

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
FACULTAT DE MEDICINA  
DEPARTAMENT DE MEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DE LAS FIBRAS  
ELÁSTICAS DE LA PIEL EN PACIENTES  
FUMADORES Y SU RELACIÓN CON EL DETERIORO  
DE LA FUNCIÓN PULMONAR**

Miquel Just Sarobé

2002

**TITULO**

**ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DE LAS FIBRAS  
ELÁSTICAS DE LA PIEL EN PACIENTES FUMADORES  
Y SU RELACIÓN CON EL DETERIORO DE LA  
FUNCIÓN PULMONAR**

Tesis presentada por Miquel Just Sarobé para optar al grado de Doctor en Medicina bajo la dirección del Doctor Carlos Ferrándiz Foraster, Profesor Titular de Dermatología de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe del Servicio de Dermatología del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona, y del Doctor Miquel Ribera Pibernat, Profesor Asociado de Dermatología de la Universidad Autónoma de Barcelona y adjunto del Servicio de Dermatología del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, por todo.

## AGRADECIMIENTOS

Desearía hacer constar aquí mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, a través de una u otra forma de colaboración, ha hecho posible la realización de esta tesis. Podría ocurrir que existiera en la lista alguna omisión involuntaria, por la cual cosa pido disculpas de antemano.

Al Dr. Carlos Ferrándiz Foraster, Jefe del Servicio de Dermatología de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol i Profesor Titular de Dermatología de la Universitat Autònoma de Barcelona, por su apoyo y dirección en esta Tesis, así como por su guía inmejorable en mi formación como dermatólogo, como prueba de mi más profunda admiración.

Al Dr. Miquel Ribera Pibernat, médico adjunto del Servicio de Dermatología, por su ánimo, por su ayuda, tanto profesional como moral en los momentos difíciles, así como por su constancia, que han permitido que esta tesis haya llegado a buen fin.

Al Dr. Josep Morera, Jefe del Servicio de Neumología, por su labor en el diseño y supervisión del estudio.

Al Dr. Eduard Monsó, médico adjunto del Servicio de Neumología, por su inestimable ayuda en la interpretación de los resultados de las pruebas de función respiratoria así como en el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

Al Dr. José A. Fiz, médico adjunto del Servicio de Neumología y responsable de la Unidad de Pruebas Funcionales Respiratorias, por facilitar la labor de recogida de enfermos.

A los Dres. Juan Carlos Lorenzo y Maria Teresa Fernández-Figueras, del Servicio de Anatomía Patológica, por su ayuda en la interpretación de los resultados de los estudios inmunohistoquímicos y morfométricos.

A la Sra. Ángeles Fernández-Vasalo, por su impecable labor de preparación y procesamiento de las numerosas muestras histológicas obtenidas a lo largo de este estudio.

A los Dres. Felipe Andreo, Carlos Sabadell y Gloria Bonet, residentes del Servicio de Neumología, y Al Dr. Xavier Bigatà, residente del Servicio de Dermatología, por su gran ayuda en la recogida de enfermos.

Al resto de miembros del Servicio de Dermatología, por su paciencia, colaboración y comprensión en la a veces difícil labor de recogida de enfermos y obtención de las biopsias de piel.

A todos los pacientes que voluntariamente y de forma desinteresada aceptaron participar en este estudio.

# INDICE

<u>TITULO</u>	2
<u>DEDICATORIA</u>	3
<u>AGRADECIMIENTOS</u>	4
<u>INDICE</u>	5
<b>1 <u>INTRODUCCIÓN.</u></b>	<b>8</b>
<b>1.1 <u>LAS FIBRAS ELASTICAS DE LA PIEL</u></b>	<b>9</b>
1.1.1 <u>Las fibras elásticas en la piel normal</u>	9
1.1.1.1 <u>Embriología: elastogénesis</u>	10
1.1.1.2 <u>Estructura y bioquímica de las fibras elásticas</u>	11
1.1.1.3 <u>Metabolismo de las fibras elásticas</u>	19
1.1.1.4 <u>Clasificación y topografía de las fibras elásticas</u>	21
1.1.2 <u>Métodos de estudio de las fibras elásticas de la piel</u>	26
1.1.2.1 <u>Tinciones para microscopía óptica</u>	26
1.1.2.2 <u>Tinciones inmunohistoquímicas</u>	28
1.1.2.3 <u>Tinciones para microscopía electrónica</u>	36
1.1.3 <u>Envejecimiento y patología de las fibras elásticas de la piel</u>	36
1.1.3.1 <u>Las fibras elásticas en el envejecimiento fisiológico</u>	37
1.1.3.2 <u>Las fibras elásticas en el fotoenvejecimiento</u>	38
1.1.3.3 <u>Patología de las fibras elásticas de la piel</u>	39
<b>1.2 <u>EFFECTOS DEL CONSUMO DE CORTICOIDES SOBRE LA PIEL</u></b>	<b>41</b>
1.2.1 <u>Efectos del consumo de corticoides inhalados</u>	41
<b>1.3 <u>EFFECTOS DEL HÁBITO DE FUMAR SOBRE EL ORGANISMO</u></b>	<b>44</b>
1.3.1 <u>Generalidades</u>	44
1.3.2 <u>Efectos del hábito de fumar sobre la piel</u>	45
1.3.2.1 <u>Mecanismos fisiopatológicos</u>	46
1.3.3 <u>Efectos del hábito de fumar sobre el pulmón: enfermedad pulmonar obstructiva crónica</u>	51
1.3.3.1 <u>Tabaco y función pulmonar</u>	52
1.3.3.2 <u>Fisiopatología de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica</u>	54
<b>1.4 <u>EL HÁBITO DE FUMAR Y LAS ARRUGAS FACIALES</u></b>	<b>57</b>
1.4.1 <u>Estudios epidemiológicos</u>	57
1.4.2 <u>Consideraciones patogénicas</u>	59
1.4.2.1 <u>Toxicidad directa sobre la piel</u>	59
1.4.2.2 <u>Factores mecánicos</u>	60
1.4.2.3 <u>Predisposición genética</u>	61
1.4.2.4 <u>Elastosis del fumador</u>	61
1.4.2.5 <u>Factores hormonales</u>	61
1.4.2.6 <u>Toxicidad de los radicales libres</u>	62
1.4.3 <u>Efectos del consumo de tabaco sobre las fibras elásticas de la piel</u>	62
1.4.4 <u>Arrugas faciales y función pulmonar</u>	64
<b>2 <u>OBJETIVOS DEL ESTUDIO.</u></b>	<b>66</b>

<b><u>3</u></b>	<b><u>PACIENTES Y MÉTODO.</u></b>	<b>68</b>
<b><u>3.1</u></b>	<b><u>PACIENTES</u></b>	<b>69</b>
3.1.1	<u>Criterios de exclusión</u>	70
<b><u>3.2</u></b>	<b><u>MÉTODO</u></b>	<b>71</b>
3.2.1	<u>Definición de las variables clínicas estudiadas</u>	71
3.2.1.1	<u>Fototipo</u>	71
3.2.1.2	<u>Consumo de tabaco</u>	72
3.2.1.3	<u>Consumo de corticoides</u>	73
3.2.2	<u>Biopsia cutánea</u>	73
3.2.3	<u>Análisis morfométrico (morfometría estática) de las fibras elásticas</u>	74
3.2.3.1	<u>Tinción con orceína</u>	74
3.2.3.2	<u>Morfometría estática</u>	75
3.2.4	<u>Estudio inmunohistoquímico de las fibras elásticas</u>	76
3.2.5	<u>Estudio de la función pulmonar</u>	78
3.2.6	<u>Método estadístico</u>	79
<b><u>4</u></b>	<b><u>RESULTADOS.</u></b>	<b>81</b>
<b><u>4.1</u></b>	<b><u>DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA</u></b>	<b>82</b>
<b><u>4.2</u></b>	<b><u>EFECTO DE LA EDAD SOBRE LAS FIBRAS ELÁSTICAS DE LA PIEL Y SOBRE LA FUNCIÓN RESPIRATORIA</u></b>	<b>84</b>
<b><u>4.3</u></b>	<b><u>EFECTO DEL CONSUMO DE CORTICOIDES SOBRE LAS FIBRAS ELÁSTICAS DE LA PIEL</u></b>	<b>86</b>
<b><u>4.4</u></b>	<b><u>REPERCUSIÓN DEL ABANDONO DEL HÁBITO DE FUMAR SOBRE LAS FIBRAS ELÁSTICAS DE LA PIEL Y SOBRE LA FUNCIÓN PULMONAR</u></b>	<b>87</b>
<b><u>4.5</u></b>	<b><u>EFECTO DEL CONSUMO DE TABACO SOBRE LAS FIBRAS ELÁSTICAS DE LA PIEL</u></b>	<b>89</b>
4.5.1	<u>Estudio mediante morfometría estática</u>	89
4.5.1.1	<u>Análisis comparativo de los no fumadores con los fumadores</u>	91
4.5.1.2	<u>Análisis de regresión lineal</u>	91
4.5.1.3	<u>Análisis de un posible efecto dependiente de la dosis del consumo de tabaco sobre las fibras elásticas de la piel</u>	92
4.5.2	<u>Estudio mediante inmunohistoquímica</u>	94
4.5.2.1	<u>Estudio de las fibras elásticas de la dermis media y profunda. Inmunotinciones para la elastina y para el componente P-amiloide</u>	94
4.5.2.2	<u>Otras tinciones e inmunotinciones</u>	96
<b><u>4.6</u></b>	<b><u>EFECTO DEL CONSUMO DE TABACO SOBRE LA FUNCIÓN PULMONAR</u></b>	<b>97</b>
4.6.1	<u>Análisis comparativo de los no fumadores con los fumadores</u>	97
4.6.2	<u>Análisis del efecto dosis-respuesta del consumo de tabaco sobre la función pulmonar</u>	97
<b><u>4.7</u></b>	<b><u>RELACIÓN ENTRE LA AFECCIÓN DE LAS FIBRAS ELÁSTICAS DE LA PIEL Y EL DETERIORO DE LA FUNCIÓN PULMONAR</u></b>	<b>99</b>
4.7.1	<u>Influencia de las alteraciones de las fibras elásticas de la piel sobre los valores de la espirometría forzada</u>	100
4.7.1.1	<u>Análisis con la totalidad de la muestra</u>	100
4.7.1.2	<u>Análisis tras excluir a los fumadores</u>	101
4.7.1.3	<u>Análisis tras excluir a los consumidores de corticoides</u>	101
4.7.2	<u>Influencia de las alteraciones de las fibras elásticas de la piel sobre los volúmenes pulmonares</u>	102
4.7.2.1	<u>Análisis con la totalidad de la muestra</u>	102
4.7.2.2	<u>Análisis tras excluir a los fumadores</u>	103
4.7.2.3	<u>Análisis tras excluir a los consumidores de corticoides</u>	103

4.7.3	<u>Influencia de las alteraciones de las fibras elásticas de la piel sobre la capacidad de difusión pulmonar</u>	104
4.7.3.1	<u>Análisis con la totalidad de la muestra</u>	104
4.7.3.2	<u>Análisis tras excluir a los fumadores</u>	105
4.7.3.3	<u>Análisis tras excluir a los consumidores de corticoides</u>	105
<b>5</b>	<b><u>DISCUSIÓN.</u></b>	<b>106</b>
<b>5.1</b>	<b><u>EFFECTOS DEL HÁBITO DE FUMAR SOBRE LAS FIBRAS ELÁSTICAS DE LA PIEL</u></b>	<b>108</b>
5.1.1	<u>Estudios mediante morfometría estática</u>	108
5.1.1.1	<u>Análisis comparativo de los exfumadores con los fumadores activos</u>	108
5.1.1.2	<u>Análisis comparativo de los no fumadores con los fumadores</u>	109
5.1.1.3	<u>Análisis de un posible efecto dependiente de la dosis del consumo de tabaco sobre las fibras elásticas de la piel</u>	111
5.1.2	<u>Estudios mediante inmunohistoquímica</u>	111
5.1.2.1	<u>Estudio de las fibras elásticas de la dermis media y profunda. Inmunotinciones para la elastina y para el componente P-amiloide</u>	111
5.1.2.2	<u>Otras tinciones e inmunotinciones</u>	112
<b>5.2</b>	<b><u>RELACIÓN ENTRE LAS FIBRAS ELÁSTICAS DE LA PIEL Y LA FUNCIÓN PULMONAR</u></b>	<b>115</b>
<b>5.3</b>	<b><u>LIMITACIONES DEL ESTUDIO</u></b>	<b>119</b>
<b>6</b>	<b><u>CONCLUSIONES.</u></b>	<b>121</b>
<b>7</b>	<b><u>BIBLIOGRAFÍA.</u></b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b><u>ABREVIATURAS.</u></b>	<b>138</b>

# **1 INTRODUCCIÓN.**



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 LAS FIBRAS ELÁSTICAS DE LA PIEL

### 1.1.1 Las fibras elásticas en la piel normal

Las fibras elásticas son uno de los constituyentes normales de la piel. Ésta, desde un punto de vista embriológico, se compone de dos capas: la epidermis con los anejos cutáneos, derivados del ectodermo, y la dermis, derivada del mesodermo. Otros constituyentes de la piel, como los melanocitos y fibras nerviosas, se originan a partir del neuroectodermo.

La dermis constituye, en los seres humanos, el 15-20% del peso total del cuerpo. Su grosor varía desde aproximadamente 1 mm. en la cara a 4 mm. en la espalda y los muslos. Está formada por los siguientes elementos: células, fibras y sustancia fundamental. Las células más abundantes son los fibroblastos, pero también encontramos histiocitos, linfocitos, dendrocitos y mastocitos; el componente fibrilar está compuesto por fibras colágenas, elásticas y de reticulina, y la sustancia fundamental por glucosaminoglicanos hidratados. El elemento predominante lo constituye el colágeno, con un 75% del peso seco y un 18-30% del volumen de la piel, mientras que la elastina representa únicamente el 4% del peso seco de la piel y el 1% de su volumen (Ebling y cols, 1993; Uitto, 1979).

Anatómica y funcionalmente la dermis puede dividirse en dos compartimentos: la dermis adventicial, constituida por la dermis papilar y la perianexial; y la dermis reticular, la cual constituye el 90% de la dermis y se interrelaciona con la grasa subcutánea.

En este capítulo se analizan la embriología, la estructura bioquímica y espacial, el metabolismo y la clasificación de las fibras elásticas de la dermis.

#### **1.1.1.1 Embriología: elastogénesis**

Las fibras elásticas maduras están constituidas por dos elementos, la matriz amorfa formada por elastina y el componente microfibrilar. En la escala filogenética, las fibras elásticas aparecen más tardíamente que otras macromoléculas del tejido conectivo, como los proteoglicanos, el colágeno y las glicoproteínas estructurales. Estos dos últimos, el colágeno y las glicoproteínas estructurales, están ya presentes en los primeros metazoos pluricelulares, las esponjas, mientras que las fibras elásticas no aparecen hasta los peces y los vertebrados (Frances y Robert, 1984).

Las fibras elásticas aparecen en la dermis fetal a partir de la semana 22 y a medida que avanza la edad gestacional, aumentan en número y complejidad. En la dermis de un adulto podemos distinguir tres tipos de fibras elásticas mediante microscopía óptica: las fibras oxitalánicas o superficiales, las fibras eláunicas o intermedias y las fibras elásticas dérmicas propiamente dichas (ver apartado 1.1.1.4). Las primeras fibras en aparecer son las oxitalánicas, seguidas de las eláunicas y las últimas en hacerlo son las fibras elásticas de la dermis media y profunda. Este hecho lleva a la conclusión de que probablemente los tres tipos de fibras elásticas que se observan por microscopía óptica en la piel corresponden a estadios consecutivos de la elastogénesis normal (Cotta-Pereira y cols., 1976). El feto de 32 semanas ya presenta una red de fibras elásticas bien desarrollada tanto en la dermis papilar como en la reticular, indistinguible de la que se puede observar en un recién nacido (Deutsch y cols., 1975).

El estudio ultraestructural de la elastogénesis muestra como el componente microfibrilar aparece antes que el material amorfo, constituido por elastina, y la

proporción entre estos dos componentes varía en favor del segundo a lo largo del desarrollo del individuo (Albert, 1972). En los primeros meses de vida fetal, las fibras elásticas están constituidas casi exclusivamente por microfibrillas. A los 11 meses de edad gestacional el tejido elástico ya contiene regiones centrales de material amorfo rodeadas por microfibrillas, aunque éstas son mucho más delgadas y rectas que en el adulto. A los 6 años de edad presentan ya un aspecto maduro, con fibras de mayor diámetro constituidas en un 85-90% por material amorfo (Uitto, 1979; Ebling y cols., 1993).

#### **1.1.1.2 Estructura y bioquímica de las fibras elásticas**

La caracterización bioquímica de la elastina y las microfibrillas no ha sido posible durante muchos años debido a la gran insolubilidad de estas estructuras. La mayor parte de los hallazgos estructurales fueron obtenidos a través de observaciones mediante microscopía electrónica. En los últimos años, las diversas innovaciones metodológicas y la mejoría en la tecnología bioquímica han facilitado el estudio de estas proteínas, tanto en lo que se refiere a su estructura básica como a distintos aspectos de su biosíntesis.

