

## Evaluación hística y morfométrica en piel sana de ratas tratadas con EGF tópicó

A. BERNAL,<sup>1</sup> E. JÚSTIZ,<sup>2</sup> y J.L. BELLO,<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Patología, Facultad de Estomatología, Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana, Ave. Salvador Allende y Calle G, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba

<sup>2</sup> Departamento de Bioterapia, Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, Calle 29 y E, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido en mayo de 1990

Aprobado en marzo de 1991

### RESUMEN

Con el objetivo de realizar la evaluación morfológica de los efectos ocasionados por la aplicación tópica del EGF recombinante, se seleccionaron ratas de ambos sexos de la línea Long-Evans entre 150-200 g de peso corporal y se agruparon atendiendo al diseño experimental.

Se formaron dos grupos: uno recibió tratamiento durante 30 días con pomada de EGF, y un grupo control que sólo recibió aplicaciones de ungüento hidrófilo. Se efectuaron cinco muestreos a partir de los 15 días de comenzado el tratamiento, al final del mismo (30 días), y a los 45, 60 y 90 días de comenzado el tratamiento.

Se tomaron fragmentos de piel tratada y no tratada, así como sus respectivas necropsias. Las muestras se fijaron en formalina neutra al 10 % y se procesaron por la técnica de inclusión en parafina. La evaluación de los casos se efectuó siguiendo las consideraciones hísticas formuladas por la OMS, así como mediante estudios morfométricos.

Se destacan entre los hallazgos un ligero aumento de la capa de queratina en los grupos que recibieron EGF y áreas focales de acantosis acompañadas de incremento del número de mitosis.

### SUMMARY

With the aim of studying morphological changes due to topical treatment with recombinant EGF in rat skin.

Long-Evans strain rats of both sexes weighing 150-200 g were grouped considering experimental characteristics. One group was treated during 30 days with EGF pomade, and a control group only received the vehicle pomade.

Samples for histopathological analysis were taken 15 days after beginning treatment, at its ending, and 45, 60 and 90 days after its beginning. Specimens of skin and autopsies were fixed on 10 % neutral formalin and processed by routine paraffin embedding techniques. The histological evaluation was done under the WHO regulations and morphometric measurements were done. Specimens show light hyperkeratosis in the group treated with r-EGF, and focal areas of acantoses with increased number of mitosis.

### INTRODUCCION

Los primeros estudios sobre el efecto biológico del EGF mostraron que estimulaba la proliferación epitelial tanto *in vitro* como *in vivo* (Cohen y Elliott, 1963).

Estos estudios iniciales fueron el punto de partida para estudiar el posible rol de esta "hormona" sobre el proceso de cicatrización. Se demostró en los resultados presentados por Franklin y Lynch, 1979;

Hutson *et al.*, 1979; Niall *et al.*, 1982; Arturson, 1984 y Buckley *et al.*, 1985, el efecto favorable del tratamiento con esta molécula sobre este proceso en sistemas experimentales.

El desarrollo alcanzado en la ingeniería genética y la biotecnología en nuestro país ha permitido la biosíntesis del factor de crecimiento epidérmico (EGF) por lo que, atendiendo a las exigencias de la toxicología contemporánea, hemos desarrollado un método de trabajo a fin de precisar de forma preclínica las posibles modificaciones estructurales en la piel intacta, así como en órganos y sistemas de ratas tratadas con este producto para hacer posible su introducción en la práctica médica.

## MATERIALES Y METODOS

Se seleccionaron ratas de ambos sexos de la línea Long-Evans entre 150-200 g de peso corporal.

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

1) tratamiento con pomada de EGF a razón de 100  $\mu$ g de EGF-hr/g de pomada base sulfadiazina de plata, y 2) control, tratamiento con pomada ungüento hidrófilo.

Cada animal recibió 30 aplicaciones tópicas de pomada en la piel dorsal, una vez al día.

Para el estudio histopatológico se realizaron cinco muestreos, tomándose tres animales de cada grupo experimental en cada uno de los mismos, comenzando a partir de los 15 días de iniciado el tratamiento, al fin del tratamiento (30 días) y a los 45, 60 y 90 días.

Los animales fueron autopsiados tomándose además fragmentos de piel dorsal tratada en ambos grupos experimentales.

