

## Estudio al microscopio óptico y electrónico de la reacción del tejido conectivo frente al poliuretano

L. GONZÁLEZ, O. ANCHETA, E. SELMAN Y J. KOURÍ

*Lab. de Microscopia Electrónica, CENIC y Dpto. de Cirugía Experimental de la Facultad de Ciencias Médicas, Ciudad de la Habana, Cuba*

*Recibido: 30 de septiembre de 1975*

*Recibido: 25 de octubre de 1977*

**ABSTRACT.** Foam sponge fragments were implanted into the retrosternal cavity of dogs. Extractions were performed from the seventh to twenty-seventh week after the implantations, and this explanted material was processed for optical and electronmicroscopical studies. Histochemistry to detect elastic fibres was also performed. The characteristic cells from an aseptic, chronic inflammation have been observed, as well as several degrees of fibrosis that varied directly with the implantation time. Probable fibre-producing cells were detected. Impermeability of the tube after 25 weeks of implantation and its use for substituting hollow organs as well as the presence of the different kinds of cells there encountered have been discussed.

**RESUMEN.** Se estudió el material obtenido de la cavidad retroesternal de perros, a los que se les implantó previamente fragmentos de esponja de poliuretano (foam) en forma de tubos. Las extracciones se realizaron desde 7-27 semanas. Las muestras se procesaron para su estudio al microscopio óptico y electrónico y además se realizaron técnicas histoquímicas para determinar fibras elásticas. Se observaron las células características de la inflamación aseptica crónica, así como diversos grados de fibrosis variables de acuerdo con el tiempo de implantación. Se destaca la presencia de células que pudieran ser productoras de fibras elásticas. Se discute la posible impermeabilidad del tubo después de las 25 semanas de implantación y su utilización para sustitución de órganos huecos, así como la presencia de los diferentes tipos celulares hallados.

### INTRODUCCION

En años recientes, con la producción de gran variedad de materiales plásticos, se comenzó a realizar estudios sobre la posible utilización de dicho material para sustituir porciones de órganos.

Se ensayó en animales la implantación en diferentes lugares del organismo de materiales plásticos tales como: leucite, plexiglás, nylon acrílico, resinas vinílicas (*Ingraham y Matson Alexander, 1947*); esponjas de polivinil (*Grindley y Waugh, 1951*); nylon, orlón, dacrón, teflón, marlex (*Usher 1958*); polietileno (*Rubin y Bromberg, 1971*); foam y poliuretano (*Rigdon, 1974*); realizándose estudios al microscopio óptico de la reacción del tejido conectivo frente a los mismos.

Muchos autores, basándose en los estudios antes citados, confeccionaron diferentes tubos para realizar sustituciones de esófago en animales de experimentación y aun en humanos (*Grindley y Nurin Rochester, 1948; Klopp y Alford Crandoll, 1951; Hardin, 1954; Berman, 1956; Sacks, 1959; Carter 1963; Segura y cols., 1966; Leininger y Hines, 1970; Hauna 1970; Stuart, 1972; Menachen y Neuman, 1972; Sanfelippo, 1973; Holden y cols., 1973*) pero todos los métodos hasta ahora ensayados han obtenido resultados poco alentadores.

En el momento presente se ensaya la idea de realizar esofagoplastia a partir de tubos obtenidos por la invasión del tejido conectivo del propio individuo, en un cilindro de esponja de poliuretano (*Selman, 1973*).

Los objetivos del presente trabajo son los de estudiar las características morfológicas de la reacción inflamatoria del tejido conectivo frente al poliuretano utilizando en la esofagoplastia al microscopio óptico y electrónico; el tiempo en que se produce la fibrosis total de la pared del tubo de esponja y a la vez determinar si es lo suficientemente densa como para impermeabilizar dicho tubo.

## MATERIALES Y METODOS

Se emplearon 9 perros, semejantes en cuanto a raza, talla, peso y análisis de diferentes parámetros hemáticos, se les introdujo en espacio retroesternal un cilindro constituido por esponja de poliuretano de 0.4 cm de grosor, 1.5 cm de diámetro y de longitud variable de acuerdo a la talla del esternón del perro, con una sonda rectal de goma número 34 en su luz, para evitar el colapsamiento; dichos cilindros se extrajeron a los 7, 17, 19 21 y 27 semanas.