El estudio ultraestructural de las fibras elásticas, como ya se ha comentado anteriormente, permite distinguir dos elementos fundamentales: la matriz amorfa y el componente microfibrilar. La matriz amorfa, estructura electrontranslúcida formada por la elastina, constituye aproximadamente el 85-90 % de las fibras elásticas maduras. A su alrededor, y en menor número en su interior, se distribuyen las microfibrillas, estructuras tubulares electrondensas de 10-12nm. de diámetro. A diferencia de las fibras colágenas, las fibras elásticas no presentan periodicidad bajo el microscopio electrónico (Ebling y cols., 1993; Albert, 1972; Uitto, 1979; Braverman, 1986).

## **Elastina**

La elastina es una proteína fibrilar en formación  $\alpha$ -espiral (Fig.1). Es insoluble en agua, alcohol, en ácidos y álcalis diluidos, y tiene una consistencia semejante a la goma. Es sensible a la actividad de las elastasas y resistente a las enzimas tripsina y quimiotripsina. Presenta afinidad por las tinciones aniónicas (ácido fosfotúngstico), y constituye únicamente el 2% del total de proteínas de la dermis (Uitto 1979, Frances y Robert, 1984; Ebling y cols., 1993; Sandberg y cols., 1981).

La unidad molecular básica de elastina es la tropoelastina: polipéptido lineal, de unos 800 residuos aminoácidos y un peso molecular aproximado de 72.000 daltons. A diferencia de la elastina, la tropoelastina es soluble en agua y es más susceptible a la proteólisis. Está constituida por un alto porcentaje de aminoácidos no polares, entre los que destacan la glicina (contribuye en 245 residuos), la prolina, la alanina, la valina, la fenilalanina, la isoleucina y la leucina. Los aminoácidos polares, como el aspartato, el glutamato, la lisina y la arginina constituye menos del 5% del total. Aminoácidos como el triptófano, la cistina y la metionina están ausentes. En la molécula de tropoelastina podemos distinguir dos dominios: el dominio de entrelazamiento, probablemente  $\alpha$ -helical, constituido por residuos de lisina separados por dos o tres residuos de alanina; y el dominio hidrófobo, constituido por glicina, valina y prolina, fenilalanina y leucina, dispuestos en su mayoría constituyendo una secuencia pentapéptica repetitiva de pro-gly-val-gly-val. Ya en el medio extracelular, esta cadena de tropoelastina se pliega en espiral sobre sí misma creando una confrontación antiparalela de secuencias repetitivas de aminoácidos, conocida como una formación en  $\alpha$ -espiral (Fig. 1). En este autoplegamiento, fragmentos de cadena con dos alaninas entre dos lisinas pueden alinearse con cadenas de tres alaninas entre dos lisinas. Esta relación espacial permite a la enzima lisil-oxidasa cobre-dependiente convertir tres de estos cuatro grupos  $\alpha$ -amino

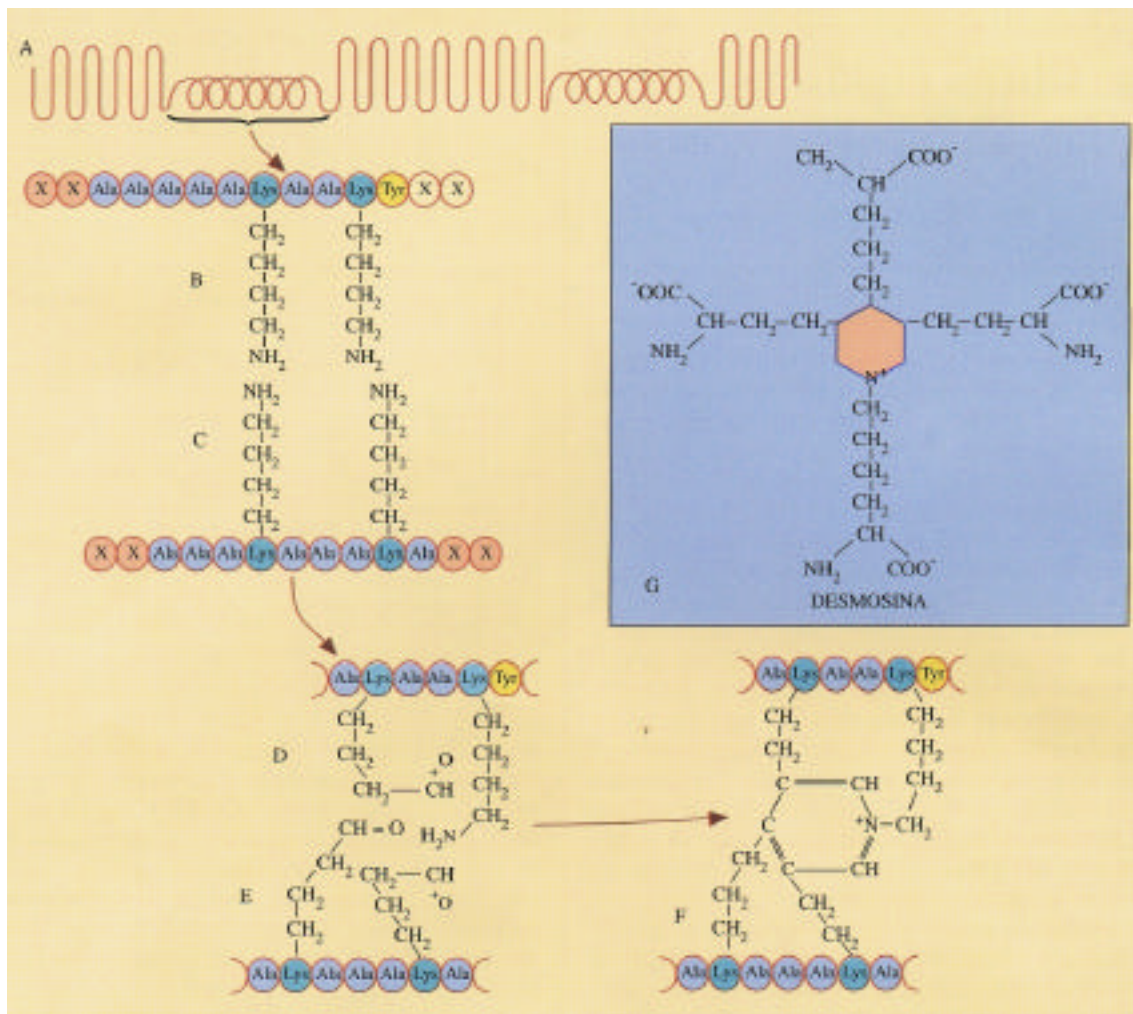


Fig. 1 - Formación de la molécula de elastina a partir de tropoelastina

en aldehídos, denominados alisinas, manteniendo el cuarto grupo inmodificado. La fusión covalente de estos cuatro grupos dará lugar a la formación de una molécula nueva llamada desmosina, la cual representa el 4% del peso total de la elastina y es responsable de su carácter estable e insoluble. Por consiguiente, la elastina madura se diferenciará de la tropoelastina por su menor contenido en lisinas y por la presencia de desmosinas. El isómero de la desmosina, la isodesmosina, supone el 1,1% del peso total de la elastina y tiene capacidad de autofluorescencia. El contenido en desmosina e isodesmosina de distintas preparaciones de elastina es muy constante, y acontecen en alrededor de 1,5 y 1 residuo por 1000 aminoácidos, respectivamente. Por consiguiente, su cuantificación puede ser usada para determinar el contenido de elastina en los distintos tejidos (Starcher, 1977; Uitto y cols, 1983).

### **Componente microfibrilar**

Las microfibrillas de las fibras elásticas son componentes de la matriz extracelular ampliamente distribuidas. Además de asociadas a la elastina, también están presentes en las membranas periodontales, los vasos linfáticos, la capa adventicia de la arteria aorta y el ligamento suspensorio del ojo, lugares en los que parece que actúan como estructuras de ligamiento entre las células y los elementos de la matriz extracelular (Schwartz y cols., 1985).

El componente microfibrilar de las fibras elásticas puede ser aislado de éstas mediante digestión con determinadas enzimas proteolíticas o mediante extracción de los tejidos bajo condiciones de desnaturalización y la presencia de agentes reductores de grupos sulfidrilo. A diferencia de la elastina, estas moléculas presentan afinidad por las tinciones catiónicas (rutenio, plomo), son resistentes a la actividad de las elastasas y sensibles a la acción de la tripsina y de la quimiotripsina.

El estudio ultraestructural nos muestra unas fibras de 10-12nm. de diámetro con estriaciones superficiales. En la sección transversal puede observarse la existencia de un núcleo electrontranslúcido rodeado por un armazón de electrones densos externos (Goldfischer y cols., 1983; Cotta-Pereira y cols., 1976). La sección longitudinal tiene el aspecto de una cadena de cuentas, lo cual sugiere que podrían estar constituidas por más de una proteína.

La estructura bioquímica de las microfibrillas de las fibras elásticas no es aún bien conocida. Sin embargo, en estos últimos años han sido identificadas distintas proteínas que participan bien como elementos estructurales o bien como proteínas asociadas a este componente microfibrilar.

Las proteínas estructurales pueden dividirse en dos grupos importantes en base a su tamaño molecular: las de 125 kDa y las de 115 kDa. El grupo de mayor peso molecular está compuesto por tres familias: las fibrilinas, las fibulinas y las proteínas ligadas al TGF- latente. Dentro del grupo de menor peso molecular hallamos la emilina (Uitto y Rosenbloom, 2001).

**Fibrillina.** Es una glicoproteína de 350 kDa, aislada por Sakai y cols. en 1986 (Sakai y cols., 1986) a partir de cultivos de fibroblastos, y constituye la proteína más larga, aproximadamente 148 nm. de largo, y cuantitativamente más importante del componente microfibrilar. Característicamente su inmunorreactividad en la dermis humana se extiende más allá de las estructuras teñidas con orceína, componente P-amiloide o vitronectina, y dan lugar a una red adicional de fibras finas la cual es más prominente en la proximidad de la unión dermo-epidérmica. La presencia de inmunorreactividad frente a la fibrillina ya en la piel de los individuos de muy corta edad, junto con la particular distribución que presenta, sugieren que la fibrillina sería un

constituyente integral de la matriz extracelular, y su función el anclaje de las fibras elásticas dérmicas a esta matriz extracelular y a la lámina densa (Dahlbäck y cols., 1990).

**Fibulina.** Las fibulinas son glicoproteínas de la matriz extacelular y de la sangre. La mayoría de las fibras que muestran inmunoreactividad con los Ac antifibulina-1 también son teñidas con los Ac frente a las proteínas del tejido elástico elastina y fibrillina, así como con la tinción de Verhoeff. Los estudios mediante inmunomicroscopia electrónica de las fibras elásticas de la piel revelan que la fibulina-1 se halla localizada dentro del núcleo amorfo de estas fibras, junto con la elastina, y no en las microfibrillas de fibrillina asociadas a la elastina (Roark y cols., 1995).

**Proteínas ligadas al TGF- $\beta$  latente (PLTL).** Distintos estudios inmunológicos han localizado a las PLTL1 y PLTL2 en las microfibrillas de las fibras elásticas, lo que sugiere que una o más de ellas podrían ser un componente de estas fibrillas (Taipale y cols., 1994; Gibson y cols., 1995)

Respecto a las proteínas asociadas al componente microfibrilar, han sido identificados el componente P-amiloide, la lisozima, la vitronectina, el versicán y la fibronectina.

**Componente P-amiloide.** El componente P-amiloide (CPA) es una glicoproteína pentamérica que hallamos en los depósitos de sustancia amiloide y que es aparentemente idéntica a la proteína plasmática CPA sérica. Junto con la fibronectina y la laminina, son proteínas que se hallan normalmente tanto circulantes en el plasma como asociadas al tejido conectivo, aunque con distintas afinidades. Así, el CPA tiene mayor afinidad por las fibras elásticas, la fibronectina por las fibras colágenas y la laminina por las membranas basales respectivamente. El CPA se halla unido de forma no covalente al componente microfibrilar de las fibras elásticas dérmicas (Breathnach y



cols., 1989). La presencia de CPA en la piel humana es dependiente de la edad: es indetectable hasta los tres años de edad, y a partir de este momento se incrementa hasta alcanzar las proporciones del adulto aproximadamente a los cinco años (Khan y Walker, 1984). Los anticuerpos contra el CPA sérico marcan de forma inmunoespecífica el manto microfibrilar periférico de las fibras elásticas de la piel y de los vasos sanguíneos del adulto (Hamon y Walker, 1982; Breathnach y cols., 1981; Breathnach y cols., 1983).

**Lisozima.** La lisozima es una hidrolasa 1,4-*N*-acetilmuramidasa con carga positiva que parece constituir parte del componente microfibrilar del tejido elástico, a cuyos grupos aniónicos estaría ligada de forma electrostática. Asimismo interacciona con los mucopolisacáridos ácidos sulfatados constituyentes de la sustancia fundamental. El papel funcional de la lisozima ligada a las fibras elásticas no es bien conocido. Se ha postulado que, dada su carga catiónica, podría ejercer un efecto de protección frente a las enzimas proteolíticas. Esta hipótesis es análoga a los estudios experimentales que muestran que el ligamiento de las fibras elásticas a detergentes catiónicos inhibe las elastasas (Jordan y cols., 1974). Una hipótesis alternativa sería que la lisozima ejerce un papel enzimático en la remodelación de las fibras elásticas por medio de la degradación de los hidratos de carbono asociados a la elastina. La lisozima posee, asimismo, una actividad inmunomoduladora. Dado que los fragmentos de elastina generados por la actividad de las elastasas son antigénicos, el depósito de lisozima en las fibras elásticas alteradas o degeneradas podría prevenir la sensibilización de los linfocitos y el ataque de los neutrófilos (Albrecht y cols., 1991).

**Vitronectina.** Es una glicoproteína plasmática y tisular multifuncional la cual se halla localizada inmunohistoquímicamente en la piel humana junto al componente P-amiloide y a otras estructuras con tinción positiva para la orceína. También denominada proteína S, es conocida por su papel en las vías de la coagulación y del complemento. El estudio

ultraestructural sitúa a esta glicoproteína en la periferia de las fibras elásticas (Dahlbäck y cols., 1986; Dahlbäck y cols., 1989). Al igual que el CPA, la vitronectina se halla unida de forma no covalente a las fibras elásticas de la dermis y su presencia también depende de la edad (Hintner y cols., 1991; Dahlbäck y cols., 1990). Estos hallazgos sugieren que tanto el CPA como la vitronectina serían proteínas asociadas al componente microfibrilar de las fibras elásticas, en lugar de constituir una parte integral del mismo.

**Versicán.** Es un proteoglicano condroitinsulfato sintetizado por los queratinocitos y los fibroblastos humanos. Muestra un patrón de inmunotinción positivo tanto para las fibras oxitalánicas, las eláunicas y para las fibras elásticas de la dermis, lo cual sugiere una asociación con el componente microfibrilar de las fibras elásticas. En la epidermis, la inmunotinción con versicán está restringida a la zona de proliferación de los queratinocitos (capa basal, folículos pilosos y glándulas sudoríparas), donde probablemente ejerce un papel modulador de su proliferación y migración (Zimmermann y cols., 1994).

**Fibronectina.** La fibronectina es una glicoproteína insoluble de la matriz extracelular que se encuentra asociada a numerosas estructuras hísticas, como el tejido conectivo y las membranas basales. La denominación de fibronectina le fue asignada por Keski-Oja y cols. en 1976 para indicar su interacción con las proteínas fibrosas (Keski-Oja y cols., 1976). En cultivos celulares, ha sido demostrada la síntesis de fibronectina por un gran número de células, como fibroblastos, macrófagos, células endoteliales vasculares, células musculares lisas, células de Schwann, células glomerulares, intestinales, renales y hepáticas, entre otras. La distribución hística de la fibronectina *in vivo* se corresponde con las funciones que le son atribuidas en los procesos de adhesión, migración y diferenciación celular, así como de organización de la estroma hística. En este sentido,

la hallamos en la superficie de las células epiteliales y endoteliales, de los macrófagos y de las células hepáticas, así como formando parte del cemento celular y de la sustancia fundamental (Mosher y Furcht, 1981). Asimismo se ha demostrado su presencia en la periferia de las fibras elásticas, donde formaría parte del componente microfibrilar (Fleischmajer y Timpl, 1984).

La síntesis de fibronectina se halla incrementada en el proceso de envejecimiento intrínseco así como en aquellas condiciones involucradas en el envejecimiento de la piel, como la diabetes mellitus y la irradiación solar (Frances y cols., 1991).

### **1.1.1.3 Metabolismo de las fibras elásticas**

#### **Síntesis de las fibras elásticas**

La elastina es sintetizada mayoritariamente por los fibroblastos dérmicos, y en menor proporción por las células musculares lisas, las células endoteliales y los condroblastos. Su producción intracelular sigue el patrón general de la síntesis de proteínas: transcripción, o síntesis del ARNm a partir de una secuencia de ADN específica; traducción, o formación del polipéptido de tropoelastina a partir del ARNm en los poliribosomas del retículo endoplasmático rugoso (RER); liberación de la molécula recién sintetizada al interior de las cisternas del RER; y, finalmente, exocitosis al medio extracelular a través de las vacuolas del aparato de Golgi (Ebling y cols., 1993). Este último paso puede ser bloqueado por la colquicina (Frances y Robert, 1984). La elastina es liberada al medio extracelular en forma de tropoelastina. Ya en el medio extracelular, la tropoelastina se pliega sobre si misma, con la subsiguiente formación de moléculas de desmosina que estabilizarán la conformación  $\alpha$ -helicoidal de la nueva molécula de elastina.