Los especímenes fueron lavados en solución salina, fijados en formalina neutra al 10 % y procesados por la técnica clásica de inclusión en parafina y coloreados con hematoxilina eosina.

Las muestras de la piel fueron evaluadas cualitativamente tomando como referencia los criterios de Smith y Pindborg (1969), para la evaluación de las atipias epiteliales: a) tipo de queratinización; b) grosor epitelial; c) estrato

granuloso; d) displasia; e) presencia de ulceraciones superficiales; f) presencia de células inflamatorias.

Se realizó, además, un estudio cuantitativo de la celularidad epitelial con el empleo de un Sistema computarizado analizador de imágenes Leitz ASM-68K, a fin de determinar los siguientes parámetros: 1) Grosor epitelial: medición efectuada desde el borde superior de la capa granulosa hasta el borde inferior de la capa basal, excluyendo la capa de queratina por su desprendimiento habitual en las preparaciones histológicas que introduciría un sesgo en las mediciones a efectuar; 2) Celularidad/área: dentro de un área previamente definida comprendiendo todos los estratos epiteliales se realizaron los siguientes cálculos: Mitosis/área, Células basales/área y Total de células epidérmicas/área.

Toda la información fue registrada en modelos confeccionados al efecto, en los que se plasmaron las descripciones morfológicas y las mediciones efectuadas.

Los datos fueron comparados mediante la prueba "t" de Student.

## RESULTADOS

### Evaluación cualitativa de la piel tratada

*Tipo de queratinización.* En el estudio realizado todos los casos, incluyendo los animales control, presentaron ortoqueratinización. Es de destacar que en algunas muestras correspondientes a animales que recibieron tratamiento con EGF, se observó un aumento de grosor de la capa de queratina, principalmente en las hembras (figuras 1 y 2).

*Estrato granuloso.* Siempre estuvo presente en todos los casos evaluados, destacándose su engrosamiento en los sujetos que recibieron EGF.

*Grosor epitelial.* Observamos una tendencia al engrosamiento epitelial en los casos tratados con EGF. Se hace más patente este fenómeno en las hembras (figura 3).

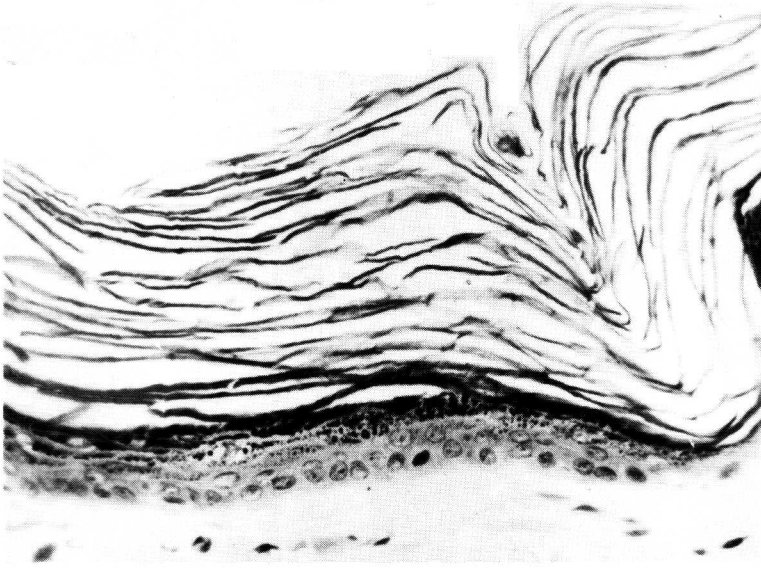


FIG. 1. Micrografía que ilustra hiperortoqueratosis en ratas hembras tratadas tópicamente con EGF (40XH/E).