Las muestras obtenidas se procesaron para microscopía óptica, realizándose tinción con hematoxilina y eosina, tricrómica de Gomori, Orceína ácida con Giemsa y la coloración de Verhoeff; se observaron en un microscopio óptico Carl Zeiss en campo brillante; para microscopía electrónica se utilizó el método de fijación con glutaraldehido al 3.2% a una temperatura entre 0 y 4°C durante una hora, inmediatamente de extraída la muestra, previo lavado rápido en suero fisiológico. Se lavaron con tampón fosfato pH 7.3 (*Millonig, 1961*) toda una noche, la postfijación se realizó con OsO<sub>4</sub> al 2% en tampón fosfato durante una hora, seguida de lavados rápidos en el mismo tampón. Se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol etílico, la infiltración e inclusión se realizaron unas muestras con Epon 812 (*Luft, 1961*) y otras en Araldita (*Glauert, 1958*).

Los bloques fueron cortados en un ultramicrotomo LKB Ultrotome III obteniéndose cortes cuyos colores de interferencia variaron entre plateados y amarillo claro, se montaron sobre rejillas de 400 mesh sin membrana soporte.

Se realizó post-contraste con uranil acetato 7 minutos e hidróxido de plomo 10 minutos. (*Reynolds, 1961*); todas las preparaciones fueron observadas en un microscopio electrónico Hitachi HS-7.

Como controles se incluyeron fragmentos de esponja de poliuretano para su estudio al microscopio óptico y electrónico.

## RESULTADOS

En los resultados obtenidos se observó que el aspecto al microscopio óptico (Fig. 1) de las trabéculas de la esponja de poliuretano, presentó formas variadas, predominando las formas poliédricas.

Las células observadas en todos los tiempos de extracción fueron las que habitualmente se presentan en la inflamación crónica; macrófagos y células gigantes a cuerpo extraño (Fig. 2) en estrecha relación con las trabéculas de la esponja, las que aparecen como islotes entre el tejido biológico (Fig. 3).

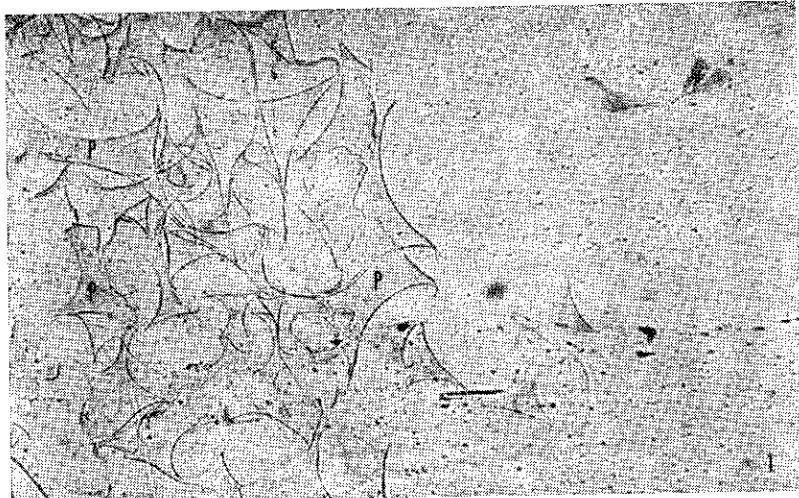


Fig. 1. Se observan las espículas de la esponja de poliuretano de formas poliédricas (P), inclusión en parafina 37 x.

A baja magnificación se constató que la fibrosis que penetra los espacios huecos que dejan las trabéculas de la esponja va aumentando progresivamente de fuera a dentro hasta fibrosarse completamente la pared del tubo de esponja (Fig. 3) lo cual ocurre alrededor de las 25 semanas. Llamó la atención el hecho de que el proceso de reparación fibrosa se encontró mezclado con la reacción inflamatoria crónica, apreciando focos de fibrosis que alternan con las células inflamatorias, pudiéndose observar fibras colágenas y fibroblastos, también en estrecha relación con las trabéculas de la esponja (Fig. 2). Frecuentemente se encontraron capilares cortados longitudinalmente y de través.

En los cortes a los que se realizó coloración para fibras elásticas se constató la presencia de las mismas, en las paredes de los vasos sanguíneos presentes en el corte (Fig. 4) y dispersos entre las fibras colágenas, en ocasiones relacionadas con células; siendo más abundantes en las muestras de mayor tiempo de implantación (Fig. 5).