Los fibroblastos responsables de la elastogénesis procederían de la siguiente manera: primero sintetizarían y depositarían en el medio extracelular bandas paralelas de microfibrillas que actuarían como almacén y sistema de orientación de las futuras fibras elásticas maduras. Sobre estas bandas de microfibrillas se iría depositando la elastina. La unión entre ambos componentes se vería facilitada por las fuerzas electrostáticas que se generan entre la carga positiva de la elastina y la negativa de las microfibrillas (Frances y Robert, 1984). El resultado final sería un núcleo de material amorfo rodeado de una túnica de microfibrillas.

### **Degradación de las fibras elásticas**

El recambio metabólico de la elastina madura es por lo general lento en comparación con el del resto de las proteínas, aunque un cierto grado de degradación tiene lugar durante el crecimiento, la curación de las heridas, la remodelación tisular y el embarazo, así como en diversos procesos patológicos, como el seudoxantoma elástico, la *cutis laxa*, la anetodermia, y el síndrome de Marfan, entre otros (Burton, 1993; Uitto, 1979). Después de un periodo de estabilidad durante la juventud, se produce un incremento de la degradación de las fibras elásticas, probablemente como resultado de un aumento de las enzimas elastolíticas en los distintos tejidos (Hornebeck y Robert, 1979). Las enzimas responsables de esta degradación *in vivo* son las elastasas. Las elastasas, aisladas inicialmente en tejido pancreático, han sido también detectadas después en los polimorfonucleares neutrófilos, los macrófagos y las plaquetas. Las elastasas constituyen un grupo heterogéneo de proteasas, que incluye sulfidril, serín y metaloproteinasas (Balo y Banga, 1950; Janoff, 1973; Ackerman y Beebe, 1974; Legrand y cols., 1973).

Las elastasas degradan la elastina en condiciones de pH neutro o ligeramente alcalino. Aunque la actividad de las distintas elastasas es similar en cuanto a la capacidad de digestión de la elastina, sus especificidades enzimáticas son distintas (Senior y cols., 1977). Los péptidos de elastina liberados por las elastasas son antigénicos, y pueden acelerar el proceso de degradación de la elastina por mecanismos inmunológicos (Frances y Robert, 1984).

Las elastasas son inactivadas por las enzimas inhibidoras del plasma, como la 1-antitripsina, la 1-antiquimiotripsina y la 2-macroglobulina.

#### **1.1.1.4 Clasificación y topografía de las fibras elásticas**

Las fibras elásticas están presentes en diversos tejidos conectivos y son las responsables de la elasticidad fisiológica de los órganos. Entendemos por elasticidad a la propiedad mecánica, de una sustancia o tejido corporal, de experimentar una deformación pasajera como consecuencia de la acción de un campo de fuerzas (estiramiento, presión), y regresar al estado inicial una vez finalizada dicha acción. La concentración de fibras elásticas es muy alta en la aorta y el sistema cardiovascular, en los pulmones, así como en diversos tendones como el ligamento de la nuca y el tendón de Aquiles. En la piel humana normal, las fibras elásticas se hallan formando una red extensa distribuida por toda la dermis. Las zonas con mayor porcentaje de fibras elásticas son la cara, el cuello, la nuca y el cuero cabelludo, seguidas por el tronco y los miembros superiores e inferiores, y en el último lugar por las palmas y las plantas, donde su concentración es escasa (Torres y Alonso, 1990).

El estudio bajo el microscopio óptico de una biopsia de piel teñida de forma específica para las fibras elásticas permite distinguir, desde la dermis superficial a la profunda, tres grupos de fibras: las fibras oxitalánicas, las fibras eláunicas y las fibras elásticas

dérmicas propiamente dichas (Fig. 2). La proporción entre estos tres tipos difiere según el lugar de donde es tomada la muestra, y está probablemente ligada a las funciones particulares exigidas a la piel de las distintas regiones corporales (Frances y Robert, 1984).

### **Fibras oxitalánicas.**

Las fibras oxitalánicas forman una red superficial perpendicular a la zona de unión dermoepidérmica. Son estructuras muy delgadas que se originan a partir de las fibras eláuticas y, desde éstas, de forma aislada o arborescente, se dirigen perpendicularmente hacia la membrana basal (Fig. 3). Debido a sus propiedades tintoriales (ver más adelante), esta red de fibras superficiales no fue descubierta hasta 1958 por Fullmer y Lillie (Fullmer y Lillie, 1958).

El estudio con microscopía electrónica de barrido muestra que estas fibras, de un diámetro de 0,5-2,5 $\mu$ m, están constituidas en su práctica totalidad por grupos de microfibrillas tubulares paralelas estrechamente unidas, que en ocasiones contactan con la membrana basal. El material amorfo es prácticamente inexistente (Tsuji y Hamada, 1981).

Esta red, que aparece al final de la vida fetal, persiste durante toda la vida y se rarifica en la vejez (Torres y Alonso, 1990).

Dada su localización en aquellas áreas corporales de mayor tensión (adventicia vascular, periodontio, etc), ejercen con toda probabilidad una función de resistencia mecánica de la piel y de la unión dermoepidérmica.

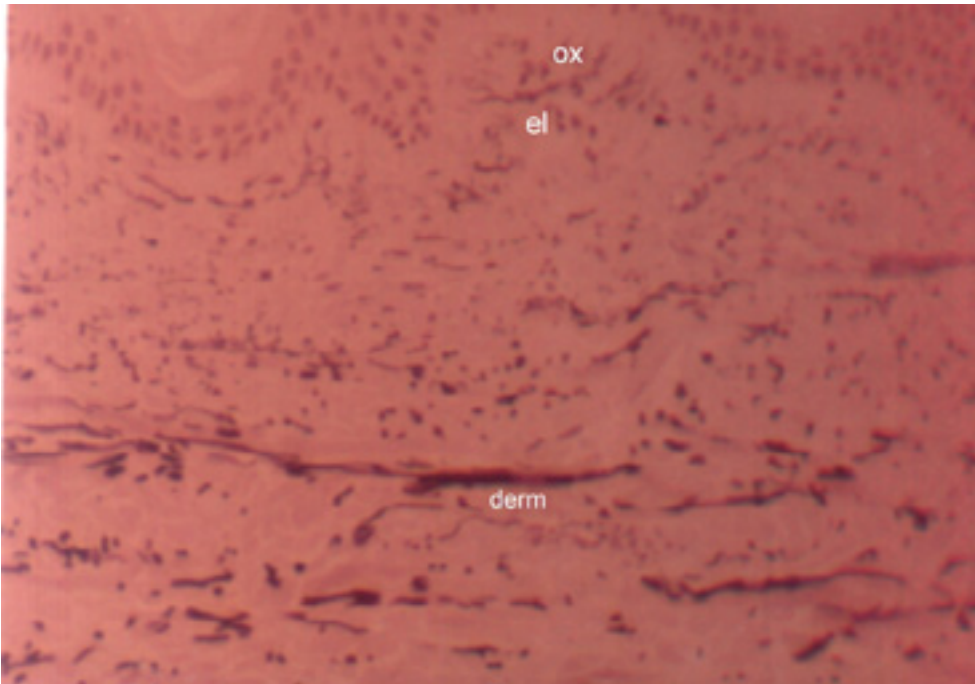


Fig. 2 - Microfotografía de las fibras elásticas dérmicas (orceína, x200).  
ox: fibras oxitalánicas. el: fibras eláunicas. derm: fibras elásticas dérmicas

**Fibras eláunicas.**

En 1965 Gawlik (Gawlik, 1965) describió en los tendones y los cartílagos fibrosos una red de fibras elásticas con características tintoriales similares a las fibras oxitalánicas: las fibras eláunicas. En la piel, estas fibras forman un plexo que se distribuye paralelo a la unión dermoepidérmica, y en el cual se anclan las fibras oxitalánicas (Fig. 3).

Los estudios con microscopía electrónica muestran que estas fibras son ricas en microfibrillas y pobres en material amorfo. Son fibras más anchas y acintadas que las oxitalánicas, con un diámetro que oscila entre 1,5-2,5 $\mu\text{m}$  (Frances y Robert, 1984).

**Fibras elásticas.**

Las fibras elásticas propiamente dichas se localizan en la dermis media y profunda. Son fibras de diámetro variable (1-3,5 $\mu\text{m}$ ), de mayor grosor que las anteriores, y se disponen en general paralelas a la superficie cutánea, aunque en ocasiones pueden formar redes con fibras orientadas en distintas direcciones (Fig. 4).

Bajo el microscopio electrónico se presentan como áreas translúcidas a los electrones, que corresponden a la elastina, las cuales se hallan rodeadas por el componente microfibrilar (electrondenso). Son fibras largas, elípticas y ramificadas, que en ocasiones se organizan formando láminas delgadas y largas de material fenestrado (Frances y Robert, 1984; Tsuji y Hamada, 1981).



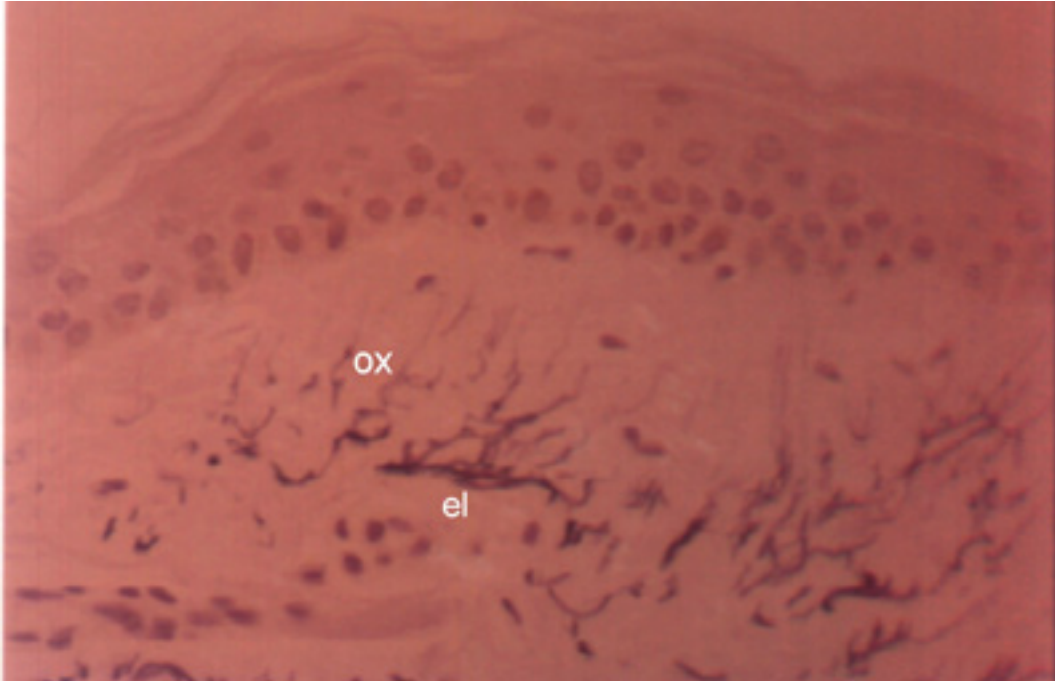


Fig. 3 – Microfotografía de las fibras elásticas superficiales (orceína, x400).

ox: fibras oxitalánicas. el: fibras eláunicas

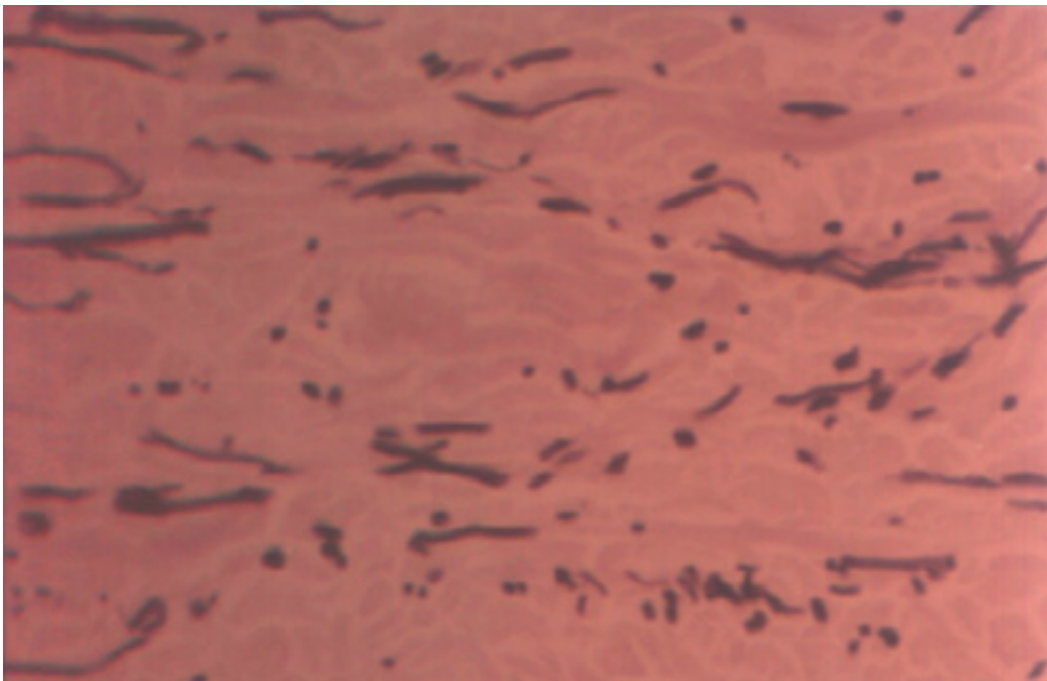


Fig. 4 – Microfotografía de las fibras elásticas de la dermis reticular (orceína, x400)

## **1.1.2 Métodos de estudio de las fibras elásticas de la piel**

Las fibras elásticas requieren unas tinciones específicas para poder ser visualizadas. Por este motivo, no fue hasta la segunda mitad del siglo XIX con la mejoría de las técnicas de tinción, cuando se detectó su existencia. Ranvier pudo observar por primera vez la presencia de las fibras elásticas en la dermis humana tras incubar una biopsia cutánea con ácido acético, el cual disuelve las fibras de colágeno (Ranvier, 1868). Desde entonces se han ido desarrollando métodos tintoriales más sencillos y específicos, que se revisan a continuación.

### **1.1.2.1 Tinciones para microscopía óptica**

En el estudio de las fibras elásticas de la dermis al microscopio óptico podemos evidenciar la existencia de fibras de diámetros diversos y con afinidades tintoriales distintas. Las tinciones más utilizadas son: la resorcina-fucsina, la aldehído-fucsina, la orceína, la de Verhoeff y la azul Congo (Cotta-Pereira y cols., 1976; Mera y Davies, 1986).

#### **Tinción con resorcina-fucsina**

Descrita inicialmente por Weigert (Weigert, 1898) y Sheridan, fue modificada más tarde por Lawson en 1936 (Lawson, 1936). Si se utiliza conjuntamente con la tinción de Van Gieson, se obtiene un excelente contraste entre las fibras elásticas profundas (color púrpura-negro), las colágenas (rojas), y las células epiteliales y musculares (amarillas).

**Tinción con aldehído de fucsina**

Fue descrita por Gomori en 1950 (Gomori, 1950). Tiñe las fibras elásticas maduras e inmaduras de color púrpura a azul. También tiñe los mastocitos y algunos glucoconjugados sulfatados de los tejidos conectivos de color púrpura azulado.

**Tinción con orceína**

Fue descrita por Taenzer en 1887 y modificada poco después por Unna (Unna, 1890). Tiñe las fibras elásticas maduras e inmaduras de color marrón-rojizo. Es una tinción sencilla de llevar a cabo que permite una correcta visualización de las fibras elásticas.

**Tinción de Verhoeff**

Descrita en 1908 por este autor (Verhoeff, 1908), tiñe las fibras elásticas de la dermis reticular de color negro, con lo que se obtiene una excelente visualización. Combinada con la tinción de Van Gieson aporta un mejor contraste de la distintas estructuras de la piel.

**Tinción con azul Congo**

La tinción con rojo Congo es utilizada habitualmente para el diagnóstico de depósitos de sustancia amiloide en los tejidos humanos, los cuales se tiñen de color rojo (Highman, 1946). Con la modificación realizada por Davies y Young se obtiene una coloración azul oscura de las fibras elásticas y roja de la sustancia amiloide (Davies y Young, 1982).

