: proteína S100, GFAP (proteína glial fibrilar), enolasa y neurofilamento (NF). Los resultados fueron expresados semicuantitativamente como fuertemente positivos (++), moderadamente positivos (+) y negativos (-). Valoramos la inmunotinción del plexo miéntérico (PM), (células ganglionares y satélites) y fibras nerviosas de la capa muscular longitudinal y circular (PML y PMC, respectivamente).

Resultados: La inmunotinción en el PM fue negativa sólo para el Ac GFAP en el 80%. En la capa muscular longitudinal y circular (PML y PMC) la expresión para los anticuerpos estudiados fue negativa en el 60-70% de los casos. Estos resultados indican que existe un déficit neural en la inervación del músculo pilórico en la EHP. Dicho defecto puede estar implicado en la etiopatogenia de la enfermedad.

PALABRAS CLAVE: Estenosis hipertrófica del píloro; Etiopatogenia; Inmunohistoquímica.

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY IN HYPERTROPHIC PYLORIC STENOSIS

ABSTRACT: Introduction: In spite of the clinical experience about infantile Hypertrophic Pyloric Stenosis (IHPS), its etiopathology remains unknown. Recent studies have been focussed in immunohistochemistry techniques for valuing the neuronal development in the pyloric muscle.

Material and methods: We took biopsy from 10 babies diagnosed of IHPS and 10 babies with similar age, died because of other causes. Immunohistochemical study was performed using monoclonal antibodies: S100 protein, GFAP, enolase and neurofilaments NF. The results were showed semiquantitatively as strong (++), moderate (+) and absent (-). Immunotincion of the myenteric plexus (ganglion cells and satellite) and nervous fibers of the muscle layer, were done.

Correspondencia: Rosa María Paredes Esteban, Residencial Castillo de Jaén, casa 65. 23005 Jaén.

Recibido: Mayo 2001

Aceptado: Noviembre 2002

Results: We observed a poor immunoreactivity in the muscle layer (longitudinal and circular) in the 60-70% of specimens of pyloric muscle in babies with IHPS. GFAP were absent in the 80% in the myenteric plexus. This poor innervation may be related to the etiopathogenesis of pyloric stenosis and hypertrophy.

KEY WORDS: Hypertrophic pyloric stenosis; Etiopathology; Immunohistochemistry.

INTRODUCCIÓN

La estenosis hipertrófica de píloro (EHP) es una patología aparentemente congénita, caracterizada por hipertrofia del músculo pilórico, que ocasiona estrechez y elongamiento del canal pilórico, desencadenando una sintomatología bien definida. El primer informe de los hallazgos clínicos más característicos y post-mortem de la EHP fue de Patrick Blair en la Royal Society, en Londres en 1917⁽¹⁾. Se presenta aproximadamente en tres casos por cada 1.000 nacimientos vivos y con un actual ascenso de la incidencia. Parece existir una proclividad racial y étnica⁽²⁾. Es más común en blancos y presenta una predisposición sexual con una proporción de sexo masculino a femenino de 4:1⁽³⁾.

Se han implicado múltiples factores en el desarrollo de la EHP, entre ellos elementos neurales pilóricos inmaduros o degenerados⁽⁴⁻⁵⁾, un régimen de alimentación específico (alimentación materna)^(7,8), exceso de la concentración materna o infantil de gastrina^(9,10) e interacción endocrina anormal gastrina-secretina⁽¹⁰⁾, y se ha descrito que una enfermedad similar puede ser reproducida en cachorros de perros por inyección de pentagastrina⁽¹¹⁾. Sin embargo, ninguno de estos factores se ha comprobado estar implicado en su etiopatogenia. Estudios con técnicas de microscopía electrónica demuestran una anomalía estructural del sistema nervioso inhibitorio y de las células intersticiales de Cajal, importantes en el mecanismo de relajación pilórica⁽¹²⁻¹⁵⁾. Con las actuales técnicas de inmunohistoquímica estos estudios se han ampliado al observar una reducción intramuscular de las cé-

Tabla I Distribución de S100, GFAP, NF y enolasa en el PM, PMC y PML en la EHP y grupo control

Grupo	Anticuerpos monoclonales												
	S100			GFAP			NF			Enolasa			
	++	+	-	++	+	-	++	+	-	++	+	-	
EHP	PM	10	0	0	8	2	0	8	2	0	7	3	0
	PMC	0	3	7	0	0	10	0	3	7	0	4	6
	PML	0	2	8	0	0	10	0	2	8	0	3	7
Control	PM	8	0	0	8	0	0	8	0	0	8	0	0
	PMC	8	0	0	6	2	0	8	0	0	8	0	0
	PML	8	0	0	7	1	0	8	0	0	8	0	0