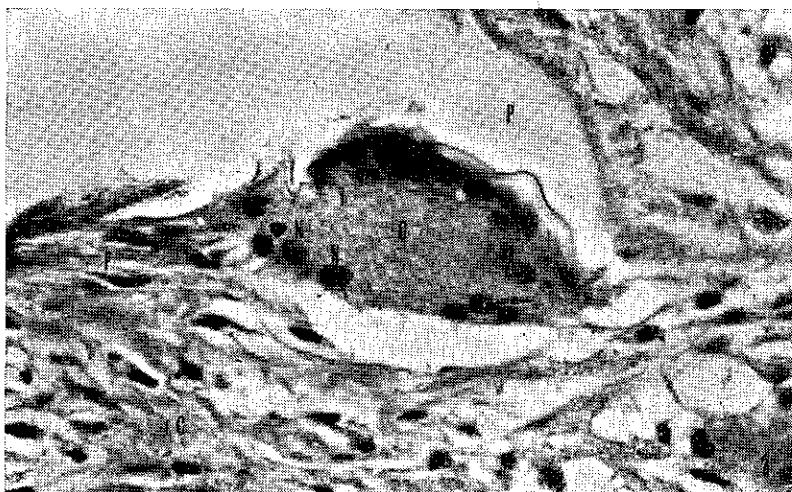


Fig. 2. Célula gigante a cuerpo extraño (G), obsérvese la gran cantidad de núcleos dispuestos cerca de la superficie celular (N) y en estrecha relación con una espícula de poliuretano (P). Además núcleos de fibroblastos (F) y fibras calágenas (F.C.).  
Tecn. Tric. de Gomori 373 x.

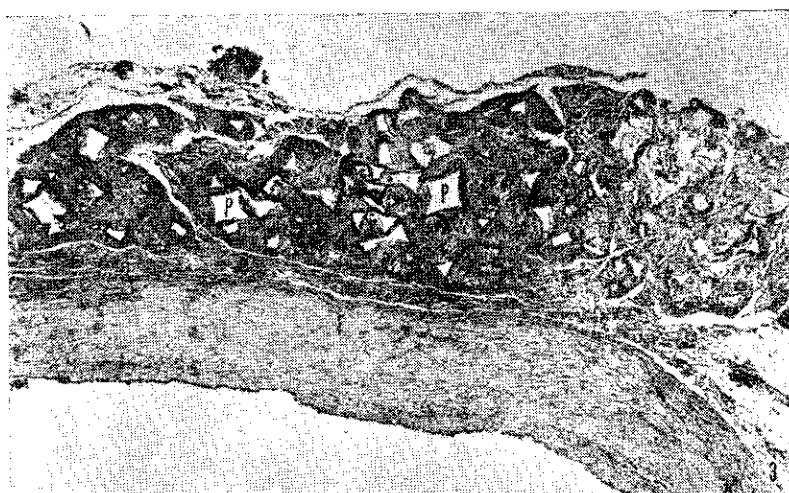


Fig. 3. Muestra extraída a las 25 semanas de implantación, se observa cómo el tejido de reparación ha invadido toda la pared del tubo de esponja; las espícululas de la misma (P) presentan el aspecto de islotes entre el tejido, observe la cápsula fibrosa hacia la parte externa del tubo (F). Tecn. Tric. de Gomori 23 x.

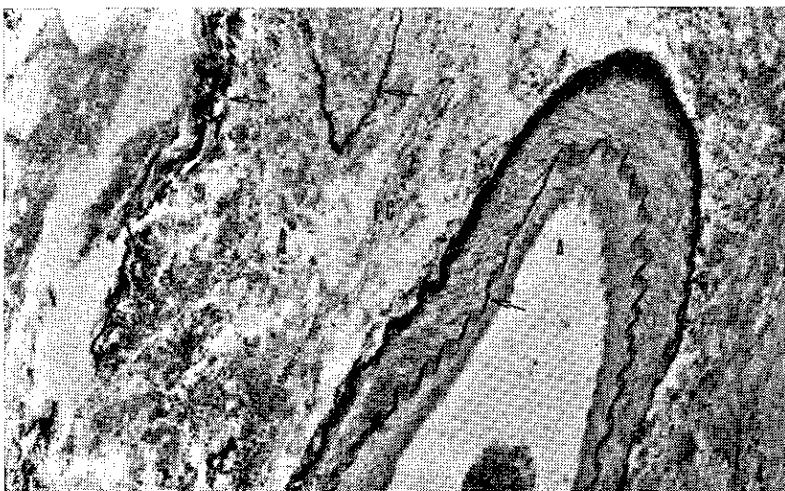


Fig. 4. Aspecto de las fibras elásticas (flecha) en vasos sanguíneos de neoformación: arteriola (A), vénula (V) y entre las fibras colágenas (F.C.) del tejido de reparación. Tecn. de Verhoeff 103 x.