### 1.1.2.2 Tinciones inmunohistoquímicas

En los últimos años han sido desarrollados distintos anticuerpos (Ac) tanto monoclonales como policlonales frente a los distintos componentes de las fibras elásticas. La mayoría de ellos pueden ser utilizados sobre muestras fijadas en formol e incluidas en parafina por el método peroxidasa-antiperoxidasa (Van Noorden y Polak, 1983). Con este procedimiento se utilizan con frecuencia enzimas proteolíticas para desenmascarar determinados antígenos. Estas enzimas incrementan la permeabilidad de las fibras a los marcadores inmunohistoquímicos por rotura de los entrecruzamientos, con lo que se obtiene una mejor inmunotinción (Mera y cols., 1985). En este sentido, el pretratamiento de la muestra con elastasa, al comportar una digestión de la elastina, nos permite una mejor valoración de los distintos componentes de las microfibrillas; asimismo, el pretratamiento con pepsina, tripsina y quimiotripsina, al digerir las microfibrillas superficiales, ponen al descubierto el material amorfo de elastina con las microfibrillas internas. En el laboratorio donde realizamos nuestras inmunotinciones, se realiza un pretratamiento con pepsina para los anticuerpos antielastina, anticomponente P- amiloide y antifibronectina; con saponina para los anticuerpos anti- 1-antitripsina, anti- 1-antiquimiotripsina y antilisozima; y no se realiza pretratamiento en el caso de las lectinas y de los Ac anti- 2-macroglobulina.

La utilización de estos Ac, tanto monoclonales como policlonales, ha permitido evaluar las variaciones que experimentan los distintos elementos constitutivos de las fibras elásticas respecto al envejecimiento fisiológico y a los distintos procesos patológicos.

### **Anticuerpo antielastina**

El sustrato del anticuerpo monoclonal AcMo anti- -elastina es un inmunógeno de la elastina fetal del carnero. Por ello, este AcMo muestra una mayor avidéz por la elastina relativamente inmadura, pobremente entrecruzada y recién sintetizada (Davies y cols, 1982; Mera y cols., 1987). En general, esta inmunotinción muestra una estrecha correlación con las tinciones estándar para microscopía óptica de las fibras elásticas, hecho que confirma la alta especificidad de este anticuerpo. La tinción pierde intensidad en las secciones de parafina tratadas previamente con elastasa, mientras que mejora después de la digestión con tripsina y quimiotripsina. Paradójicamente, una digestión breve (30 min.) con elastasa o pepsina comporta un incremento en el grado de tinción de las fibras maduras, lo que hace suponer que una degradación parcial expondría sitios antigénicos no accesibles en condiciones normales (Mera y cols., 1985).

### **Anticuerpo anticomponente P-amiloide**

Los anticuerpos frente al CPA sérico marcan inmunoespecíficamente el manto microfibrilar periférico de las fibras elásticas de la piel y de los vasos sanguíneos del adulto. Si nos centramos en la piel, esta inmunotinción suele ser negativa en niños menores de 3 años y, a partir de este momento, se incrementa hasta alcanzar la intensidad de la piel del adulto, aproximadamente a los 5 años (Khan y Walker, 1984). Las fibras oxitalánicas de la dermis papilar aparecen teñidas de forma homogénea, dado que están constituidas prácticamente en su totalidad por microfibrillas; por su parte, las fibras eláunicas y las elásticas de la dermis reticular se muestran como estructuras tubulares teñidas únicamente en su periferia, puesto que la parte central se halla constituida por la elastina. Los Ac frente al CPA también tiñen las fibras elásticas del tejido conectivo del pulmón, del corazón, de las paredes de los vasos sanguíneos así

como de la membrana basal de los ductos de las glándulas sudoríparas. No se observa tinción de las fibras colágenas ni de las membranas basales de la porción secretora de las glándulas sudoríparas, de los vasos sanguíneos de la dermis papilar ni de la unión dermoepidérmica (Breathnach y cols., 1981; Meral y cols., 1987; Breathnach y cols., 1983).

La predigestión breve de la muestra parafinada con tripsina (10 min.) o elastasa (30 min) incrementa la intensidad de la inmunotinción, mientras que el pretratamiento con quimiotripsina no la modifica (Mera y cols., 1985; Mera y Davies, 1987).

### **Anticuerpo antifibrillina**

A diferencia del componente P-amiloide y de la vitronectina, la inmunotinción con el Ac antifibrillina es positiva en la dermis papilar superficial y profunda y en la dermis reticular prácticamente desde el nacimiento. Los Ac antifibrillina, además de teñir las fibras elásticas oxitalánicas, eláunicas y de la dermis reticular, delimitan una fina red adicional de fibras. Estas fibras, no teñidas con orceína ni con el Ac contra el componente P-amiloide, se muestran como una prolongación de las fibras oxitalánicas, y se dirigen perpendicularmente a la zona de unión dermo-epidérmica, lugar donde la inmunorreactividad es más intensa (Dahlbäck y cols., 1990).

### **Anticuerpos antivitronectina**

El patrón de inmunotinción con el anticuerpo antivitronectina es superponible a las estructuras teñidas con el Ac antiCPA y con orceína. La inmunotinción es negativa en las muestras de piel obtenidas en individuos de menos de 6 años de edad, e invariablemente positiva en muestras de individuos de más de 13 años. En el grupo de 6 a 13 años es variable, aunque generalmente más débil que en las muestras de individuos

de mayor edad. A partir de los 20 años todas las muestras presentan una tinción positiva muy intensa (Dahlbäck y cols., 1989).

### **Anticuerpos antiversicán**

Los Ac frente al versicán, en la piel humana, muestran inmunotinción positiva en la capa de células basales de la epidermis, en el folículo piloso, en las glándulas sudoríparas y en las fibras elásticas. Referente a estas últimas, el versicán parece hallarse asociado a las tres redes de fibras elásticas dérmicas: las fibras oxitalánicas, las eláunicas y las de la dermis reticular. Si tenemos en cuenta que las fibras oxitalánicas se hallan constituidas únicamente por microfibrillas, la asociación del versicán con este componente de las fibras elásticas parece obvia (Zimmermann y cols., 1994).

### **Anticuerpos antilisozima**

La inmunotinción con Ac antilisozima de las fibras elásticas ha sido descrita en el bazo, el hígado, la piel, la mama y en las paredes vasculares. Las fibras colágenas no se tiñen (Mera y Davies, 1987).

Respecto a la piel, y según los estudios llevados a cabo por Albrecht y cols. (Albrecht y cols., 1991), la inmunotinción para la lisozima era negativa en las fibras elásticas de individuos jóvenes (14-18 años), mientras que en el grupo de 56-84 años de edad era posible observar una inmunotinción positiva de fibras dispersas tanto en la dermis papilar como en la reticular. Esta inmunotinción era más intensa en las muestras de piel fotoexpuesta, donde el número de fibras positivas parecía correlacionarse con el grado de daño actínico. Mera y cols. (Mera y cols., 1985) hallaron que en muestras de tejido parafinado era necesaria una digestión preliminar con elastasas para mostrar la inmunotinción con lisozima. Este hecho sugiere una asociación de la lisozima con las

microfibrillas del interior de las fibras elásticas. Sin embargo, en tejido congelado obtenían una inmunotinción positiva sin digestión previa, lo cual parece poner en evidencia la existencia de una relación entre la lisozima y la capa de microfibrillas exterior de las fibras elásticas. La lisozima asociada a esta capa exterior probablemente se vería alterada durante los procesos de fijación en formol e inclusión en parafina.

### **Anticuerpo HB8**

El HB-8 es un AcMo que reacciona con el componente microfibrilar del tejido elástico, mostrando un patrón de inmunotinción superponible al de la tinción con orceína. Se obtiene mediante técnicas de hibridación celular por inmunización de *Balb/c mice* con una suspensión de linfocitos obtenidos del conducto torácico humano. Este hecho sugiere que podría ir dirigido contra un antígeno común a los linfocitos y a las microfibrillas. No presenta reactividad con las fibras colágenas.

Mediante inmunomicroscopía electrónica, las partículas marcadas con el HB8 aparecen como gránulos aislados o formando pequeños cúmulos localizados irregularmente sobre las microfibrillas. La densidad de las partículas fijadas a las fibras oxitalánicas es menor que la observada sobre las microfibrillas de la dermis media y fibras elásticas propiamente dichas. No se produce marcaje del material amorfo, lo que confirmaría su especificidad por el componente microfibrilar (Dawson y cols., 1984; Schmitt y cols., 1986).

### **Anticuerpos antifibronectina**

En la piel humana, mediante estudios de inmunofluorescencia indirecta la fibronectina se encuentra fundamentalmente en la zona de la unión dermoepidérmica, en la dermis papilar y alrededor de los anejos cutáneos (unidad pilosebácea y glándulas sudoríparas



ecrinas). En la dermis reticular la intensidad de la tinción es menor, aunque se halla incrementada en las áreas adyacentes al tejido celular subcutáneo y a los anejos. La epidermis no muestra tinción específica para la fibronectina, excepto en determinadas enfermedades, como la psoriasis. La unión dermoepidérmica aparece teñida como una línea continua, homogénea, cuya intensidad varía enormemente de unos individuos a otros. En las zonas de la piel con gran cantidad de sustancia fundamental, como la dermis papilar, el patrón de inmunofluorescencia de la fibronectina muestra un aspecto reticular, mientras que en la dermis reticular se observan largas bandas de fibronectina que adoptan un patrón fibrilar lineal. Estos patrones reticular y lineal son debidos a la relación de la fibronectina con las fibras colágenas. También hallamos tinción positiva en las paredes vasculares cutáneas, principalmente en los capilares de las papilas, en el tejido muscular estriado y en el epineuro y vainas perineurales de los nervios periféricos (Fyrand, 1979).

Los estudios con inmunomicroscopía electrónica y tinción con inmunoferritina corroboran la asociación de la fibronectina con las fibras de colágeno tipo I y III y con la membrana basal de la unión dermo-epidérmica (concretamente con la lámina lúcida). Asimismo se demuestra su presencia en la periferia de las fibras elásticas, donde formaría parte del componente microfibrilar (Fleischmajer y Timpl, 1984).

## **Lectinas**

Las lectinas son un grupo de proteínas y glicoproteínas que reaccionan específicamente con determinados grupos de hidratos de carbono de la superficie celular. Fueron descritas inicialmente en ciertas plantas, y de ahí se derivan sus denominaciones (Tabla I). A medida que los queratinocitos de la epidermis maduran desde células basales a células granulares, se incrementa la incorporación de

Tabla I.- Las lectinas y sus especificidades

Lectina	Nombre abreviado	Especificidad
<i>Concanavalina ensiformis</i>	Con A	-D-glucosa -D-manosa
Aglutinina del germen de trigo o <i>Triticum vulgare</i>	WGA	-(1-4)-D-N-acetil-glucosamina Ácido raminico
<i>Ricinus communis I</i>	RCA-I	-D-galactosa
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	-D-N-acetil-galactosamina
<i>Arachis hipogea</i>	PNA	-D-galactosa(1-3)-N-acetil-galactosamina
Aglutinina del <i>Ulex europaeus</i>	UEA	-D-fucosa
<i>Helix pomatia</i>	HPA	N-acetil-galactosamina
Aglutinina del germen de soja	SBA	-D-N-acetil-galactosamina

glucoconjugados en sus membranas plasmáticas. El estudio de la distribución normal de los hidratos de carbono en la epidermis sana contribuye a reconocer los patrones de distribución alterados propios de las enfermedades de tipo autoinmunitario o neoplásico (Schaumburg-Lever G , 1990; Wollina y cols., 1989; Virtanen y cols. 1986; Schamburg-Lever G , y cols., 1986).

Si nos centramos en las fibras elásticas, el componente microfibrilar de éstas se caracteriza por tener una naturaleza glicoproteica y, por tanto, presentar en su estructura residuos carbohidratados susceptibles de ser marcados con lectinas (Fanning y Cleary, 1985). Davies y Mera en 1987 (Davies y Mera, 1987), analizaron el marcaje con las lectinas Con A y WGA de las fibras elásticas de los vasos sanguíneos y ductos mamarios en tejido normal y en tejido elastótico de algunas neoplasias. Los resultados obtenidos fueron negativos para las fibras elásticas normales y una tinción positiva para las del material elastótico. De estos resultados concluyen que el tejido elástico neoplásico, a diferencia de las fibras elásticas normales, es un tejido inmaduro, recientemente sintetizado y, por tanto, constituido sobre todo por microfibrillas. Sin

embargo, por el momento no hay estudios que analicen la tinción con lectinas de las fibras elásticas de la dermis normal y/o patológica.

**Anticuerpos anti inhibidores de las proteasas plasmáticas: antialfa-1-antitripsina, antialfa-1-antiquimiotripsina y antialfa-2-macroglobulina**

La piel humana contiene diversas proteinasas, tanto en la dermis como en la epidermis (Fräki y cols., 1983). El papel funcional de estos inhibidores de las proteasas en las fibras elásticas es probablemente la inhibición de las enzimas elastinolíticas, como las elastasas y la catepsina G. Los principales inhibidores de las primeras son la alfa-1-antitripsina y la alfa-2-macroglobulina, mientras que la alfa-1-antiquimiotripsina sería el inhibidor habitual de la catepsina G. El papel de otros inhibidores, como el inter-alfa tripsina inhibidor, C1 esterasa inhibidor, y los anticuerpos frente la antitrombina III y la elastasa de neutrófilos no está tan bien definido (Bieth, 1980; Travis y cols., 1978; Davies y Mera, 1987).

En la piel normal se obtiene una tinción moderada de las fibras de colágeno de la dermis, principalmente con el anticuerpo frente a la alfa-1-antitripsina. Las fibras elásticas maduras de la dermis no muestran inmunotinción para los distintos inhibidores de las proteasas, al igual que ocurre con las fibras elásticas maduras del tejido conectivo mamario y de los vasos sanguíneos. Por el contrario, en los tejidos fetales y en el tejido elastótico del cáncer de mama, en los cuales se hallan fibras elásticas inmaduras, se obtiene una inmunotinción positiva. Estos hallazgos sugieren que los inhibidores de las proteasas plasmáticas jugarían un papel protector durante la formación inicial de las fibras elásticas, por frenación de las enzimas proteolíticas extracelulares. De ello se desprende que su presencia en asociación con las fibras elásticas podría ser indicador de su reciente formación. En el caso del cáncer de mama, la presencia de un incremento en

la concentración de los inhibidores de las proteasas en relación con las enzimas elastinolíticas contribuiría a la elastosis (entendiendo por elastosis el incremento patológico de las fibras elásticas) que hallamos en este tipo de neoplasia (Mera y cols., 1987; Davies y Mera, 1987).

### **1.1.2.3 Tinciones para microscopía electrónica**

En el estudio con el microscopio de transmisión de electrones podemos diferenciar por su distinta electrondensidad los dos componentes fundamentales de las fibras elásticas: el material amorfo y las microfibrillas. Dada su distinta composición química, podemos utilizar diversas sustancias para mostrar selectivamente los dos componentes por separado. Para resaltar la densidad electrónica de la elastina, han sido utilizadas sustancias como el ácido tánico, el ácido fosfotúngstico y el sulfonato de tetrafenilporfina argéntica, entre otros. Para las microfibrillas, han sido empleadas distintas sustancias catiónicas como el nitrato y acetato de uranilo y el rojo rutenio (Albert, 1972). Según Mera y Davis (Mera y Davies, 1986), los métodos más fiables son el ácido tánico, para mostrar la elastina, y el rojo rutenio, el cual aumenta la densidad electrónica de las microfibrillas, así como de otros componentes de la matriz conectiva como las glicoproteínas y los proteoglicanos. En general, para visualizar las fibras elásticas suele emplearse una combinación de osmio, plomo y uranilo, mientras que el empleo de las sustancias que marcan específicamente los distintos componentes son utilizadas principalmente en el campo de la investigación.

### **1.1.3 Envejecimiento y patología de las fibras elásticas de la piel**

Las fibras elásticas de la piel pueden verse alteradas en numerosos procesos, tanto fisiológicos como patológicos. Para una mejor comprensión del tema que vamos a

tratar, reseñaremos brevemente las alteraciones de las fibras elásticas que acontecen en el curso del envejecimiento fisiológico y del fotoenvejecimiento, así como en aquellas enfermedades que tienen como substrato patológico el tejido elástico.

#### **1.1.3.1 Las fibras elásticas en el envejecimiento fisiológico**

El envejecimiento fisiológico de la piel se caracteriza clínicamente por la laxitud y la atrofia, las cuales conllevan una mayor visualización de las estructuras vasculares, la presencia de arrugas finas superficiales y la pérdida de la elasticidad. La degeneración de las fibras elásticas, que se inicia alrededor de los 30 años, se intensifica a partir de los 45-50 años, y se hace mucho más marcada a partir de los 70 años de edad, constituye el factor causal más importante de la apariencia clínica de la piel envejecida.