PM: Plexo mientérico; PMC: Plexo muscular circular; PML: Plexo muscular longitudinal; S100: Proteína S100; GFAP: Proteína glial fibrilar; NF: Neurofilamento.

lulas nerviosas de soporte⁽⁶⁾ y una anormal distribución de las terminaciones nerviosas de la capa muscular⁽¹⁶⁾. Nuestro trabajo intenta confirmar mediante técnicas de inmunohistoquímica la existencia o no de trastornos neurales a nivel del músculo pilórico y su posible implicación en la etiopatogenia de la enfermedad.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se realiza un estudio comparativo entre dos grupos de pacientes. Grupo 1: 10 pacientes intervenidos quirúrgicamente por presentar EHP, en los que se tomó biopsia muscular pilórica en el momento de realidad la piloromiotomía extramucosa de Ramstedt. Grupo 2: grupo control, formado por 8 neonatos fallecidos por causas ajenas a la EHP, cuyas biopsias fueron recogidas en el momento de la necropsia.

Las muestras de biopsia fueron incluidas en parafina, procesadas según protocolo de anatomía patológica y estudiados mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Técnicas de inmunohistoquímica

Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron mediante la aplicación de un panel de anticuerpos monoclonales, valorando la inmunotinción del plexo mientérico y fibras nerviosas en el plexo muscular (longitudinal y circular). Los anticuerpos monoclonales fueron:

- Proteína S100: marcador de astrocitos y células de Schwann.
- GFAP: marcador específico para astrocitos en el sistema nervioso central.

Ambos anticuerpos valoran las células nerviosas de soporte.

- Enolasa: marcador de las células ganglionares.
- Neurofilamento: en sus tres subunidades; marcador de las neuronas. Ambos anticuerpos valoran la inervación neuronal.

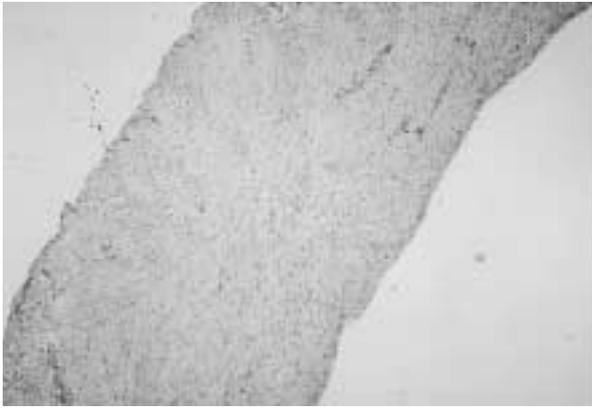
Los resultados se analizaron mediante microscopía óptica convencional y en todos los casos se utilizó fosfatasa alcalina como enzima.

La inmunotinción fue valorada semicuantitativamente según la intensidad de la misma en tres grupos: fuertemente positiva (++) , moderadamente positiva (+), y negativa (-). Para comparar los resultados con el grupo control utilizamos la prueba estadística para variables no paramétricas de Mann-Whitney, con un nivel de significación inferior a 0,05 (p < 0,05).

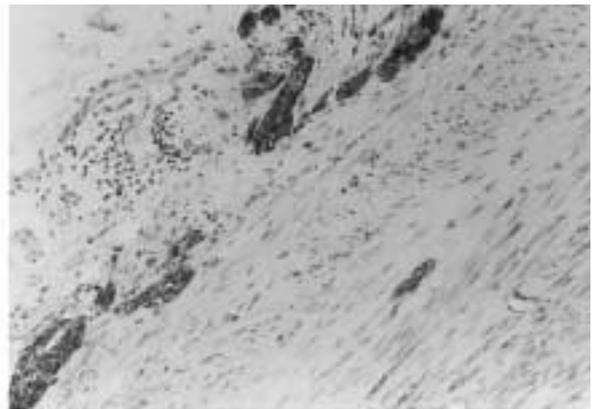
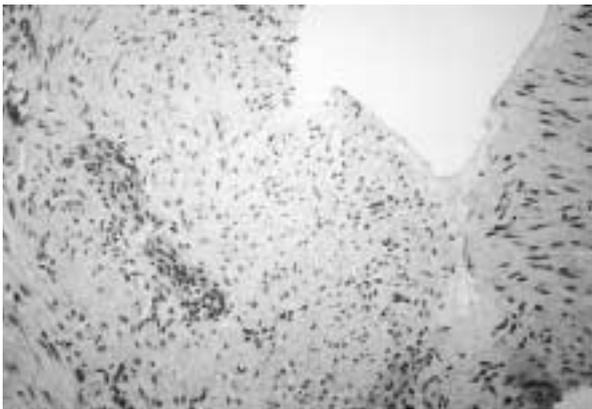
RESULTADOS