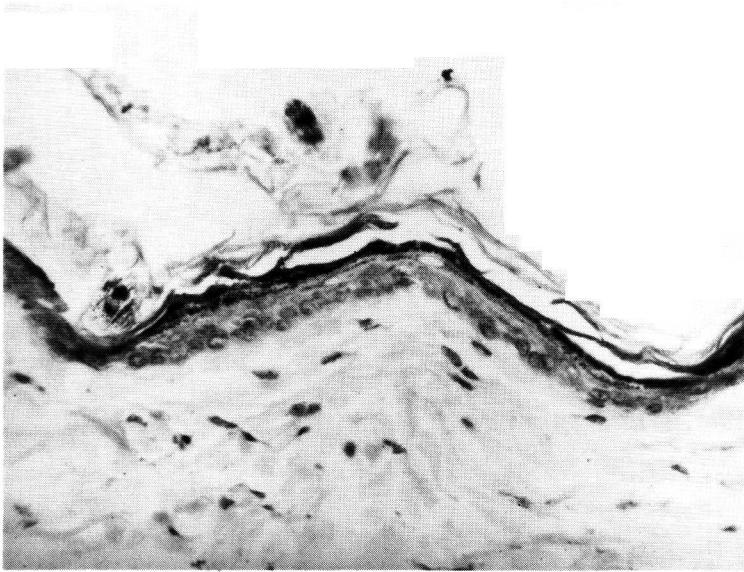


FIG. 2. Control animal. Obsérvese el grosor de la capa de queratina en relación con la figura 1 (40XH/E).

*Displasia.* Los eventos celulares relacionados con este aspecto son el incremento de las mitosis en los casos tratados con EGF, apareciendo hasta tres mitosis por

campo en el caso de los grupos de hembras tratadas con EGF, así como hiperplasias focales de células basales con pérdida de la polaridad de las mismas (figura 4).

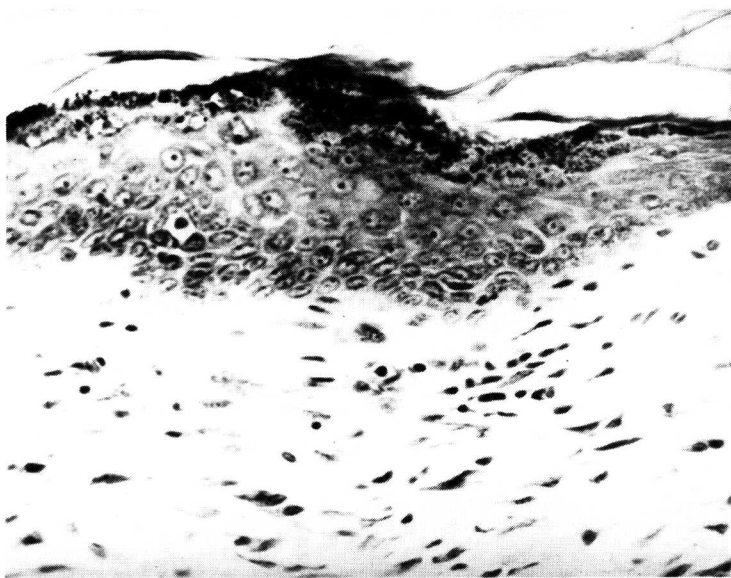


FIG. 3. Micrografía que ilustra la acantosis observada en casos tratados con EGF; se destaca, además, incremento en el número de células basales y una marcada capa granulosa (40XH/E).



FIG. 4. Micrografía que destaca el incremento numérico del estrato basal, pérdida de la polaridad y de la adherencia intercelular observadas focalmente en casos tratados con EGF (40XH/E).

*Presencia de ulceraciones superficiales.*  
No observamos la presencia de esta alteración en ningún caso tratado con EGF.

*Presencia de infiltrado inflamatorio.*  
Apareció en casos aislados en el tejido conectivo subyacente.

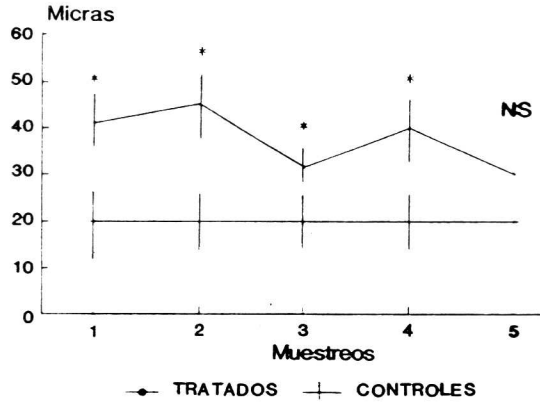
Además, en la evaluación cualitativa observamos la aparición de espongirosis en el estrato basal de las ratas hembras tratadas con EGF.