A partir de los 45-50 años hallamos un incremento del número y del grosor de las fibras elásticas tanto de la dermis papilar como de la dermis reticular. Además, durante el envejecimiento fisiológico las fibras elásticas de la dermis papilar muestran importantes variaciones cuantitativas individuales, y hallamos tanto patrones de proliferación focal como de pérdida focal de las arcadas (fibras elásticas eláunicas). Por su parte, las fibras elásticas de la dermis reticular no muestran diferencias dependientes de la edad en cuanto a organización (Braverman y Fonferko, 1982; Braverman, 1986). Mediante morfometría estática se pudo determinar que este incremento progresivo del área relativa ocupada por las fibras elásticas de la dermis reticular, así como también de su longitud, en relación con la edad, llegaban a ser estadísticamente significativos después de la sexta década de vida. Sin embargo, y a diferencia de lo observado mediante microscopía óptica, no hallaron ninguna variación significativa respecto a su número ni tampoco de las fibras elásticas superficiales (Robert y cols., 1988; Frances y cols., 1990). Este aumento dependiente de la edad, y que afectaría tanto a las fibras

elásticas de la dermis superficial como a las de la dermis reticular, sugiere la existencia de una síntesis continua de estas fibras a lo largo de toda la vida del individuo (Lavker, 1979; Braverman y Fonferko, 1982; Braverman, 1986). Sin embargo, a la hora de interpretar estos resultados es necesario tener en cuenta el hecho que el grosor de la piel muestra una disminución dependiente de la edad, la cual es aproximadamente de un 6% por década de vida (Branchet y cols., 1990). Por tanto, este incremento del área ocupada por las fibras elásticas de la dermis dependiente de la edad probablemente sea secundaria tanto a un aumento de su producción como a una disminución de los espacios entre ellas, ocupados en condiciones normales por la sustancia fundamental, la cual disminuye con la edad.

### **1.1.3.2 Las fibras elásticas en el fotoenvejecimiento**

Entendemos como fotoenvejecimiento el conjunto de alteraciones macro y microscópicas de la piel resultantes de la exposición de la misma a la radiación ultravioleta. El fotoenvejecimiento es el responsable indiscutible de la mayor parte de los cambios del aspecto de la piel asociados con la vejez, como la aspereza, el aspecto amarillento, las arrugas finas y burdas, las alteraciones de la pigmentación y la presencia de telangiectasias (Gilchrest, 1989). La piel dañada por la radiación rayos ultravioletas (UV) muestra un incremento lineal del grosor con la edad a partir de los 20 años (Takema y cols., 1994).

El estudio histopatológico de la piel fotoenvejecida, cuando ésta es teñida con hematoxilina-eosina y examinada bajo el microscopio óptico, muestra una tinción basófila y amorfa de la dermis papilar primero y reticular superficial y media en fases más avanzadas, la cual es conocida con el nombre de elastosis solar. Este material se denomina “elastótico” debido al hecho que está constituido fundamentalmente por

fibras elásticas engrosadas y enredadas, las cuales en estadios más avanzados forman un material amorfo granular. Mediante inmunohistoquímica se ha demostrado la presencia tanto de elastina como de componente microfibrilar, aunque la intensidad de la tinción de este último es débil en el interior de las áreas de elastosis solar. En general, podemos considerar que el contenido en elastina de la piel dañada por la radiación UV se incrementa entre 2 y 6 veces. Por su parte, las fibras elásticas terminales (fibras elásticas oxitalánicas de la dermis papilar) se hallan ausentes en la piel fotoenvejecida. El estudio ultraestructural de este material elastótico no muestra la presencia de fibras elásticas normales con su morfología característica; en su lugar observamos estructuras elásticas de apariencia granular organizadas al azar. Como consecuencia de ello, el material elastótico que se acumula en la elastosis solar no es funcional, por lo que la piel fotoenvejecida carece de elasticidad. Todas estas alteraciones se hallan limitadas a la dermis papilar, aunque en aquellos casos de daño actínico grave las podemos hallar también en la dermis reticular superficial (Braverman y Fonferko, 1982; Braverman, 1986; Albrecht y cols., 1991; Lavker, 1979).

### **1.1.3.3 Patología de las fibras elásticas de la piel**

Las fibras elásticas de la piel se hallan afectadas en distintas enfermedades del tejido conectivo, tanto hereditarias como adquiridas. Aunque su revisión no sea el objeto de este trabajo, sí que son de interés los estudios llevados a cabo por Uitto y cols. y Ghomrasseni y cols. (Uitto y cols, 1983; Ghomrasseni y cols, 2001). Mediante morfometría estática, estos autores analizaron comparativamente y por separado el volumen ocupado por las fibras elásticas (VV%) de la dermis superficial y profunda y sus diámetros en individuos sanos y en pacientes afectos de pseudoxantoma elástico (SXE), cutis laxa, anetodermia y síndrome de Buschke Ollendorf. Después de controlar por edad, hallaron que el VV% de las fibras elásticas superficiales se hallaba

significativamente disminuido en los pacientes con cutis laxa, anetodermia y SXE, y era indetectable en el síndrome de Buschke Ollendorf. Por su parte, el VV% de las fibras elásticas de la dermis profunda presentaba un aumento de 4-5 veces en el síndrome de Buschke Ollendorf, de 2-3 veces en el SXE y se hallaba disminuido en la cutis laxa y en la anetodermia. Respecto a los diámetros de estas fibras elásticas, en la dermis superficial se hallaban disminuidos en la anetodermia y no mostraron alteraciones en el SXE y la cutis laxa. Las fibras elásticas de la dermis profunda mostraron un diámetro aumentado en el SXE y en el síndrome de Buschke Ollendorf, disminuido en la anetodermia y sin cambios en la cutis laxa (Tabla II).

Tabla II. Morfometría estática de las fibras elásticas de la piel en distintos procesos patológicos

ENFERMEDAD	F.E. SUPERFICIALES		F.E. PROFUNDAS	
	VV%	diámetro (µm)	VV%	diámetro (µm)
Piel sana	1	0.9	2.1	2.1
SXE	0.48	0.89	5.6	3.3
Sd. Buschke Ollendorf	0	0	8.9	4.2
Anetodermia	0.31	0.57	0.3	1.1
Cutis laxa	0.3	0.8	0.5	2.35

F.E.: fibras elásticas; VV%: volumen ocupado por las fibras elásticas (%); SXE: pseudoxantoma elástico; Sd: síndrome



## **1.2 EFECTOS DEL CONSUMO DE CORTICOIDES SOBRE LA PIEL**

El tratamiento con corticoides, tanto tópicos como sistémicos, comporta una serie de alteraciones en la piel, consistentes sobre todo en atrofia y aumento de la fragilidad, con el posterior desarrollo de equimosis, estrías y telangiectasias. La intensidad de estas alteraciones son dependientes de la dosis y de la duración del tratamiento, y las hallamos con mayor frecuencia en individuos de edad media y avanzada.

La atrofia de la piel inducida por el consumo de corticoides es secundaria a un adelgazamiento tanto de la epidermis como de la dermis. Respecto a la epidermis, ésta presenta un adelgazamiento de las crestas interpapilares y una reducción del tamaño de los corneocitos, probablemente secundarios ambos a una disminución de la actividad mitótica de la capa germinal. En cuanto a la dermis, parece ser que su adelgazamiento sería secundario a una inhibición de la síntesis de la sustancia fundamental y del colágeno por los fibroblastos, sin alteración aparente de las fibras elásticas. Estas alteraciones comportarían una reorganización de la arquitectura de la dermis, la cual sería más compacta y delgada debido a la disminución de los espacios entre las fibras elásticas y colágenas (Burton, 1993).

### **1.2.1 Efectos del consumo de corticoides inhalados**

Los corticoides inhalados constituyen un tratamiento ampliamente utilizado en los pacientes con alteraciones de la función pulmonar, y su principal particularidad es su elevada actividad sobre el árbol bronquial con menos efectos secundarios que los corticoides sistémicos (orales o endovenosos). Sin embargo, y aunque más seguros que estos, los corticoides inhalados también pueden presentar actividad sistémica. En este

sentido, han sido descritos efectos sobre el eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal, sobre el metabolismo óseo, sobre el metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos, sobre la formación de cataratas, sobre el sistema hematológico, y sobre la piel (Lipworth, 1999; Hanania y cols., 1995).

Los efectos secundarios que los corticoides inhalados ejercen sobre la piel son similares a los producidos por los corticoides sistémicos, principalmente en forma de atrofia y púrpura. Son efectos dependientes de la dosis y de la duración del tratamiento, más frecuentes en mujeres que en hombres, y tienen lugar predominantemente en individuos de edad media y avanzada.

Capewell y cols. (Capewell y cols. 1990), en su estudio transversal, hallaron que los individuos consumidores de corticoides orales así como los consumidores de dosis altas de corticoides inhalados (1000-2250  $\mu\text{g}/\text{día}$  de dipropionato de beclometasona) presentaban una mayor prevalencia de púrpura cutánea y un grosor de la piel significativamente disminuido respecto a los controles. No hallaron diferencias en ambas variables (prevalencia de púrpura y grosor) entre los consumidores de dosis bajas de corticoides inhalados (200-800  $\mu\text{g}/\text{día}$  de dipropionato de beclometasona) y el grupo control. En esta misma línea, Haapasaari y cols. (Haapasaari y cols. 1998), en su estudio prospectivo, hallaron que el consumo de corticoides inhalados a dosis moderadas (budesonida 800-1000  $\mu\text{g}/\text{día}$ ), aunque parece que disminuye la síntesis de colágeno de la piel, no comporta una disminución de la cantidad total de colágeno ni del grosor de la piel tras 1-2 años de tratamiento. Esta aparente contradicción podría ser explicada por el lento metabolismo que presenta el colágeno de la piel así como por el hecho que los corticosteroides también actúan inhibiendo la actividad de las colagenasas, enzimas responsables en parte de la degradación del colágeno (Autio y cols., 1996). Una limitación común a todos estos estudios radica en la dificultad para determinar si las

alteraciones cutáneas que presentan los individuos consumidores de corticoides inhalados, y en particular los consumidores de altas dosis, son realmente debidas a estos o son reflejo de un efecto sinérgico con posibles cursos previos de corticoides sistémicos.

Por otro lado, y también en relación con los efectos del consumo de corticoides inhalados sobre las fibras elásticas, pero en este caso del pulmón, Godfrey y cols. (Godfrey y cols. 1995) no hallaron diferencias significativas de las fibras elásticas de la mucosa de las vías respiratorias bajas de los pacientes asmáticos consumidores habituales de corticoides inhalados respecto a las de los controles.

## **1.3 EFECTOS DEL HÁBITO DE FUMAR SOBRE EL ORGANISMO**

### **1.3.1 Generalidades**

El consumo de cigarrillos, un hábito infrecuente en 1900, ha presentado una evolución epidémica en el curso de este siglo, alcanzando la cima en 1964, año en que el 40% de la población adulta de los Estados Unidos era fumadora. Desde entonces, el consumo ha ido disminuyendo lentamente, aunque hoy en día todavía el 28% de los adultos del mundo occidental son fumadores.

El hábito de fumar constituye la principal causa evitable de enfermedad y muerte en el mundo occidental. Alrededor de un 20% de las muertes en los países desarrollados son atribuibles al hábito de fumar. En todo el mundo unos 2 millones de personas mueren cada año debido al consumo de tabaco, la mitad de ellas antes de los 70 años. Los principales efectos del hábito de fumar tienen lugar sobre los tejidos y órganos directamente expuestos al humo, como son las vías respiratorias. Además, distintos constituyentes del humo así como sus metabolitos activos pueden actuar como carcinógenos específicos sobre órganos distantes. En este sentido, es bien conocida y estudiada la asociación del consumo de tabaco con la bronquitis crónica y el enfisema pulmonar, con la cardiopatía isquémica, y con procesos malignos de distintos órganos, como el pulmón, la cavidad oral, la faringe, la laringe, el esófago, el cérvix uterino, el riñón, y la vejiga de la orina, entre otros. Aproximadamente un 30% de todas las muertes por cáncer en el mundo occidental son debidas al hábito de fumar. Aunque la relación epidemiológica entre el hábito de fumar cigarrillos y estas distintas enfermedades está bien establecida, los mecanismos subyacentes precisos no son aún bien conocidos.

El humo del tabaco está constituido por una fase volátil o gaseosa y una fase sólida o de partículas (Tabla III). La fase gaseosa, con alrededor de 500 componentes, representa el 95% del peso del humo del tabaco. Por su parte, la fase de partículas representa el 5% del peso, y está constituida por aproximadamente 3500 componentes, siendo el más importante el alcaloide nicotina. Estas sustancias son las responsables de la gran variedad de efectos tóxicos que ejerce el humo del tabaco sobre los distintos tejidos y órganos del cuerpo humano.

Tabla III.- Constituyentes tóxicos del tabaco

<b>Fase sólida (partículas)</b>	<b>Fase gaseosa</b>
Nicotina	Dióxido de carbono
Fenol	Monóxido de carbono
Catecol	Cianuro de hidrógeno
Quinoleína	Óxidos de nitrógeno
Anilina	Acetona
Toluidina	Formaldehído
Níquel	Acroleína
N-nitrosodietanolamina	Amonio
Benzopirenos	Priridina
Benzatraceno	3-vinil-piridina
2-Naptilamina	N-nitrosodimetilamina
....	N-nitrosopirrolidina
	.....

### **1.3.2 Efectos del hábito de fumar sobre la piel**

La piel humana se ve expuesta a los efectos del humo del tabaco de una forma directa, por contacto del humo ambiental con la piel, e indirecta, por la llegada vía sanguínea de las sustancias tóxicas procedentes del humo del tabaco inhalado. En consecuencia, no es sorprendente que el tabaco ejerza múltiples y diversos efectos sobre la piel, la mayor parte de ellos nocivos. Aunque la repercusión de estas alteraciones cutáneas sobre la

supervivencia es mínima en comparación con la afección visceral antes mencionada, sí que conlleva una morbilidad significativa.

El conocimiento de los efectos del consumo de tabaco sobre la piel es importante por distintas razones. Primero, nos puede conducir a un mejor conocimiento del daño causado por el tabaco sobre este sistema en particular así como sobre otros órganos. La segunda razón se fundamenta en la gran preocupación por la estética corporal y facial que existe en la actualidad. Para muchos fumadores, la evidencia que el consumo de tabaco es responsable de la tinción de los dedos y de los dientes, así como de un aumento de las arrugas faciales, podría ser una razón para abandonar este hábito. Por otra parte, la existencia de unos trastornos asociados al hecho de fumar en un órgano visible como la piel, puede constituir un recordatorio continuo, visible y objetivable para los fumadores de los efectos secundarios que el consumo de tabaco produce también en otros órganos internos. En tercer lugar, el análisis de los efectos tóxicos del hábito de fumar sobre la piel podría abrir la puerta a un mayor conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de los mismos y, secundariamente, de las enfermedades y alteraciones que genera sobre los órganos internos. En este sentido, dado el fácil acceso que presenta la piel para cualquier estudio, el hallazgo de un paralelismo entre las alteraciones que el consumo de tabaco comporta sobre la piel y sobre el pulmón podría facilitar en gran medida el análisis y seguimiento de las ocurridas sobre el segundo.

### **1.3.2.1 Mecanismos fisiopatológicos**

El tabaco ejerce sus efectos nocivos sobre la piel a través de distintos mecanismos. Algunos de ellos son bien conocidos, como los descritos a continuación (Tabla IV), aunque probablemente existan otros muchos no identificados. Asimismo, la mayoría de

ellos son también responsables de los efectos nocivos que el hábito de fumar comporta sobre otros órganos y sistemas.

Tabla IV.- Mecanismos fisiopatogénicos del efecto del hábito de fumar sobre la piel

	<b>Efecto</b>	<b>Mecanismo</b>
Oxigenación tisular	Disminuye	-Vasoconstricción - del flujo sanguíneo -Inhibición competitiva de la unión del oxígeno con la hemoglobina por el CO -Inhibición del metabolismo oxidativo - de la viscosidad de la sangre -Desarrollo de enfermedad pulmonar obstructiva
Cicatrización	Disminuye	- de la oxigenación tisular -Inhibición de la síntesis de colágeno -Estimulación de la síntesis de chalonas
Respuesta inflamatoria	Controvertido	-Vasoconstricción - síntesis PGI <sub>2</sub> -Nicotina como factor quimiotáctico de neutrófilos
Metabolismo de las fibras elásticas	Elastosis y elastinólisis	- liberación de elastasa -Inactivación del inhibidor de la alfa1-proteinasa
Carcinogénesis	Aumenta	-Mutaciones del DNA -Mutaciones del gen supresor tumoral p53 -Inhibición enzimas reparadoras del DNA -Inhibición de las células <i>natural killer</i>
Sistema endocrino	Hipoestrogenismo	- secreción - metabolismo y excreción
Otros	Xerosis protección frente a radicales libres	-Deshidratación - niveles de vitamina C

### **Oxigenación tisular.**

El humo del tabaco provoca una disminución de la oxigenación tisular, incluyendo la piel, por distintas vías. En primer lugar, la nicotina provoca una vasoconstricción y una disminución del flujo de los vasos sanguíneos periféricos (Reus y cols., 1984; Van

Adrichem y cols., 1992). Este efecto es ejercido a través de una disminución de la producción de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (Nadler y cols., 1983), de un incremento de las concentraciones de vasopresina en plasma (Waeber y cols. 1984), y de la estimulación del sistema nervioso simpático, con liberación de catecolaminas (Cryer y cols. 1976). En segundo lugar, el monóxido de carbono, al tener una afinidad 200 veces mayor por la hemoglobina que el oxígeno, inhibe competitivamente la unión del oxígeno con la hemoglobina. En consecuencia, tiene lugar una disminución de la capacidad de transporte de oxígeno por la sangre y por tanto de la cantidad de oxígeno que llega a los tejidos periféricos. En tercer lugar, el cianuro de hidrógeno ejerce una inhibición de los sistemas enzimáticos necesarios para el metabolismo oxidativo y el transporte de oxígeno a las células (Silverstein, 1992). En cuarto lugar, el consumo de tabaco aumenta la viscosidad de la sangre a través de un incremento de la agregación de las plaquetas y del número de hematíes, los cuales presentan una disminución de su deformabilidad, y de una disminución de las concentraciones de plasminógeno en sangre (Dintenfass, 1975; Belch y cols., 1984). Por último, no hay que olvidar que el tabaco es el máximo responsable de la mayor parte de enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, hecho que de por sí ya comporta un cierto grado de hipoxemia e hipoxia.