Los resultados se recogen en la tabla I. La inmunotinción para S100 en el plexo mientérico fue positiva en el 100% de las biopsias procedentes de niños con EHP y en las biopsias de piloros normales. El análisis para el GFAP en el grupo con EHP fue similar; en el 80% fuertemente positivo y en el 20% moderadamente positivo, frente al 100% fuertemente positivo del grupo control. La tinción del NF en el PM fue fuertemente positiva y moderadamente positiva en el 80% y 20% de los pacientes con EHP y en el 100% de los pacientes del grupo control.

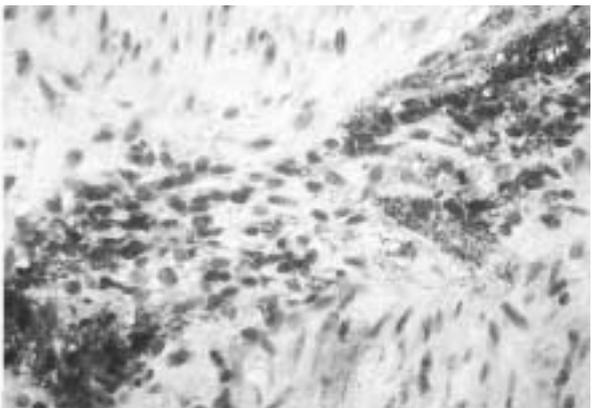
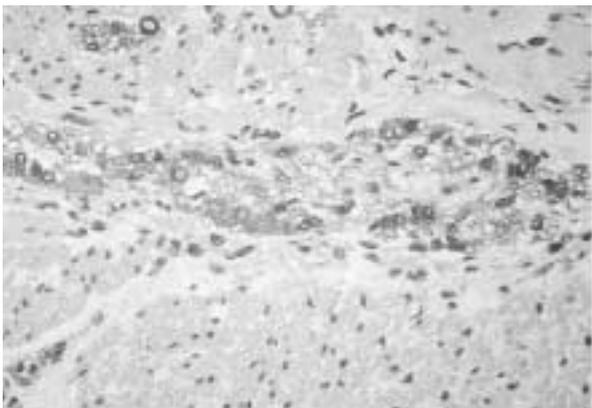
La expresión para la enolasa fue fuertemente positiva y moderadamente positiva en el 70-30% del grupo con EHP, en el 100% de los casos fuertemente positiva en el grupo control. Las diferencias de expresión entre las tinciones a nivel del PM, entre los dos grupos, no fueron estadísticamente significativas. En la capa muscular (longitudinal y circular) de los piloros con EHP, la inmunotinción para la proteína S100 fue negativa en el 70% y 80%, respectivamente, y moderadamente positiva en el 30% y 20% (Fig. 1a). En el grupo control fue fuertemente positiva en el 100% (Fig. 1b). La expresión para el GFAP en el PMC y PML, en el grupo con EHP, fue negativa en el 100% de los casos y fuertemente positiva en el 75-87% de los casos en el grupo control. La inmunotinción para el NF en el PMC y PML del grupo con EHP, fue negativa en



Figuras 1a y b. Microscopía óptica. Inmunotinción para la proteína S100 a nivel de la capa muscular del píloro.



Figuras 2a y b. Microscopía óptica. Inmunotinción para el NF a nivel de la capa muscular del píloro. La figura 2a corresponde al grupo con EHP y la figura 2b corresponde al grupo control.



Figuras 3a y b. Microscopía óptica. Inmunotinción para la enolasa a nivel de la capa muscular del píloro. La figura 3a corresponde al grupo con EHP y la figura 3b corresponde al grupo control.

el 70% y 80%, respectivamente (Fig. 2a). En el grupo control fue positiva en el 100% (Fig. 2b). Por último, analizamos la inmunotinción en el PMC y PML para la enolasa. En las biopsias de píloros con EHP la tinción fue negativa en el

60% y 70%, respectivamente (Fig. 3a). En el grupo control fue fuertemente positiva en el 100% de los casos (Fig. 3b). La diferencia de inmunotinción a nivel de la capa muscular en ambos grupos fue estadísticamente significativa, con $p < 0,001$.