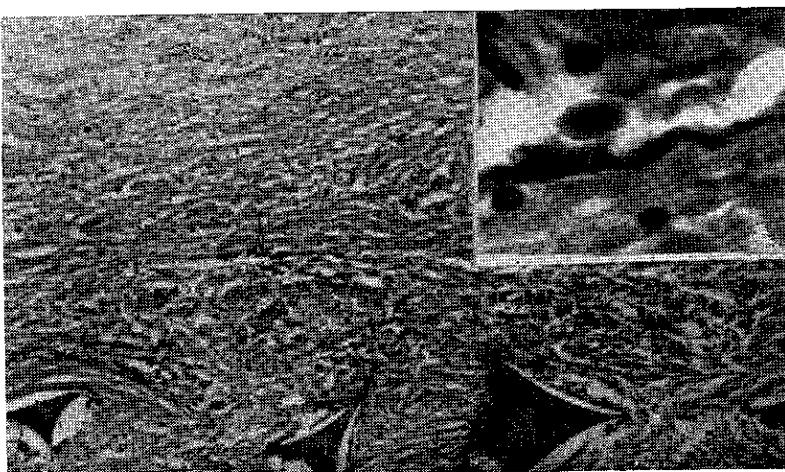


Fig. 5. Fibras elásticas (flecha) entre fibras colágenas, próximas a una espícula (P) que toman esa coloración por la técnica 93 x.  
Insertado: Aspecto de la fibra elástica a mayor aumento (E). 1400 x. Tecn. Verhoeff.

Al microscopio electrónico se observó la diferencia de densidad electrónica del poliuretano, con respecto al medio de inclusión (Araldita) siendo el poliuretano más electrondenso que la araldita, lo que también se pudo observar en una muestra con tejido biológico (Fig. 6). Se constató la presencia de macrófagos, fibroblastos (Fig. 7) y células en estado de degeneración.

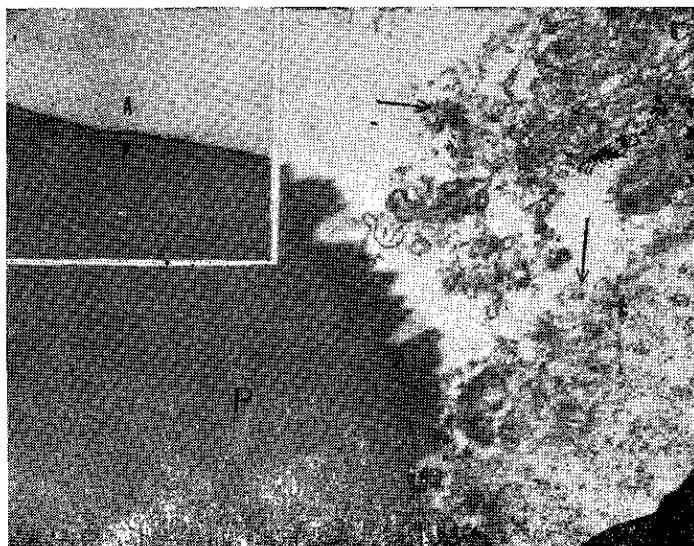


Fig. 6. Aspecto del poliuretano al microscopio electrónico (P), en relación con el resto de tejido biológico (flecha) 8,576 x.  
Insertado: Se observa la diferencia de densidad entre el poliuretano (P) y el medio de inclusión, araldita (A) 17,197 x.

Se observaron grandes extensiones de citoplasma que presentaban varios núcleos, en alguno de los cuales se pudo constatar nucleolo; en el citoplasma; mitocondrias, aparato de Golgi, gránulos electrondensos y gran cantidad de vacuolas de diferentes tallas diseminadas, redes de membranas lisas que se invaginan en el citoplasma a partir de la membrana plasmática, retículo endoplásmico rugoso y filamentos; la membrana celular de superficie irregular presentó en ocasiones muchas filopodias (Fig. 9). Se constató la presencia de capilares de neoformación (Fig. 10) observándose las células endoteliales que delimitan su luz.