### **Cicatrización.**

El consumo de tabaco conlleva una alteración de los procesos de cicatrización cutánea por distintos mecanismos: la disminución de la oxigenación tisular; la inhibición de la proliferación de los macrófagos y de los fibroblastos, con la subsiguiente inhibición de la síntesis de colágeno (Shervin y Gastwirth, 1990; Jorgensen y cols., 1998); y finalmente, a través de la estimulación de la liberación de catecolaminas, las cuales



actúan como cofactores en la formación de chalonas (sustancias inhibidoras del proceso de epitelización) (Mosely y cols., 1978).

### **Inflamación.**

Los efectos del tabaco sobre la respuesta inflamatoria en general y de la piel en particular son controvertidos. Por un lado, los individuos fumadores presentan una disminución de la respuesta inflamatoria tras la aplicación tópica de sustancias irritantes y rubefacientes, así como frente a la irradiación con UVB (Mills y cols., 1993a). Asimismo, los fumadores muestran una menor prevalencia de determinadas enfermedades inflamatorias tanto cutáneas (acné, rosácea), como viscerales (colitis ulcerosa, enfermedad de Graves) (Mills y cols., 1993b; Mills y cols., 1996; Silverstein y cols., 1994; Shine y cols., 1990). En contraposición, existen numerosos estudios en los que los pacientes fumadores muestran una mayor prevalencia de determinadas enfermedades inflamatorias, como la psoriasis (Mills y cols., 1992), la pustulosis palmoplantar (O'Doherty y Macintyre, 1985; Eriksson y cols., 1998), o la enfermedad de Crohn (Cottone y cols., 1994), entre otras.

Los mecanismos por los que los individuos fumadores presentan una alteración de la reactividad cutánea son múltiples, e incluyen una acción directa sobre la vascularización cutánea, sobre el metabolismo de las prostaglandinas y sobre la respuesta inmunológica. Algunas de estas acciones serían también responsables de la alteración de la respuesta inflamatoria en otros órganos y tejidos. Estos efectos serían debidos, al menos en parte, a la acción de la nicotina, aunque probablemente existan otras sustancias en el tabaco que pueden influir en la respuesta inflamatoria, y que de momento no han sido bien estudiadas (Mills y cols., 1997; Smith, 1997). La nicotina, como ya hemos visto, provoca una vasoconstricción de la circulación periférica, incluida la piel, a través de la

estimulación de la liberación de catecolaminas y de la inhibición de la síntesis de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (Mills y cols., 1993a; Nadler y cols., 1983). Igualmente, estudios *in vitro* han mostrado que la nicotina actuaría como factor quimiotáctico de los polimorfonucleares neutrófilos (Mills, 1998).

El tabaco provoca una alteración del equilibrio entre la elastasa y su mayor regulador, el inhibidor de la alfa1-proteinasa, con un incremento de la liberación del primero por los neutrófilos y los macrófagos y una inactivación por oxidación del segundo. Todo ello conlleva un incremento de la actividad de la elastasa neutrofilica en el ámbito sistémico, incluyendo la piel y el pulmón (Hind y cols., 1991; Weitz y cols., 1987). En este último, y como veremos más adelante, esta alteración es considerada uno de los principales mecanismos etiopatogénicos del enfisema relacionado con el consumo de tabaco (Hautamaki y cols., 1997; Ogushi y cols., 1991; Muley y cols., 1994).

### **Carcinogénesis.**

El humo del tabaco contiene más de 40 mutágenos y carcinógenos, de entre los que destacan las N-nitrosaminas, los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las aminas heterocíclicas. Aunque los mecanismos precisos a través de los cuales estas sustancias ejercen su actividad mutagénica y cancerígena no están bien establecidos, sí son conocidas sus acciones mutagénicas sobre el ADN a distintos niveles, sobre el gen supresor tumoral p53, así como el efecto inhibitor que ejercen sobre algunas enzimas implicadas en los mecanismos de reparación del ADN (Merimsky y Inbar, 1998).

Por otra parte, la actividad de las células *natural killer* está inhibida en los pacientes fumadores respecto a los no fumadores (Goud y Kaplan, 1999). Esta disminución en la inmunovigilancia constituiría otro factor patogénico en el desarrollo de neoplasias en estos pacientes.

**Sistema endocrino.**

Las principales repercusiones cutáneas de los efectos del humo del tabaco sobre el sistema endocrino son secundarias a la alteración del metabolismo de las hormonas sexuales. El consumo de tabaco comporta una disminución en la secreción de estrógenos e incrementa su metabolismo y excreción, con el subsiguiente hipoestrogenismo relativo. En las mujeres fumadoras, este hecho podría estar asociado con una mayor sequedad y atrofia cutánea, similar a la observada tras la menopausia (Frances, 1992).

**Otros.**

Los pacientes fumadores presentan un grado de hidratación de la piel inferior al de los pacientes no fumadores (Wolf, 1992). También se ha demostrado que el tabaco disminuye la concentración de vitamina C y en consecuencia la capacidad de protección frente a los radicales libres (Frances, 1993).

**1.3.3 Efectos del hábito de fumar sobre el pulmón: enfermedad pulmonar obstructiva crónica**

Al igual que ocurre con la piel, los pulmones se hallan expuestos al humo del tabaco tanto de una forma directa, por la toxicidad del humo inhalado sobre la mucosa de las vías respiratorias, como indirecta, por la llegada vía sanguínea de los tóxicos absorbidos. Por estos motivos, el pulmón es uno de los órganos de la economía donde más repercuten los efectos nocivos del hábito de fumar. En este sentido, el hábito de fumar es la mayor causa de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), esto es, de enfisema pulmonar y de bronquitis crónica: alrededor del 85% de la mortalidad y morbilidad por EPOC es atribuible al consumo de tabaco. Existe una relación dosis-

respuesta entre el número de muertes por EPOC y el consumo de tabaco. Los individuos fumadores presentan una mortalidad secundaria a EPOC de 4 a 25 veces superior que los no fumadores. Asimismo, el cáncer de pulmón, principal causa de muerte por cáncer, es directamente atribuible al hábito de fumar en un 90% de casos en varones y en un 79% en mujeres (Skurnik y Shoenfeld, 1998).

### **1.3.3.1 Tabaco y función pulmonar**

El fumar cigarrillos conduce a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica por aceleración de la disminución natural de la función pulmonar en adultos: los individuos fumadores muestran un descenso acelerado dependiente de la dosis del FEV1 (volumen espiratorio forzado en 1 segundo). Por término medio, los fumadores experimentan una disminución del FEV1 de 10 a 20 ml/año superior a los no fumadores. Con los años, este exceso de disminución es suficiente para dar lugar a una obstrucción sintomática del flujo aéreo, con las características clínicas de la EPOC (Skurnik y Shoenfeld, 1998). No parecen existir diferencias significativas en la disminución de FEV1 entre los fumadores de cigarrillos con filtro y sin filtro (Lange y cols., 1990).

La disminución del FEV1 secundaria al hábito de fumar, con el consiguiente desarrollo de EPOC, es secundaria a distintos mecanismos según la edad del individuo: durante la adolescencia, el fumar disminuye la velocidad de crecimiento del FEV1, lo cual conlleva que el FEV1 máximo alcanzado sea menor; posteriormente, acorta la fase de meseta con inicio prematuro del descenso de FEV1; y finalmente, acelera el descenso del FEV1 en la edad adulta y vejez (Samet y Lange, 1996).

El cese del hábito de fumar tiene un efecto beneficioso sobre el FEV1. Estudios longitudinales han mostrado que la disminución del FEV1 regresa a los niveles experimentados por los no fumadores. Sin embargo, el FEV1 nunca volverá a la

normalidad, debido a la reducción ocurrida durante el periodo de fumador. Estos efectos beneficiosos del cese de fumar son particularmente pronunciados en los individuos jóvenes, mientras que en los grandes fumadores con grave disminución del FEV1 son prácticamente inapreciables (Fletcher y Peto, 1977).

El hábito de fumar da lugar a una respuesta inflamatoria en las vías aéreas de todos los fumadores; sin embargo, solo un porcentaje de ellos desarrollaran obstrucción de estas vías. Desde el punto de vista funcional, Hogg y cols. (Hogg y cols., 1994) hallaron que únicamente un 46% de los grandes fumadores (promedio de 52 paquetes-año) presentaban un FEV1<80%, y en sólo un 5% de los casos el FEV1 era <50%. Por su parte, y desde un punto de vista anatomopatológico, Auerbach y cols. (Auerbach y cols., 1972) analizaron secciones pulmonares enteras procedentes de pulmones obtenidos por autopsia de 1443 hombres y 388 mujeres, y hallaron que solamente el 52% de los fumadores de más de 20 cig/día presentaban un enfisema moderado o grave. Estos hechos llevaron a la introducción hace unas décadas del concepto de “fumador susceptible”. La anormal distribución del descenso del FEV1 entre los individuos fumadores llevó a plantear la hipótesis que debían existir factores aún desconocidos inherentes al individuo que determinarían el grado de deterioro. El único factor bien establecido es el déficit de alfa-1-antitripsina, aunque éste sólo afecta a una minoría de fumadores susceptibles. Han sido propuestos otros posibles factores responsables de esta susceptibilidad, como las infecciones pulmonares durante la infancia y las alteraciones cuantitativas de las enzimas proteolíticas leucocitarias, aunque no existen estudios al respecto que los corroboren (Fletcher y Peto, 1977). Estudios recientes de cohortes con un largo período de seguimiento, en una población de hombres no asmáticos de edades comprendidas entre los 41 y los 86 años, muestran que la existencia de una hiperreactividad de las vías aéreas (demostrada con el test de la

metacolina) constituye un factor predictivo positivo del grado de disminución de la función pulmonar. En este sentido, una inflamación crónica de las vías aéreas, como la inducida por el humo del tabaco, comportaría un incremento de la hiperreactividad bronquial y secundariamente un aceleramiento de la pérdida de la función pulmonar (O'Connor y cols., 1995).

### **1.3.3.2 Fisiopatología de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica**

La disminución del FEV1 secundaria al hábito de fumar puede ser parcialmente explicada por una pérdida de la capacidad de recuperación del tejido elástico pulmonar. Aunque el hábito de fumar comporta alteraciones tanto macroscópicas como microscópicas de la estructura pulmonar, esta pérdida de la elasticidad parece estar más relacionada con el incremento microscópico del tamaño de los espacios aéreos que con el grado de destrucción pulmonar visible macroscópicamente (Hogg y cols., 1994; Auerbach y cols., 1972).

Los mecanismos específicos a través de los cuales el consumo de tabaco conlleva esta pérdida de la elasticidad pulmonar no están aún completamente definidos, aunque sí se conocen algunos aspectos (tabla V). El humo del tabaco ejerce una acción tóxica directa sobre las células epiteliales de las vías respiratorias bajas, fundamentalmente a través de la acción oxidativa que presentan algunos de sus componentes. Por otra parte, las vías respiratorias bajas de los pacientes fumadores presentan un incremento de la actividad proteolítica, la cual es en parte secundaria a la acción que ejerce el humo del tabaco sobre las células inflamatorias y sus enzimas. Distintos estudios han mostrado que el humo del tabaco incrementa la carga de neutrófilos y de monocitos en los alvéolos; incrementa la actividad y la liberación de elastasa por los neutrófilos; inactiva el alfa-1-inhibidor de la proteinasa (alfa-1-antitripsina), principal regulador de la elastasa

neutrofílica; y finalmente, incrementa la liberación de elastasa por los macrófagos, la cual tiene también una actividad inhibitoria de la alfa-1-antitripsina. Todo ello conlleva un desequilibrio en los alvéolos entre la actividad de las enzimas proteolíticas y la de las antiproteolíticas, con un incremento de la vulnerabilidad del pulmón a la elastinólisis, la cual determina una destrucción del tejido pulmonar (Weitz y cols., 1987; Morrison D, y cols., 1998; Ogushi y cols., 1991; Blue y Hanoff, 1978; Hautamaki y cols., 1997; McCusker, 1992). Por otra parte, es sabido que la degradación de la elastina actúa de estímulo para su propia síntesis; así, en el enfisema experimental inducido por instilación intratraqueal de elastasa pancreática, se observa un marcado aumento en la síntesis de elastina a los pocos días de la lesión. Sin embargo, en esta resíntesis del tejido conectivo pulmonar la arquitectura normal del pulmón no se mantiene preservada (Sandberg y cols., 1981; Osman y cols., 1985). También en este sentido, un paso clave en la síntesis de la elastina es el entrecruzamiento de la molécula de tropoelastina, catalizado por la enzima lisil-oxidasa. Estudios *in vitro* muestran que el humo del tabaco parece que inhibiría la síntesis de elastina en los pulmones a través del bloqueo del proceso de entrecruzamiento. Esta inhibición sería secundaria más a una acción directa sobre los sustratos (elastina, tropoelastina) que sobre la lisil-oxidasa (Laurent y cols., 1983).

Como conclusión, parece ser que el incremento de la actividad proteolítica junto con una disminución de la capacidad antiproteolítica y de síntesis de nueva elastina en el tejido pulmonar constituyen tres mecanismos responsables de la destrucción alveolar que presentan los individuos fumadores con enfisema.

Tabla V.- Mecanismos fisiopatológicos del efecto del hábito de fumar sobre la EPOC

	<b>Efecto</b>	<b>Mecanismo</b>
Células epiteliales alveolares	oxidación	Radicales libres del humo del tabaco
Celularidad alveolar	aumenta	Reclutamiento de neutrófilos, monocitos y macrófagos
Actividad proteolítica	aumenta	la actividad de elastasa neutrofílica la liberación de elastasa neutrofílica la liberación de elastasa por los macrófagos
Actividad anti-proteolítica	disminuye	Inhibición directa de la alfa-1-antitripsina Inhibición de la alfa-1-antitripsina a través de la acción de la elastasa liberada por los macrófagos
Síntesis de elastina	disminuye	Bloqueo del proceso de entrecruzamiento de la molécula de tropoelastina
Parénquima pulmonar	disminuye, altera la estructura	síntesis y degradación de la elastina Síntesis de nueva elastina sin preservación de la arquitectura pulmonar



## **1.4 EL HÁBITO DE FUMAR Y LAS ARRUGAS FACIALES**

Hoy en día las arrugas faciales son consideradas uno de los marcadores más significativos de envejecimiento cutáneo. Su desarrollo está influenciado por múltiples factores interactivos, como la edad cronológica, la base genética, la exposición solar, la toxicidad de factores ambientales, la nutrición, las enfermedades, el consumo de esteroides y las fuerzas mecánicas. En los últimos años han sido publicados distintos estudios que analizan el posible papel del hábito de fumar en el desarrollo de las arrugas faciales.

### **1.4.1 Estudios epidemiológicos**

En 1856 Solly (Solly, 1856) observó, en una amplia serie de sujetos británicos sometidos a una revisión médica para conseguir una póliza de seguros, que los individuos fumadores se caracterizaban por tener una tez amarillenta y con arrugas pronunciadas. Desde esta observación inicial y hasta nuestros días, han sido llevados a cabo distintos estudios epidemiológicos que han intentado determinar la verdadera asociación entre el hábito de fumar y el desarrollo de arrugas faciales (Ippen y Ippen, 1965; Daniell, 1971; Model, 1985; Kadunce y cols., 1991; Schnohr y cols., 1991; Joffe, 1991; Grady y Ernster, 1992; Davis y Koh, 1992; Ernster y cols., 1995; O'Hare y cols., 1999, Aizen y Gilhar, 2001). Todos ellos han sido estudios epidemiológicos observacionales, descriptivos de tipo transversal. En todos ellos se analizan los cambios que presenta la piel de la cara de los individuos fumadores respecto a la de los no fumadores, y se intenta establecer su independencia de otros factores como la edad, el sexo y la exposición solar, entre otros.

Una limitación común que presentan todos estos estudios viene dada por la subjetividad y difícil cuantificación de la variable “grado de exposición solar”. Además, la metodología empleada en algunos de ellos es cuestionable, tanto en lo que se refiere al conocimiento por parte del observador del hábito tabáquico de la persona analizada (estudio no ciego) como a la no inclusión de algunos factores de confusión en el análisis final. Por otra parte, la comparación de resultados entre ellos entraña una gran dificultad, debido a que usan distintos diseños y metodologías, términos ambiguos y valoraciones subjetivas. A pesar de todo, de forma global se pueden deducir una serie de conclusiones generales, que desarrollamos a continuación.