DISCUSIÓN

Aunque la EHP es una patología frecuente en el lactante, caracterizada por la hipertrofia celular del músculo liso de la capa muscular, su etiopatogenia no es del todo conocida. Para proporcionar una base etiopatogénica se han realizado numerosos estudios con microscopía electrónica⁽¹¹⁻¹⁴⁾ y actualmente con técnicas de inmunohistoquímica^(6,15). Los estudios con microscopía electrónica han demostrado degeneración axonal en el plexo mientérico y fallo o retraso en la maduración de las células intersticiales de Cajal⁽¹¹⁻¹⁴⁾, lo que demuestra una anomalía estructural del sistema nervioso inhibitorio. Las actuales técnicas de inmunohistoquímica estudian fundamentalmente la innervación pilórica encontrando una disminución y alteración de las fibras nerviosas de la capa muscular en el píloro de los niños con EHP⁽¹⁵⁾. Recientemente se especula que el crecimiento de las células musculares en la EHP está regulado por factores de crecimiento, observando un incremento de la síntesis local de factor de crecimiento epidérmico y péptidos relacionados con éste⁽¹⁶⁾. Parece existir además una disminución significativa en las fibras nerviosas del polipéptido intestinal vasoactivo (VIP)⁽¹⁷⁾, sustancia P, encefalina, péptido liberador de gastrina en la capa muscular y óxido nítrico en la capa muscular del píloro hipertrófico⁽¹⁸⁾. Los trabajos que estudian el espacio extracelular de la capa muscular del píloro en niños con EHP demuestra un aumento de la expresividad del procolágeno y fibronectina⁽¹⁹⁻²¹⁾. El incremento de fibras elásticas y elastina en el músculo pilórico en la EHP, parece jugar un papel importante en el desarrollo de la rigidez del músculo⁽²²⁾. Nuestro trabajo que estudia la innervación de la capa muscular pilórica puede aportar algunos datos interesantes para el conocimiento de la etiopatogénica de la enfermedad. En nuestro estudio las fibras inmunorreactivas en las biopsias correspondientes a la EHP para la proteína S100 y GFAP han estado marcadamente reducidas en las capas musculares longitudinal y circular, lo que implica una reducción de fibras nerviosas de soporte a nivel de la capa muscular, siendo normales a nivel del PM. Nuestros resultados confirman los obtenidos por otros autores⁽⁶⁾. Sin embargo, en el plexo mientérico la expresión de marcadores para las células nerviosas de soporte (S100 y GFAP) fue prácticamente similar a la inmunotinción correspondiente a las biopsias de los píloros del grupo control. Las células nerviosas de soporte son fundamentales para el mantenimiento de las funciones básicas de las neuronas. Su ausencia, por tanto, puede ser un factor importante en la etiopatogénesis de la EHP. Trabajos realizados con técnicas de inmunohistoquímica^(23,24) han demostrado una disminución de células ganglionares en la EHP. Por el contrario, los estudios realizados por Okazaki⁽¹⁵⁾ demuestran un adecuado número de células ganglionares y neurofilamentos en el PM de los píloros con EHP. Nuestros resultados, similares a los comunicados por Okazaki⁽¹⁵⁾ y por Tam⁽²⁵⁾, demuestran un número adecuado de células ganglionares y neurofilamentos a nivel del PM en las biopsias de píloros con EHP, sin que exis-