### Evaluación cuantitativa

*Mediciones del grosor epitelial.*  
Las mediciones efectuadas en cada uno de

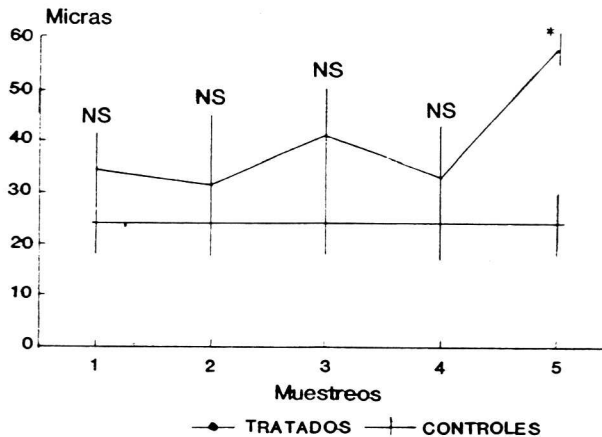
los muestreos indican diferencias entre los grupos tratados y sus respectivos controles, que se manifiestan desde el primer muestreo realizado después de 15 días de tratamiento y se mantienen durante todo el período de observación del experimento de forma mas evidente en el caso de las hembras (gráficos 1 y 2).

GRAFICO 1. MEDICIONES DEL GROSOR EPITELIAL EN RATAS HEMBRAS TRATADAS CON EGF



P < 0,05; NS: No significativo.

GRAFICO 2. MEDICIONES DEL GROSOR EPITELIAL EN RATAS MACHOS TRATADAS CON EGF



P < 0,05; NS: No significativo.

**Celularidad/área.** Se observaron diferencias significativas entre las comparaciones del número de mitosis por área de los animales tratados y sus controles, tanto en machos como en

hembras, siendo en estas más sostenido el efecto a lo largo del experimento. No encontramos diferencias con respecto a los restantes elementos celulares epiteliales (tablas 1 y 2).

**Tabla 1**  
CELULARIDAD EPITELIAL EN RATAS MACHO TRATADAS CON EGF

Muestra	Mitosis/Área		Células Bas/Área		Total Células Epid/Área(m)	
	$\bar{x}$	D.S.	$\bar{x}$	D.S.	$\bar{x}$	D.S.
1	$5,8 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-4}$ *	0,0204	0,0046	0,0302	0,0058
2	$8,5 \times 10^{-4}$	$4,8 \times 10^{-4}$ *	0,026	0,0058	0,0458	0,0095
3	$9,4 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-4}$ *	0,024	0,0081	0,037	0,01
4	$5,5 \times 10^{-4}$	$0,6 \times 10^{-4}$	0,0157	0,0033	0,023	0,0028
5	$3,6 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^{-4}$	0,012	0,0029	0,017	0,0044
Control	$4,5 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-4}$	0,021	0,011	0,034	0,037

\*  $p < 0,01$

Nota: Áreas expresadas en micras cuadradas.

**Tabla 2**  
CELULARIDAD EPITELIAL EN RATAS HEMBRAS TRATADAS CON EGF

Muestra	Mitosis/Área		Células Bas/Área		Total Células Epid/Área(m)	
	$\bar{x}$	D.S.	$\bar{x}$	D.S.	$\bar{x}$	D.S.
1	$1,5 \times 10^{-4}$	$0,4 \times 10^{-4}$ *	0,01	0,0039	0,017	0,0051
2	$9,7 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-4}$ *	0,016	0,0049	0,025	0,0075
3	$4,0 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-4}$ **	0,015	0,003	0,024	0,0044
4	$1,9 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-4}$ *	0,014	0,0044	0,021	0,0062
5	$5,4 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-4}$ *	0,0250	0,0098	0,04	0,016
Control	$5,8 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-4}$	0,027	0,0081	0,038	0,039

\*  $p < 0,01$

\*\*  $p < 0,05$

Nota: Áreas expresadas en micras cuadradas.

## Evaluación toxicopatológica de órgano

No se observaron evidencias de cambios histopatológicos en las necropsias de animales tratados tópicamente con EGF.