El tabaco parece que por sí solo no sería capaz de modificar el aspecto macroscópico de la piel, lo que se deduce en base al hecho de que los individuos fumadores de raza blanca presentan una piel aparentemente normal en las zonas no fotoexpuestas, y los de raza negra tanto en las zonas fotoexpuestas como en las no fotoexpuestas (O’Hare y cols., 1999; Allen y cols., 1973). Sin embargo, el consumo de tabaco actuaría potenciando enormemente los efectos de la radiación solar sobre el envejecimiento cronológico de la piel (Frances, 1992). Estos efectos del consumo de tabaco sobre las arrugas faciales parecen no hacerse evidentes hasta la edad media de la vida: las arrugas faciales son raras tanto en fumadores como en no fumadores antes de los 39 años. Por otra parte, entre los fumadores, el riesgo relativo para el desarrollo de arrugas parece ser mayor en las mujeres que en los hombres, y aparecería a partir de un consumo de tabaco de 10 paquetes-año en las mujeres y de 20 paquetes-año en los hombres (Ernster y cols., 1995). Asimismo, el riesgo de desarrollar excesivas arrugas faciales es dependiente del número de paquetes-año de tabaco consumidos (Kadunce y cols., 1991, Ernster y cols., 1995); sin embargo, sólo un 27,5% de los grandes fumadores (consumo superior a 50

paquetes-año) presentan una tez especialmente arrugada (Kadunce y cols., 1991; O'Hare y cols., 1999).

## **1.4.2 Consideraciones patogénicas**

A pesar de los distintos estudio epidemiológicos existentes que ponen en evidencia el desarrollo prematuro de arrugas faciales en los individuos fumadores, los mecanismos patogénicos responsables de este proceso aún no han sido bien elucidados (Ribera y Ferrándiz, 1994). Probablemente, el hábito de fumar ejerce sus efectos nocivos sobre la piel a través de diversas vías interactivas de las cuales sólo algunas son conocidas. Además de los mecanismos fisiopatológicos generales por los que el tabaco ejerce sus efectos nocivos sobre la piel, y que han sido revisados en el apartado 1.3.2.1, existen otros más específicos, como los que se describen a continuación, que podrían intervenir en el desarrollo precoz de arrugas faciales que presentan los individuos fumadores.

Como ocurre en el tracto respiratorio, los componentes tóxicos del humo del tabaco pueden actuar sobre la piel bien directamente como irritantes de la epidermis, o bien indirectamente tanto sobre la dermis como la epidermis a través de la circulación sanguínea.

### **1.4.2.1 Toxicidad directa sobre la piel**

Los individuos fumadores presentan una disminución del grado de hidratación del estrato córneo de la cara, lo cual contribuye en los cambios físicos que presenta la piel de esta región, entre ellos el mayor desarrollo de arrugas faciales (Wolf, 1992). Esta disminución de la hidratación del estrato córneo de la cara parece ser debida a un efecto tóxico directo del humo del tabaco.

Por otra parte, distintos estudios muestran que la producción de elastosis cutánea es un marcador tanto de daño actínico como térmico. En este sentido, la exposición experimental de animales de laboratorio a la radiación infrarroja aislada conllevó un incremento del número y grosor de las fibras elásticas similar al hallado en la elastosis solar. Asimismo, ha sido descrito un agravamiento de la elastosis en individuos expuestos en su medio laboral a una fuente de calor, como es el caso de los panaderos, los bomberos y los sopladores de cristal. En base a ello, la exposición continua a una fuente de calor, como podría ser un cigarrillo encendido, podría jugar un papel en el incremento de la elastosis que hallamos en la piel de los individuos fumadores (Kligman y Kligman, 1984; Kligman, 1982; Boyd y cols., 1999).

#### **1.4.2.2 Factores mecánicos**

El posible papel de los factores mecánicos no ha sido bien documentado. Se ha propuesto que la posición de los labios durante el acto de fumar, junto con el “fruncimiento del ceño” secundario al efecto irritativo del humo sobre los ojos, contribuirían al mayor desarrollo de arrugas alrededor de la boca y en el canto externo de los ojos, respectivamente. Si el papel de estos factores fuera importante, tanto los fumadores blancos como los negros deberían tener un número similar de arrugas verticales periorales, lo cual no ha sido observado. Además, no han sido descritas arrugas de las mismas características en aquellos individuos que realizan contracciones regulares de los músculos faciales, como los flautistas y los trompetistas. A pesar de todo, no podemos descartar que estos factores tengan un papel en la formación de las arrugas periorales (Lapiere y Pierard, 1987; Frances, 1998).

### **1.4.2.3 Predisposición genética**

La existencia de una sensibilidad genética al humo del tabaco para el desarrollo de arrugas faciales parece bastante probable. Existen familias con una gran predisposición para su desarrollo, mientras que otras apenas las presentan aún cuando sus miembros sean grandes fumadores con una exposición solar prolongada (Frances, 1992). En este sentido, Kadunce y cols. (Kadunce y cols., 1991) hallaron que sólo un 27% de los fumadores de más de 50 paquetes-año presentaban arrugas faciales intensas. De forma similar, aunque la relación entre el hábito de fumar y el enfisema pulmonar está ampliamente aceptada, menos del 50% de los fumadores desarrollarán esta enfermedad (Hogg y cols., 1994).

### **1.4.2.4 Elastosis del fumador**

Como hemos visto, el humo del tabaco produce alteraciones en las fibras elásticas y colágenas del tejido pulmonar, responsables del desarrollo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. En este sentido, no sería de extrañar que también actuara sobre las fibras elásticas de la piel por mecanismos similares. Además, podríamos pensar que los cambios clínicos de la piel que presentan estos pacientes, incluyendo las arrugas prominentes, son debidos a estas alteraciones de las fibras elásticas de la dermis. Las anomalías específicas que el consumo de tabaco provoca en las fibras elásticas de la dermis serán analizados en el próximo apartado.

### **1.4.2.5 Factores hormonales**

Es bien conocido que los estrógenos ejercen sobre la piel distintos efectos fisiológicos. En este sentido, la deprivación de estrógenos propia de la menopausia conlleva distintos cambios en la piel, como la sequedad cutánea, la disminución del

colágeno y la atrofia (Bologna y cols., 1989; Bincat y cols., 1985). Por otra parte, y como ya hemos visto, el humo del tabaco ejerce una actividad antiestrogénica. En conclusión, la mayor susceptibilidad que presentan las mujeres para el desarrollo de arrugas faciales secundarias al hábito de fumar, como se desprende del artículo de Ernster y cols. (Ernster y cols., 1995), podría ser explicada por este mecanismo.

#### **1.4.2.6 Toxicidad de los radicales libres**

El humo del tabaco estimula la producción de iones superóxidos por los polimorfonucleares neutrófilos, los cuales son parcialmente neutralizados por distintas enzimas y por captadores de radicales libres como la vitamina C. Las enzimas que intervienen en la degradación de estos radicales libres son principalmente intracelulares. En consecuencia, las proteínas extracelulares del tejido conectivo de la dermis, al carecer de estas enzimas protectoras, son particularmente susceptibles a sus efectos tóxicos. La distribución de estos radicales libres por la circulación sanguínea podría explicar, al menos en parte, el hecho que las alteraciones de las fibras elásticas secundarias al hábito de fumar se localicen en la dermis media y profunda, a diferencia de la elastosis solar, en la cual se afectan las capas más superficiales (Frances, 1992; Frances, 1993).

#### **1.4.3 Efectos del consumo de tabaco sobre las fibras elásticas de la piel**

Con la finalidad de hallar un substrato histopatológico que ayude a explicar el desarrollo precoz de arrugas faciales en los individuos fumadores, se han analizado en distintos estudios los efectos que el humo del tabaco ejerce sobre las fibras elásticas de la piel procedente tanto de zonas fotoexpuestas (Boyd y cols., 1999) como no fotoexpuestas (Frances y cols., 1991; Lister y cols., 1999).

En todos ellos, el estudio histológico mediante morfometría de las fibras elásticas de la dermis reticular puso de manifiesto que la piel de los individuos fumadores, con un consumo medio que oscila entre los 42 y los 51 paq-año según el estudio, presentaban un incremento en el área ocupada por estas fibras elásticas respecto a la de los no fumadores. Frances y cols. (Frances y cols., 1991) determinaron además que este incremento era de alrededor del 100%, y secundario a un aumento en el número, grosor y también a una mayor fragmentación de estas fibras elásticas. No se pudo demostrar la existencia de un efecto dosis del consumo de tabaco sobre estas fibras elásticas (Lister y cols., 1999). Respecto a las fibras elásticas de la dermis papilar (fibras oxitalánicas y eláunicas), no se hallaron diferencias significativas entre fumadores y no fumadores (Frances y cols., 1991). Estos cambios son parecidos a los secundarios a la exposición solar aunque, a diferencia de ésta, la red de fibras elásticas papilares es normal, sin zona grenz; el grosor de la dermis se halla disminuido, mientras que en la elastosis solar aumenta; y son de menor intensidad, sin degeneración ni desorganización en masas amorfas. Esta localización profunda en la dermis de las alteraciones de las fibras elásticas inducidas por el tabaco serían explicadas al menos en parte por la distribución sanguínea de las sustancias tóxicas que contiene.

Frances y cols. (Frances y cols., 1991) analizaron además las características inmunohistoquímicas de este tejido elástico de la dermis mediante los anticuerpos antielastina, anticomponente P-amiloide, HB8 y antifibronectina. Con los anticuerpos antielastina, anticomponente P- amiloide y HB8, no se observaron cambios en el tejido elástico superficial entre fumadores y no fumadores, en correlación con lo hallado en los estudio morfométricos. Las fibras elásticas verticales superficiales pudieron ser claramente visualizadas con los anticuerpos antielastina tanto en los controles como en los fumadores. Sin embargo, hallaron importantes variaciones individuales en ambos

grupos e incluso entre una papila dérmica y otra de un mismo individuo. En cambio, el tejido elástico profundo de los fumadores presentaba una apariencia modificada respecto al de los controles, con numerosas fibras elásticas más cortas y anchas. Estas fibras alteradas se teñían menos intensamente con los distintos anticuerpos utilizados, lo que podría indicar que tanto la elastina como el componente microfibrilar de las fibras elásticas podían ser anormales (como ocurre en la elastosis solar). En relación con la inmunotinción con el anticuerpo antifibronectina, estos autores hallaron que esta glicoproteína se dispone formando una banda ancha continua cerca de la unión dermoepidérmica, la cual es aproximadamente dos veces más gruesa en los fumadores que en los no fumadores. Un incremento similar en la inmunotinción para la fibronectina la hallamos en los distintos procesos relacionados con el envejecimiento de la piel, como el envejecimiento intrínseco, la diabetes mellitus y la irradiación solar.

#### **1.4.4 Arrugas faciales y función pulmonar**

Los efectos nocivos que el humo del tabaco ejerce tanto sobre las arrugas faciales como sobre la función pulmonar son bien conocidos hoy en día. En este sentido, algunos autores han planteado la posibilidad de que los cambios inducidos por el tabaco sobre el colágeno y las fibras elásticas de la piel y del pulmón puedan jugar un papel en la patogénesis tanto de las arrugas faciales como de la enfermedad pulmonar obstructiva, respectivamente (Kadunce y cols., 1991). Para probar esta hipótesis, Lange y Schnohr (Lange y Schnohr, 1994) llevaron a cabo un estudio epidemiológico, observacional y descriptivo de tipo transversal que analizó si el incremento de las arrugas faciales, especialmente en los fumadores, se hallaba relacionado con la presencia de un deterioro de la función pulmonar. En condiciones normales, con la edad se produce un incremento progresivo de las arrugas faciales y una disminución de la



relación FEV1/FVC%. En esta línea, estos autores hallaron que la prevalencia de arrugas faciales prominentes era mayor en aquellos individuos con limitación del flujo aéreo que en los que no; y viceversa, que los individuos con arrugas faciales prominentes presentaban una relación FEV1/FVC% ligeramente inferior a la de los individuos con arrugas faciales menos intensas. Mediante un análisis de regresión múltiple que incluía los individuos fumadores y exfumadores, y después de controlar por la edad, hallaron que los individuos con arrugas faciales prominentes presentaban un promedio de FEV1/FVC% 1,2-1,9% inferior al de los sujetos con menor grado de arrugas faciales. Esta asociación no fue observada entre los no fumadores. En base a estos resultados, los autores concluyen que el incremento en el desarrollo de arrugas faciales es independiente de la edad cuando se asocia a una limitación del flujo aéreo en fumadores, pero no en no fumadores. Esta asociación es, sin embargo, pequeña, y no permite identificar a aquellos fumadores con alto riesgo para el desarrollo de enfermedad pulmonar obstructiva a través de la valoración de sus arrugas faciales.

## **2 OBJETIVOS DEL ESTUDIO.**

## 2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

El **objetivo principal** de este estudio es definir las alteraciones cuantitativas y cualitativas de las fibras elásticas de la piel inducidas por la inhalación del humo del tabaco, así como establecer un paralelismo entre las variaciones de las fibras elásticas de la piel y las alteraciones de la función pulmonar. Este objetivo lo podemos desglosar en los siguientes objetivos específicos:

### **Objetivos específicos:**

1. Estudiar las alteraciones cuantitativas que el hábito de fumar ejerce sobre las fibras elásticas de la piel mediante morfometría estática.
2. Estudiar las alteraciones cualitativas que el hábito de fumar ejerce sobre los distintos componentes de las fibras elásticas de la piel mediante técnicas de inmunohistoquímica.
3. Analizar si las alteraciones de las fibras elásticas de la piel secundarias al humo del tabaco son dependientes de la dosis.
4. Observar si el abandono del hábito de fumar se correlaciona con una mejoría o estabilización del proceso de deterioro de las fibras elásticas de la piel.
5. Analizar si existe un paralelismo entre las alteraciones de las fibras elásticas de la piel y el grado de deterioro de la función pulmonar inducidos por el consumo de tabaco.
6. Analizar si existe un paralelismo entre las alteraciones de las fibras elásticas de la piel y el grado de deterioro de la función pulmonar, con independencia del consumo de tabaco.

### **3 PACIENTES Y MÉTODO.**

### **3. PACIENTES Y MÉTODO**

Estudio epidemiológico observacional descriptivo de tipo transversal en el que se estudian diferentes parámetros clínicos, microscópicos (morfométricos e inmunohistoquímicos) y de función pulmonar en pacientes fumadores y no fumadores. Los resultados de los dos grupos se comparan con el objeto de probar las hipótesis planteadas.

#### **3.1 PACIENTES**

Entre 1995 y 1997 se recogieron un total de 78 pacientes consecutivos procedentes de las Consultas Externas de Dermatología y de la Unidad de Pruebas Funcionales Respiratorias (PFR) del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona. En Dermatología, los individuos eran escogidos de entre los que acudían a la consulta por distintos problemas dermatológicos, y que eran remitidos por su dermatólogo de zona o desde el servicio de urgencias. Tras obtener el correspondiente consentimiento informado, mediante un cuestionario se recogían sus datos personales, el fototipo, el grado de exposición solar, el uso de fotoprotectores, los antecedentes patológicos, los tratamientos que realizaba o había realizado, el consumo de corticoides tanto inhalados como por vía oral o endovenosa, el hábito tabáquico, así como el peso y la talla. Los pacientes que presentaban alguno de los criterios de exclusión (ver a continuación) eran descartados del estudio. Posteriormente, se procedía a practicar una biopsia mediante *punch* de 4mm de diámetro de una área de piel no expuesta a las radiaciones ultravioletas. Finalmente, eran remitidos al Servicio de Neumología para llevar a cabo las pruebas de función respiratoria. En el caso de los pacientes procedentes de la Unidad

de PFR, estos eran incluidos sucesivamente de entre los que acudían a esa Unidad procedentes de las consultas externas de neumología o del neumólogo de zona. Una vez realizados los correspondientes estudios de función pulmonar, eran remitidos al Servicio de Dermatología donde se procedía como se ha descrito anteriormente.

### **3.1.1 Criterios de exclusión**

Los criterios de exclusión quedan recogidos en la tabla VI. Dado el escaso número de individuos del sexo femenino reclutados que se observó al realizar un primer análisis de la muestra, cuando  $n=40$ , se decidió centrar el estudio en los individuos del sexo masculino. También fue un factor de exclusión la presencia de anomalías macroscópicas en la cara interna de ambos brazos, como por ejemplo la existencia de heridas recientes, de cicatrices o de estrías, que impidieran la toma correcta de una biopsia de piel aparentemente sana. Los pacientes fumadores de puros o en pipa fueron excluidos del estudio debido a la falta de precisión que presentaban a la hora de cuantificar el consumo de tabaco. En cuanto a la edad, la degeneración de las fibras elásticas de la piel suele iniciarse alrededor de los 30 años, mientras que el desarrollo de arrugas faciales no suele hacerse evidente antes de los 40 años. A partir de los 70 la degeneración de las fibras elásticas de la piel se hace mucho más marcada (Ernster, 1995, Braverman y Fonferko, 1982). Por todo ello, nos hemos centrado en individuos de 40 a 70 años a fin de obtener un grupo homogéneo y evitar posibles sesgos tanto por edades muy precoces como muy avanzadas, en la misma línea que el resto de estudios llevados a cabo sobre los efectos del consumo de tabaco sobre la piel y que han sido comentados en la introducción. A fin de evitar un posible sesgo debido a la existencia de mayor o menor tensión sobre las fibras elásticas de la piel y secundariamente una mayor fragmentación de las mismas, se excluyeron aquellos individuos con un índice de masa corporal (IMC

= peso (Kg) / talla<sup>2</sup> (metros)) superior a 40 (obesidad mórbida). Asimismo, se excluyeron del estudio todos aquellos individuos que presentaban enfermedades o recibían o habían recibido tratamientos que podían alterar las fibras elásticas de la piel.