tan diferencias significativas con el grupo control. Por el contrario, observamos en la capa muscular tanto circular como longitudinal una marcada disminución de neurofilamentos y de células ganglionares. Estos resultados indican una pobre innervación de la musculatura pilórica en la EHP. Se ha observado en estudios realizados en ratas, que dichas alteraciones desaparecen a los 4 meses cuando se repite el estudio, lo que indica que puede ser una alteración temporal, por falta de madurez en la innervación muscular y no por degeneración⁽²⁶⁾. Nuestros resultados nos hacen concluir que en la EHP existe una pobre innervación neuronal de la capa muscular del píloro, secundaria a una reducción de las células nerviosas de soporte y un déficit neuronal. Todo ello produciría una hipertrofia compensadora de la musculatura pilórica. Como toda hipertrofia a largo plazo se transformaría en una atrofia, siendo entonces una alteración transitoria. Esta pobre innervación parece estar implicada en la etiopatogénesis de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blair P. On the dissection of a child much emaciated. *Phil Trans* 1717?;**30**:631.
2. Mason PF. Increasing infantile hypertrophic pyloric stenosis. Experience in an overseas military hospital. *J R Coll Surg Endinb* 1992;**36**:293.
3. Mitchel LE, Risch N. The genetics of infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Am J Dis Child* 1993;**147**:1203.
4. Dieler R, Schroder JM. Myenteric plexus neuropathy in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Acta Neuropathol* 1989;**78**:649-661.
5. Dieler R, Schroder JM, Skopnikh. Infantile hypertrophic pyloric stenosis: myopathic type. *Acta Neuropathol* 1990;**80**:295-306.
6. Kobayashi J, O'Braian S, Puri P. Selective reduction intramuscular nerve supporting cells in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *J Pediatr Surg* 1994;**29**:651-654.
7. Habbick BF, Khanna C, To T. Infantile hypertrophic pyloric stenosis: a study of feeding practices and other possible causes. *Can Med Assoc J* 1989;**140**:401-404.
8. Katz S, Basel D, Brabski D. Prenatal gastric dilatation and infantile hypertrophic pyloric stenosis. *J Pediatr Surg* 1988;**23**:1021-1023.
9. Spitz L, Zail SS. Serum gastrin levels in congenital hypertrophic pyloric stenosis. *J Pediatr Surg* 1976;**11**:33-35.
10. Karim AA, Morrison JE, Parks TG. The role of pentagastrin in the production of canine hypertrophic pyloric stenosis and pyloro-duodenal ulceration. *Br J Surg* 1974;**61**:327-329.
11. Langer JC, Berezin I, Daniel EE. Hypertrophic pyloric stenosis: ultrastructural abnormalities of enteric nerves and the interstitial cells of Cajal. *J Pediatr Surg* 1995;**30**:1535-1543.
12. Wanderwinder JM, Rumessen JJ. Interstitial cells of Cajal in human gut and gastrointestinal disease. *Microsc Res Tech* 1999;**47**:344-360.
13. Challa VR, Jona JZ, Markesbery WR. Ultrastructural observations of the myenteric plexus of the pylorus in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Am J Pathol* 1977;**88**:309-315.

14. Jona JZ. Electromicroscopic observations in infantile hypertrophic stenosis (IHPS). *J Pediatr Surg* 1978;**13**:174.
15. Okazaki T, Yamataka A, Fujiwara T, Nishiye H, Fujimoto T, Miyano T. Abnormal distribution of nerve terminals in 20 infantile hypertrophic pyloric stenosis. *J Pediatr Surg* 1994;**29**:655-658.
16. Shima H, Ohshiro K, Puri R. Increased local synthesis of epidermal growth factor in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Pediatr Res* 2000;**47**:201-207.
17. Grisoni E, De Agustín JC, Kalhan SC. Vasoactive intestinal polypeptide causes relaxation of the pyloric sphincter in rabbit. *J Pediatr Surg* 1993;**29**:1117-1120.
18. Grisoni E, Dusteag D, Super D. Nitric oxide synthesis inhibition: the effect on rabbit pyloric muscle. *J Pediatr Surg* 1996;**31**:800-804.
19. Miyazahi E, Yamataka T, Ohshiro K, Taire Y, Puri P. Active collagen synthesis in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Pediatr Surg Int* 1998;**13**:237-239.
20. Cass DT, Zhang AL. Extracellular matrix changes in congenital hypertrophic pyloric stenosis. *Pediatr Surg Int* 1991;**6**:190-194.
21. Puello C, Ohshiro K, Elías J, Esteban JA, Puri P. Aumento de la expresión de proteoglicano condroitín sulfato, fibronectina y fibroblastos en la estenosis hipertrófica de píloro. *Cir Pediatr* 2001;**14**:103-107.
22. One T, Puri P. Anomalities of elastin and elastic fibers in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Pediatr Surg Int* 1999;**15**:540-542.
23. Belding H, Kernohan JV. A morphologic study of the plexus and musculature of the pylorus with special reference to the changes in hypertrophic pyloric stenosis. *Surg Gynecol Obstet* 1953;**97**:322-334.
24. Friesen SR, Boley JO, Miller DR. The myenteric plexus of the pylorus: its early normal development and its changes in hypertrophic pyloric stenosis. *Surgery* 1956;**39**:21-29.
25. Tam PKH. An immunohistochemical study with neuron-specific enolase and substance P of human enteric innervation. The normal developmental pattern and abnormal deviations in Hirschsprung's disease and pyloric stenosis. *J Pediatr Surg* 1986;**21**:227-232.
26. Abel RM. The ontogeny of the peptide innervation of the human pylorus with special reference to understanding the aetiology and pathogenesis of infantile hypertrophic pyloric stenosis. Presented in XLII Annuals International Congress the British Association of *Paediatric Surgery*, 1995.