## DISCUSION

El factor de crecimiento epidérmico resulta una molécula de importante actividad mitogénica, no solo para células epiteliales sino también para fibroblastos (Buckley *et al.*, 1985), lo que explica su papel en la aceleración de los procesos de cicatrización de las lesiones epiteliales, tanto al emplear el producto natural como el de origen biosintético (Brown *et al.*, 1986), lo que ha quedado demostrado en diferentes sistemas experimentales.

Nuestros resultados coinciden parcialmente con los reportados por otros investigadores, pues encontramos un ligero aumento de la queratinización superficial en los casos tratados con la pomada de EGF. Las características de la capa de queratina en estos sujetos siempre fue de tipo orto, estando en correspondencia este hallazgo con la presencia de la capa granulosa.

El incremento del grosor epitelial observado en los casos tratados, fue corroborado en el estudio morfométrico, al presentar los animales que recibieron EGF un aumento en las mediciones lineales efectuadas, con la particularidad de que este efecto no se correspondió con un incremento del número de células en los estratos que componen la epidermis, pero sí con el aumento de la cantidad de mitosis en el estrato basal.

Esto nos hace pensar que los engrosamientos epiteliales observados en los animales tratados con EGF no sean el resultado de una hiperplasia celular en los diferentes estratos, sino de un posible aumento de volumen celular a partir de un incremento de sus componentes ultraestructurales.

Este hecho demuestra que el tratamiento con EGF sobre la piel sana provocó una respuesta mitogénica en el estrato basal. Esta no se tradujo en un incremento de la celularidad en los estratos superiores, lo que pudiera depender, en gran medida, de los mecanismos de represión intercelulares que funcionan habitualmente en contraposición al efecto del tratamiento con EGF en sujetos con lesiones tisulares. En estas últimas, esta señal biomolecular sí se traduce en un incremento de la celularidad necesaria para resolver el defecto de tejido existente a través del proceso de cicatrización y reparación.

## CONCLUSIONES

Como conclusiones del estudio del tratamiento tópico con EGF<sub>rh</sub> en piel sana de ratas, planteamos que:

1. Los hallazgos histopatológicos de mayor interés en los animales tratados resultaron la hiperqueratosis, las áreas focales de acantosis y el incremento mitótico en la capa basal.
2. El estudio de la celularidad/área epitelial tratada con EGF tópico, demostró un aumento de la actividad mitótica al compararlo con los controles, haciéndose más evidentes los resultados estadísticos en ratas hembras ( $p < 0,01$ ).
3. En las necropsias estudiadas no se observaron cambios morfológicos atribuibles al producto evaluado.

## REFERENCIAS

- ARTURSON, G. (1984). Epidermal Growth Factor in the healing of corneal wounds, epidermal wounds and partial thickness scalds. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* **18**: 33-37.
- BROWN, G.L.; L. CURTSINGER; J.R. BRIGHTWELL; D.M. ACKERMAN; G.R. TOBIN; M.C.Jr. POLK; C. GEORGE-NASCIMENTO; P. VALENZUELA, and G.S. SCHULTZ (1986). Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic Epidermal Growth Factor. *J. Exp. Med.* **163**: 1319-1324.
- BUCKLEY, A.; J.M. DAVIDSON; C.G. KAMERATH; T.B. WOLT y S.C. WOODWARD (1985). Sustained release of Epidermal Growth Factor accelerates wound repair. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 7340-7344.
- COHEN, S. y G.A. ELLIOT (1963). The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *J. Invest. Dermatol.* **40**: 17-21.
- FRANKLIN, J.D. y J.B. LYNCH (1979). Effects of topical applications of Epidermal Growth Factor on normal healing. *Plast. and Reconstruc. Surg.* **64**: 766-770.
- HUTSON, J.M.; M. NIALL; D. EVANS y R. FOWLER (1979). Effect of salivary gland on wound contraction in mice. *Nature* **279**: 739-795.
- NIALL, M.; G.B. RYAN y B. O'BRIEN (1982). The effect of Epidermal Growth Factor on wound healing on mice. *Jour. Surg. Res.* **33**: 164-169.
- SMITH, C.J. y J.J. PINDBORG (1969). *Histological grading of oral epithelial atypia by use of photographic standards*. Ed. Royal Dental College. Copenhagen, p. 5.