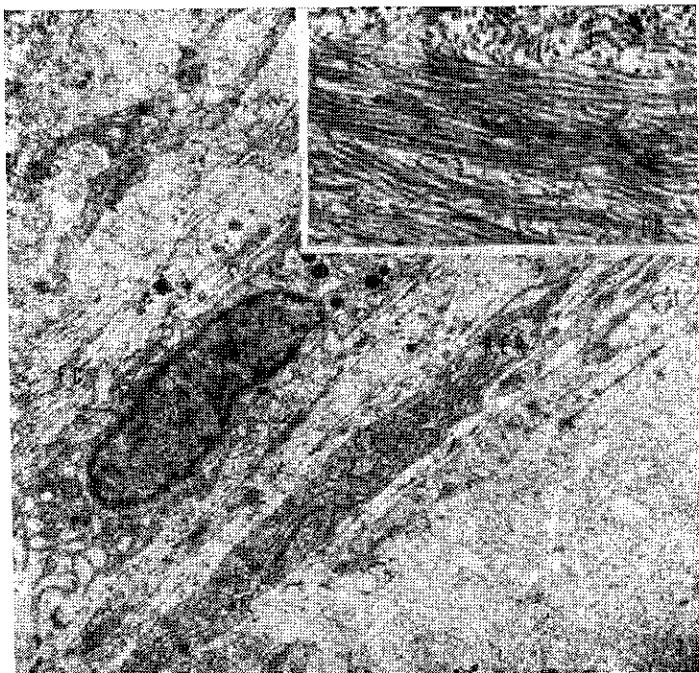


Fig. 7. Se observan dos porciones de fibroblastos, uno de ellos presenta núcleo (N) en el otro podemos observar el retículo endoplasmático rugoso ensanchado (RER), con material granuloso poco electrón denso en el interior de su luz, en el espacio extracelular algunas fibras colágenas.

Insertado: fibras colágenas, obsérvese la periodicidad axial 31,741 x.

El aspecto más sobresaliente de este estudio fue la observación de células muy voluminosas, de forma variable, que presentaron un núcleo grande e irregular, el cual contenía frecuentemente un nucleolo, con la cromatina en banda fina rechazada hacia la periferia (Fig. 11).

El citoplasma presentó abundantes mitocondrias de variadas formas con crestas transversales, en algunas preparaciones eran de pequeño tamaño y más densas que en otras; además se observaron pequeños gránulos, abundantes densos correspondientes a ribosomas libres; así como algunos gránulos electrondensos los que interpretamos como lisosomas;

vacuolas pequeñas de diferentes diámetros cerca de la membrana plasmática.

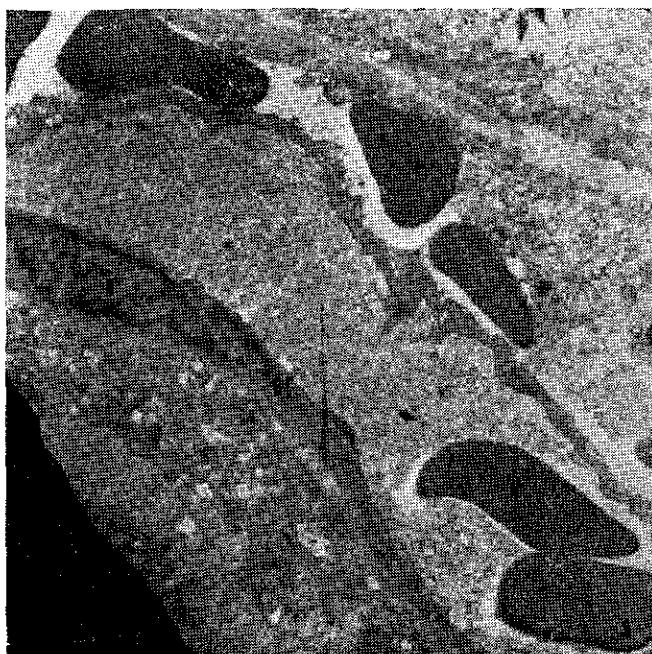


Fig. 8. Capilar de neoformación, se observa su luz (L) que contiene hematíes (H) y material poco electrón denso, delimitado por células endoteliales (CE) a una de ellas se le puede observar el núclco (N) en el espacio extravascular se observan algunos hematíes 4,273 x.

En ocasiones se observó también acúmulos de pequeños gránulos electrondensos que parecen corresponder a glucógeno; estas células también presentaron en algunos cortes, aparato de Golgi de desarrollo normal; así como retículo endoplásmico rugoso el que se observó escasamente desarrollado; además canales de membranas lisas que recorren amplios trayectos (Fig. 12).

En estrecha relación con la superficie celular se observaron gran cantidad de fibras, en las cuales no se pudo constatar periodicidad axial.

Dentro de este grupo celular se encontraron algunas células, que al parecer mostraron signos de degeneración, como: balonamiento de la doble membrana nuclear y alteraciones mitocondriales.