Tabla VI.- Criterios de exclusión

<ul style="list-style-type: none"> <li>-Sexo femenino</li> <li>-Fumadores de puros o en pipa</li> <li>-Menores de 40 años y mayores de 70 años</li> <li>-Índice de masa corporal superior a 40</li> <li>-Presencia de alteraciones macroscópicas en la cara interna de ambos brazos</li> <li>-Enfermedades del tejido conectivo así como aquellas que puedan modificar la estructura de la dermis en general y de las fibras elásticas en particular</li> <li>-Pacientes con déficit de alfa1-antitripsina</li> <li>-Haber recibido o estar recibiendo tratamiento con rayos ultravioletas</li> <li>-Haber recibido o estar recibiendo tratamiento con fármacos que pueden interferir en el metabolismo del tejido elástico, como D-penicilamina, colquicina, metotrexato</li> </ul>
--

## 3.2 MÉTODO

### 3.2.1 Definición de las variables clínicas estudiadas

#### 3.2.1.1 Fototipo

La valoración del fototipo se estableció, siguiendo la metodología estándar, en base a la respuesta de la piel tras exposición a la luz solar del medio día durante 45 minutos (Tabla VII). La totalidad de los pacientes quedó distribuida entre los fototipos II (30 pacientes), III (55 pacientes) y IV (7 pacientes).

Tabla VII.- Definición de los fototipos

<b>Fototipo</b>	<b>Eritema-bronceado</b>
I	Siempre se queman y nunca se pigmentan
II	Siempre se queman y se pigmentan ligeramente
III	A veces se queman y siempre se pigmentan
IV	Nunca se queman y siempre se pigmentan
V	Razas pigmentadas
VI	Raza negra

### 3.2.1.2 Consumo de tabaco

Mediante un cuestionario, se recogieron los datos sobre el hábito tabáquico actual y el historial de fumador. No se hizo distinción entre los fumadores de cigarrillos con filtro y sin filtro, puesto que según el estudio de Lange y cols. (Lange y cols, 1990) no existen diferencias significativas en la disminución del FEV1 entre ambos grupos.

Los pacientes fueron clasificados en tres categorías principales según el hábito tabáquico que presentaban en ese momento: no fumador, exfumador y fumador activo. Se consideró no fumador al individuo que nunca había fumado o había fumado menos de 150 cigarrillos durante toda la vida. Como fumadores activos se incluyeron los que habían estado fumando de forma habitual en el curso de los 6 meses previos; y como exfumadores aquellos fumadores habituales que habían cesado el consumo hacía 6 meses o más. Fumadores y exfumadores fueron subclasificados en poco fumadores (menos de 10 cigarrillos al día), fumadores medios (de 10 a 29 cigarrillos al día), y grandes fumadores (30 o más cigarrillos al día). Asimismo, tanto para los fumadores como para los exfumadores se calculó el número de paquetes-año fumados (promedio de paquetes al día multiplicado por el número de años de fumador).



### 3.2.1.3 Consumo de corticoides

Respecto a consumo de corticoides, se procedió a diferenciar entre consumo de corticoides sistémicos (por vía oral o endovenosa), y consumo por vía inhalatoria. El consumo de corticoides sistémicos fue recogido como una variable dicotómica, y se consideró que un paciente era consumidor cuando había recibido tratamiento durante al menos tres meses a lo largo de su vida, y no consumidor el resto. El consumo de corticoides por vía inhalatoria fue recogido, por una parte, también como una variable dicotómica, y se consideró que un paciente era consumidor cuando había recibido tratamiento durante al menos tres meses a lo largo de su vida, y no consumidor el resto. Por otra parte, los pacientes consumidores fueron a su vez divididos en consumidores de dosis bajas de corticoides inhalados (hasta 800  $\mu\text{g}/\text{día}$ ) y consumidores de dosis altas (más de 800  $\mu\text{g}/\text{día}$ ).

Todos los pacientes consumidores de corticoides inhalados utilizaban la marca comercial Pulmicort aerosol (budesonida 200 $\mu\text{g}$  por dosis). Ninguno de los pacientes presentó un consumo superior a 1600 $\mu\text{g}/\text{día}$ , dosis a partir de la cual pueden causar supresión del eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal (Hanania y cols., 1995).

Los consumidores de corticoides inhalados que también eran consumidores de corticoides sistémicos fueron incluidos en el grupo de consumidores de corticoides sistémicos.

### 3.2.2 Biopsia cutánea

A todos los pacientes se les practicó una biopsia cutánea de la cara interna del brazo derecho (zona no expuesta a los rayos UV) mediante *punch* de 4 mm de diámetro. En el caso que existiera alguna alteración macroscópica (heridas recientes, cicatrices, estrías, etc.) en esa localización, las biopsias eran tomadas de la cara interna del brazo

izquierdo. La pieza de biopsia fue inmediatamente fijada en formalina al 10% y posteriormente incluida en parafina.

### **3.2.3 Análisis morfométrico (morfometría estática) de las fibras elásticas**

Una sección de 3 micras de la muestra obtenida con el *punch* fijada en formalina e incluida en parafina fue teñida con orceína (como se describe en el siguiente apartado), y sobre la muestra así teñida se llevaron a cabo los distintos análisis de morfometría estática.

Las biopsias teñidas con orceína muestran las fibras elásticas, tanto superficiales como profundas, teñidas de un color marrón-rojizo intenso sobre un fondo beige-rosado. Esta tinción aporta un contraste suficiente para poder llevar a cabo el proceso de discriminación interactiva (delimitación de las fibras elásticas y eliminación del fondo) con una gran precisión, y secundariamente, conseguir unas lecturas morfométricas más exactas.

#### **3.2.3.1 Tinción con orceína**

Se incubó el corte de 3 micras con una solución de orceína (ver a continuación) durante 1 hora. Tras lavar con agua destilada y deshidratar con etanol de grado creciente, fue decolorado con ácido clorhídrico al 1% en etanol 70° durante unos segundos y lavado de nuevo con agua durante 5 minutos. Finalmente, se procedió a deshidratar y montar con DPX.

##### Solución de orceína:

Orceína	1 gramo
Alcohol 70°	100 ml
Añadir ácido clorhídrico	0,6 ml

### 3.2.3.2 Morfometría estática

Todas las preparaciones fueron evaluadas por la misma persona en ausencia de cualquier información clínica. Para todas las lecturas morfométricas llevadas a cabo se mantuvieron constantes las condiciones de iluminación ambiental, la intensidad de iluminación y el diafragma del microscopio, así como el brillo y contraste del monitor.

El equipo de morfometría estática empleado fue el "Sistema de Proceso digital y Analítica de Imagen" basado en IMCO10 (Kontron Bildanalyse, Alemania) y MICROM IP (Microm España, S.A.), compuesto por: procesador central de 32 bits Intel 80386 + Intel 80387 para coprocesamiento matemático a 20Mhz; monitor de salida de datos de 15" de 800x600 pixels en modo EGA; procesador de Imagen Frame Grabber de triple capacidad de conversión analógica-digital-analógica con monitor de 21" de 600x800 pixels y unidad digitalizadora interactiva con tablero y ratón; microscopio modelo Jenaval (Carl Zeiss/Jena, Alemania); cámara TV color Hitachi KP-C503 y impresora láser para datos LaserjetIIIp. El software utilizado fue el MIP – Sistema de Proceso Digital y Análisis de Imagen (Microm España, S.A.).

Las secciones teñidas con orceína eran visualizadas en el microscopio óptico y mediante la videocámara se transfería el campo microscópico seleccionado al monitor del equipo de morfometría estática, conectado a un ordenador. De cada muestra eran seleccionados y analizados cinco campos microscópicos de la dermis reticular (objetivo x20) y cinco campos microscópicos de la dermis papilar (objetivo x40). Tras la captación de la imagen seleccionada en el monitor, se delimitaba un campo libre de anejos cutáneos y de todos los elementos que pudieran dar lugar a errores de medición. Posteriormente se procedía a la transformación de la imagen obtenida en blanco y negro (sobre 256 niveles de gris) en imagen binaria mediante un proceso de discriminación interactiva. Para cada muestra se establecía un nivel de discriminación para las fibras

elásticas superficiales y otro para las profundas, los cuales se mantenían constantes en los distintos campos analizados de esa muestra. El resultado final era una imagen binaria en blanco y negro que mostraba el tejido elástico de color blanco sobre un fondo negro. Sobre esta imagen binaria y de forma automática se procedía a la cuantificación del número de fibras elásticas y del área ocupada por estas fibras en el campo seleccionado. A partir de estos valores, se calculaban también de forma automática el número de fibras elásticas por mm<sup>2</sup> y la densidad (superficie ocupada por las fibras elásticas / superficie analizada x100) de las fibras elásticas. Finalmente, y de forma separada para las fibras elásticas superficiales y para las profundas, para cada sección se procedía a la obtención de la media de los parámetros cuantificados en los cinco campos analizados.

El resultado final fue la obtención para cada muestra del número de fibras elásticas por mm<sup>2</sup> y la densidad de estas fibras tanto para la dermis superficial como para la dermis media y profunda.

### **3.2.4 Estudio inmunohistoquímico de las fibras elásticas**

Las distintas tinciones inmunohistoquímicas se llevaron a cabo sobre secciones de las biopsias fijadas en formalina al 10% e incluidas en parafina. Para ello se realizaron cortes de 3 micras y se incubaron en portas previamente inmersos en xilol a 37° durante 24 horas. Los cortes fueron desparafinados con xilol y rehidratados con etanol de grado decreciente y agua destilada, a temperatura ambiente.

Pretratamiento: Las muestras para incubar con los anticuerpos anticomponente P-amiloide, antifibronectina y antielastina fueron sometidas a un pretratamiento con pepsina al 0,4% en CIH 0,01N durante 30 minutos a 37°; las muestras para incubar con los anticuerpos antialfa-1-antitripsina, antialfa-1-antiquimiotripsina y antilisoquina fueron

sometidas a un pretratamiento con saponina al 0,05% en agua destilada durante 30 minutos a temperatura ambiente; las muestras para marcar con lectinas fueron incubadas en buffer citrato 0,01 M pH 6 en autoclave durante 8 minutos a 120°; las muestras para incubar con el anticuerpo anti-alfa-2-macroglobulina no recibieron ningún pretratamiento. Los cortes sometidos a pretratamiento con enzimas fueron lavados 5 minutos en PBS, y los sometidos al buffer citrato fueron lavados primero con agua destilada 5 minutos y después en PBS otros 5 minutos. A continuación, se procedió a inhibir la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 2% en metanol durante 10 minutos, dos lavados de 5 minutos en agua destilada, y otros dos lavados de 5 minutos en PBS. Posteriormente, los cortes destinados a inmunotinción con anticuerpos monoclonales se incubaron en suero supresor de conejo al 1/10 en BSA durante 30 minutos, y los destinados a inmunotinción con anticuerpos policlonales se incubaron en suero supresor de cerdo al 1/20 en BSA durante 30 minutos.

Tras decantar el suero supresor, los cortes fueron incubados en una solución determinada de los distintos anticuerpos (TABLA VIII) durante 24 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Tras tres lavados consecutivos de tres minutos con PBS, los cortes destinados a inmunotinción con anticuerpos monoclonales se incubaron con el anticuerpo secundario al 1/700 en PBS durante 30 minutos, y los destinados a inmunotinción con anticuerpos policlonales se incubaron con el anticuerpo secundario al 1/1000 en PBS durante 30 minutos. Tras tres lavados consecutivos de tres minutos con PBS, las piezas se incubaron en el complejo strepto-avidina-biotina al 1/140 en PBS durante 45 minutos. Se realizaron tres nuevos lavados de tres minutos en PBS y se lavó con triton al 0,5% en PBS durante 30 segundos. Posteriormente se procedió al revelado mediante inmersión inferior a 10 minutos en una solución conteniendo diaminobenzidina al 0,5% en PBS y peróxido de hidrógeno al 0,5%. Tras lavar con agua

durante cinco minutos, se contrastaron con hematoxilina de Harris. Se lavó de nuevo con agua durante cinco minutos y se procedió a deshidratar y montar con DPX.

La evaluación de las distintas preparaciones fue llevada a por la misma persona en ausencia de cualquier información clínica.

Tabla VIII.- Anticuerpos utilizados en las inmunotinciones

<b>Anticuerpo</b>	<b>Laboratorio</b>	<b>Dilución utilizada</b>
anticuerpo monoclonal antielastina	Sigma, USA	1/50
anticuerpo policlonal anticomponente-P-amiloide	Dakopatts, Denmark	1/100
anticuerpo policlonal antifibronectina	Dakopatts, Denmark	1/150
anticuerpo policlonal antialfa-1-antitripsina	Dakopatts, Denmark	1/100
anticuerpo policlonal antialfa-1-antiquimiotripsina	Dakopatts, Denmark	1/600
anticuerpo policlonal antialfa-2-macroglobulina	Biosystem, España	1/20
anticuerpo policlonal antilisozima	Dakopatts, Denmark	1/100
<i>Triticum vulgare</i>	Sigma, USA	1/20
Concanavalina A	Sigma, USA	1/20

### 3.2.5 Estudio de la función pulmonar

En el estudio de la función pulmonar se realizaron las siguientes determinaciones: espirometría forzada basal y prueba broncodilatadora, volúmenes pulmonares mediante método pletismográfico, y transferencia de CO mediante respiración única.

Los estudios de función pulmonar fueron llevados a cabo en todos los casos con el paciente en una situación clínica estable, sin antecedentes de exacerbaciones durante el mes previo al examen. Quince minutos de descanso precedían todas las mediciones. Se evaluaron los parámetros espirométricos (volumen espiratorio forzado en el primer segundo -FEV1- y capacidad vital forzada -FVC-) en situación basal y tras

broncodilatador mediante espirómetro seco (Datospir 70. Sibelmed. Barcelona, España); y los volúmenes pulmonares (volumen residual -RV-, capacidad pulmonar total -TLC-, y el cociente RV/TLC%) mediante PFT Horizont spirometer (SensorMedics Corp., Jorba Linda, CA, USA), de acuerdo con la metodología recomendada por la American Thoracic Society (American Thoracic Society, 1987). La capacidad de transferencia de CO fue medida por el método de respiración única (SensorMedics Corp., Jorba Linda, CA, USA), y se tomó como parámetro para el estudio la transferencia de monóxido de carbono corregida por el volumen alveolar (KCO). Los valores del FEV1 y de la FVC más elevados obtenidos en tres maniobras técnicamente aceptables con una variación inferior al 5% fueron considerados para el estudio. De los valores obtenidos se calculó el porcentaje respecto una población de referencia mediterránea (FEV1%, FVC%, RV/TLC%) (Roca y cols., 1985; Roca y cols., 1986).

Para la realización de la prueba broncodilatadora, una vez obtenido el valor basal de la espirometría se administró al paciente una dosis de 200 microgramos de salbutamol en aerosol mediante cámara espaciadora. Tras quince minutos de espera, se repitió la espirometría de forma idéntica a la realizada previamente. Se consideró como prueba broncodilatadora positiva aquella con una variación del FEV1 igual o superior al 12% del valor basal.

### **3.2.6 Método estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo con el Statistical Package for the Social Sciences (SPSS para Windows, versión 9.0). Las variables categóricas se expresaron como frecuencia absoluta y relativa, y las variables continuas como  $m$  (DE), o mediana y intervalo intercuartil cuando la distribución no fue normal. Para examinar el grado de asociación de dos variables categóricas se utilizó el test de chi cuadrado. Para comparar

dos variables continuas se utilizó el test de la t de student, y cuando la distribución de las variables no fue normal el test U de Mann-Whitney. La comparación de variables cuantitativas con más de 2 categorías se realizó mediante ANOVA.

Una vez comprobada que la distribución de las variables cuantitativas en estudio era normal, la relación entre ellas se analizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Para determinar el grado de influencia de una variable independiente sobre una variable dependiente se empleó un análisis de regresión simple. Para finalizar, se realizó un análisis de regresión múltiple con las variables que habían mostrado una  $p < 0,1$  en los análisis univariantes, a fin de determinar la independencia entre ellas y calcular los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) parciales y totales. Los  $R^2$  parciales fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

$$Pr^2_i = (R^2 - R^{2j}) / (1 - R^{2j})$$

En donde  $Pr^2_i$  corresponde al coeficiente de correlación parcial de la variable independiente a analizar,  $R^2$  corresponde al  $R^2$  del modelo con todas las variables que intervienen en el estudio, y  $R^{2j}$  corresponde al  $R^2$  del modelo sin la variable a analizar.

Para todos los tests la relación fue considerada estadísticamente significativa para una  $p < 0,05$ .

Como análisis primarios se estudiaron los efectos del consumo de tabaco sobre el parámetro morfométrico más representativo de las alteraciones de las fibras elásticas de la dermis, así como la influencia de las alteraciones de este parámetro morfométrico sobre la función pulmonar analizada a través de la variable FEV1%. Como análisis secundarios se incorporaron al estudio las relaciones entre las distintas variables morfométricas con los parámetros de función respiratoria RV/TLC% y KCO así como las relaciones entre los parámetros morfométricos y los inmunohistoquímicos.