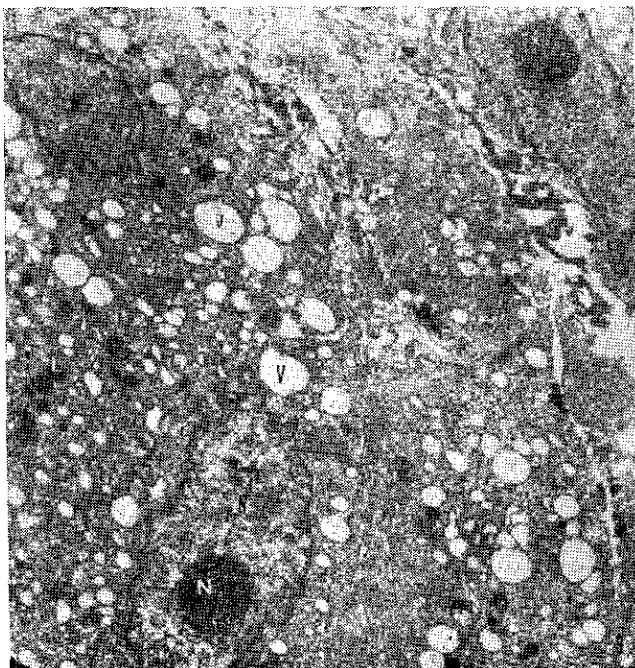


Fig. 9. Se observa extensa porción de citoplasma que presenta dos núcleos (N), uno de ellos con nucleolo (Nu), abundantes vacuolas (V) y lisosomas (L) 4,904 x.

## DISCUSION

Por los resultados obtenidos planteamos que los fenómenos observados ocurren en el transcurso de una inflamación aséptica provocada por un cuerpo extraño frente al cual el organismo produce una reacción de defensa. En los tiempos en que hacemos las observaciones la respuesta a la agresión presenta todas las características de la reacción inflamatoria crónica y se encuentra mezclada con el proceso de reparación.

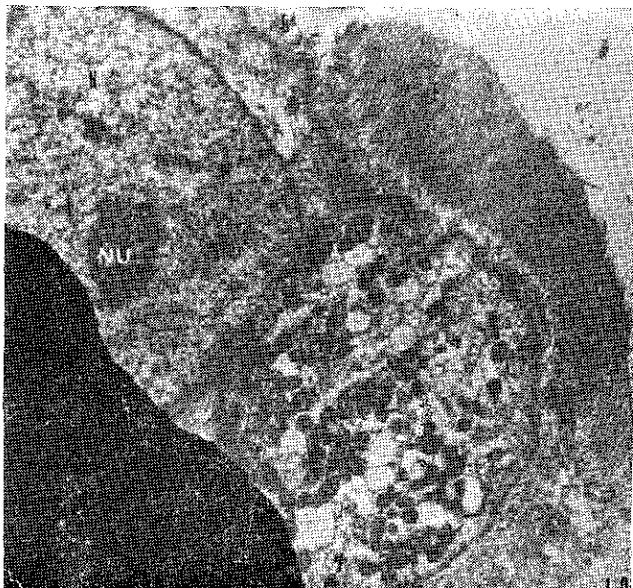


Fig. 10. Célula productora de fibras, presenta núcleo voluminoso (N), nucleolo (Nu), en el citoplasma abundantes mitocondrias (M), pequeñas y densas, en estrecha relación con la superficie celular, abundantes fibras que no presentan periodicidad axial (E) 5,494 x.

Las observaciones al microscopio electrónico no han dado luz en cuanto a la relación del tejido biológico con las trabéculas de la esponja, debido a dificultades encontradas para realizar los cortes ultrafinos.

A las pocas semanas de la implantación, se observa un predominio de células entre las trabéculas, donde es de destacar la presencia de macrófagos en los que no pudimos constatar la fagocitosis del material después del día número 25, como aparece en el trabajo de Rigdon (1974) creemos que podría deberse a la diferencia en la utilización del material ya que ellos emplearon partículas muy pequeñas.

La fibrosis penetró de fuera a dentro de la pared de la esponja y alrededor de la semana número 25, los espacios que dejan entre si las tra-

béculas están totalmente ocupados por tejido fibrótico, aunque en algunas porciones aún persisten células de la reacción inflamatoria crónica. Por la extensión de la fibrosis pensamos que pudiera ser suficiente para impermeabilizar el tubo y ser utilizado con éxito, en la sustitución esofágica.

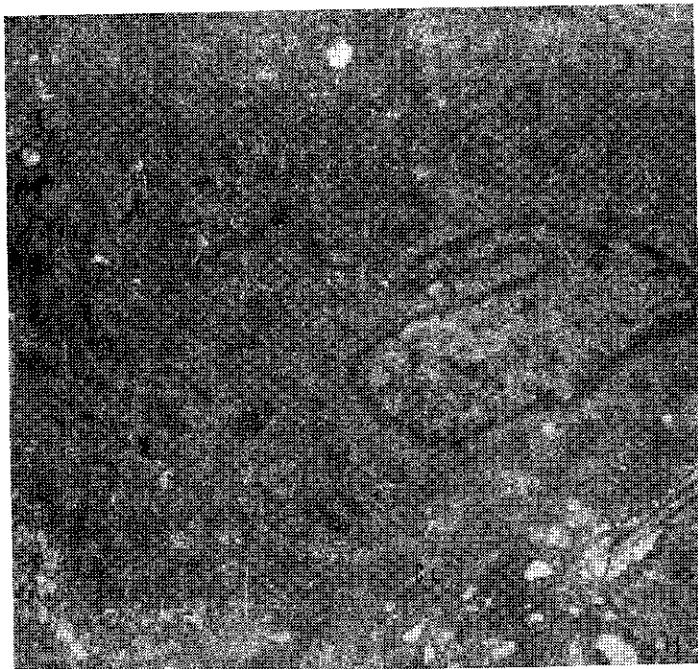


Fig. 11. Se observa porción de una célula productora de fibras que presenta núcleo (N), abundantes mitocondrias (M), canales de membranas lisas (CL), aparato de Golgi (G), punteado electrónico denso (flecha) y fibras que no presentan periodicidad axial en estrecha relación con la superficie celular (E) 9,074 x.

A pesar de que se observaron con gran frecuencia, células gigantes a cuerpo extraño, la fusión de membrana plasmática de mononucleares para formar dichas células descritas por otros autores (*Potek y Bernick, 1960; Gillman y Wright, 1966; Ham, 1969; Fox, 1970; Ancheta y Kouri, 1971;*

1974) se observó con muy baja frecuencia. Pensamos que encontrándonos ante una inflamación crónica de largo tiempo de evolución, también aquí se produzcan estas células, por división nuclear sucesiva, sin división citoplasmática (*Gómez Barry, 1964*). Los hallazgos estructurales corresponden con los obtenidos por Papadimitriou y Arches (1974).

Las células observadas, las cuales estaban rodeadas de fibras que no presentaban periodicidad axial y en estrecha relación con la membrana citoplasmática, no presentaron la estructura característica de los fibroblastos; el hecho de que las coloraciones histológicas especiales para fibras elásticas realizadas, demostrarán la presencia de las mismas, nos inclina a pensar que estas células son productoras de fibras elásticas, aunque como todos sabemos siempre ha existido preocupación por determinar con exactitud qué células producen las fibras elásticas y hasta ahora, se ha planteado que son producidas por los fubroblastos (*Fahrenbach y cols., 1966; Ross y Bornstein, 1969*) que es el criterio más generalizado; estudios más recientes realizados por Ross y Klebanoff, (1971) y Ross, (1971) plantean la producción de fibras elásticas por fibras musculares lisas. También se recogen publicaciones en la literatura encaminadas a determinar la estructura de la elastina planteándose que están constituidas por una parte fibrilar y otra amorfa (*Gross, 1949; Gotte y Serafini-Fracassini, 1963 y Gotte y cols., 1974*) trabajo en el cual se determinó una periodicidad axial de 40 Å para el componente fibrilar a altas magnificaciones (mayores de 250,000) y también destacan que la ultraestructura de la elastina pura varía de acuerdo con el método empleado para su extracción.

Estas células también se han encontrado por Valenti, (1974) en estudios realizados en la lámina propia de la mucosa intestinal de niños, con síndrome de mala absorción, mostrando semejantes características morfológicas.

No obstante estos planteamientos, nuevas investigaciones se llevaron a cabo con vistas a profundizar dichos hallazgos.

## RECONOCIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Esperanza Dovale y al Dr. J. Sanabria los comentarios críticos acerca del manuscrito, así como a los compañeros

Ma. E. Ramos, Caridad Aguilar y a los compañeros del Dpto. de Cirugía Experimental del ICBP Victoria de Girón por su valiosa colaboración para la realización de este trabajo.

#### REFERENCIAS

- ANCHETA O. Y KOURÍ J. Ultraestructura de la inflamación aséptica. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas* 3, 11, 1971.
- ANCHETA O. Y KOURÍ J. Estudio al microscopio óptico y electrónico de la población celular de la cavidad peritoneal de ratas durante la inflamación aséptica. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas* 5, 13, 1974.
- BERMAN EDGAR F. Plastic prothesis in carcinoma of the esophagus. Rationale and Techniques. *Surgical Clinics of N. A.* 36, 883, 1956.
- CARTER RICHARD. Use of the celestin indwelling plastic tube for inoperable carcinoma of the esophagus and cardia. *Surg. Gyn. Obt.* 117, 5, 1963.
- FAHRENBACII W. H., SANBERG L. B. AND CLEARY E. G. Ultrastructural studies on early elastogenesis. *The Anatomical Record* 155, 4, 1966.
- Fox M. O. Sobre el papel de los macrófagos en la defensa de los animales superiores. Tesis de Candidato a Doctor en Ciencias, CENIC, Cuba, 1970.
- GILLMAN T. AND WRIGHT L. J. Autoradiographic evidences suggesting in vivo transformation of some blood mononuclears in repair and fibrosis. *Nature. Lond.* 109, 1086, 1966.
- GLAUERT A. M. AND GLAUERT R. H. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 199, 1958.
- GRINDLEY JOHN H. AND NURIN ROCHESTER. Method of making tubes of polyethylene film for use in anastomoses of the common bile duct, trachea and pelvic colon 24, 22, 1948.
- GRINDLEY JOHN H. AND WAUGH JOHN M. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue. *AM. A. Archives of Surgery* 63, 288, 1951.
- GÓMEZ BARRY H. *Patología* T. 1, 276, 1964.
- GOTTE L. AND SERAFINI-FRACASSINO A. Electron microscope observations on the structures of elastin. *J. Atheroscler. Res.* 3, 1963.
- GOTTE L., GIRO M. G., VOLPIN D. AND HORNE R. W. The ultrastructural organization of elastin *J. Ultrastructure Research* 46, 1, January, 1974.
- GROSS J. The structure of elastic tissue as studied with the electron microscope. *The Journal of Experimental Medicine*, 89, 1949.

- HAUNA EDWARD A. The choice of an esophageal substitute. *Texas Medicine* 66, 64, 1970.
- HAM ARTHUR W. Tratado de Histología 210, Canadá, 1969.
- HARDIN CREIGHTON A. Experimental Repair of ureters by polyethylene tubing and ureteral and vessel grafts. *A. M. A. Arch of Surgery* 68, 57, 1954.
- HOLDEN M. P., WOOLER G. H. AND IONESCU M. I. Mosseau Barbin tubes for the treatment of the carcinoma of the lower two thirds of the eosophagus. *The British Journal of Surgery* 60, 5, 1973.
- INGRAHAM F. D. AND MATSON ALEXANDER E. Synthetic materials in Surgery. *New England J. of Medicine* 236, 362, 1947.
- KLOPP CALVIN T. AND ALFORD CRANDOLL. The use of polyethylene film and split-thickness skin graft in reconstruction of cervical esophageal and pharyngeal defects. *Surgery* 29, 231, 1951.
- LEININGER B. J. AND HINES EDWARD. Esophageal mucosal regeneration following experimental prosthetic replacement of the esophagus. *Surgery* 67, 468, 1970.
- LUFT J. A. *Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 409, 1961.
- MENACHEN RON WEXLER AND ZVI NEUMAN. Use of from rubber sponge in tie-over dressing for skin grafting. *Plastic and Reconstructive Surgery* 50, 3, Sep. 1972.
- MILLONING G. *Appl. Phys.* 32, 1637, (abstract) 1961.
- PAPADIMITRIOU J. M. AND ARCHER M. The morphology of murine foreing body multi-nucleate Giant Cells. *J. Ultrastructure Research* 49, 3, December 1974.
- POTEK P. R. AND BERNICK S. Time sequence studies of the reticuloendothelial cell response to foreign particles. *Anat. Rec.* 138, 27, 1960.
- REYNOLDS E. S. *J. Cell Biology* 17, 109, 1961.
- RIGDON R. H. Plastics and Inflammation: An in vivo Experimental Study *J. Biomed. Mater. Res.* 8, 97, 1974.
- ROSS R. AND BORNSTEIN P. The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. *The J. of Cell Biol.* 40, 2, 1969.
- ROSS R. The smooth muscle cell II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J. Cell Biology*, 50, 1971.
- ROSS R. AND KLEBANOFF SEYMOUR J. The mooth muscle cell. I. In vivo synthesis of connective tissue proteins. *J. Cell Biology*, 50, 1971.

- RUBIN LEONARD R. AND BROMBERG BERTRAM E. Long term human reaction of synthetic plastics. *Surgery Gynecology and Obstetrics*. 132, 605, April, 1971.
- SACKS LOUIS. A plastic prothesis for palliating carcinoma of the esophagus. *Surgery* 45, 377, 1959.
- SANFELIPPO PETER M. Celestin tube polliation for malignan esophageal obstruction. *The Surgical Clinics of North America* 53, 921, 1973.
- SEGURA J., MARTÍNEZ A. AND OLARTE H. Palliative treatment of esophageal obstrukcion with Goñi's plastic tube. *Surgery Gynecology and Obstetrics*, 122, 102, May, 1966.
- SELMAN E. (Comunicación personal) 1973.
- STUART D. W. *The Journal of Laryngology and Otology* 86, 317, April, 1972.
- USHER FRANCIS C. Tissue Reaction to plastic: a comparison of nylon, orlon, dacron, teflon and marlex A. M. A. *Archives of Surgery* 76, 997, 1958.
- VALENTI J., MOLINA J. R. Y KOURÍ J. Estudio ultraestructural de la mucosa duodenal en niños con enfermedad celíaca. *Revista Cub. Pediat.* (en prensa).