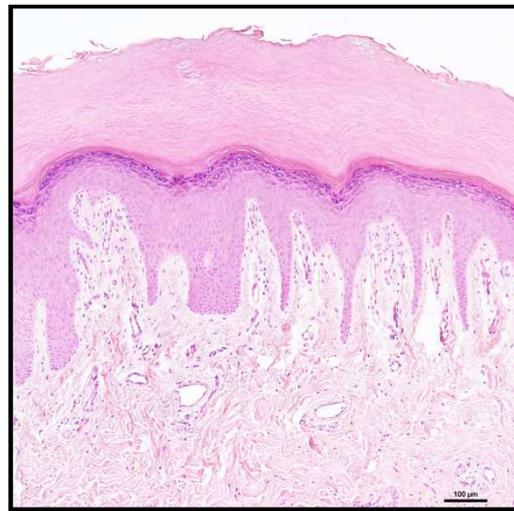
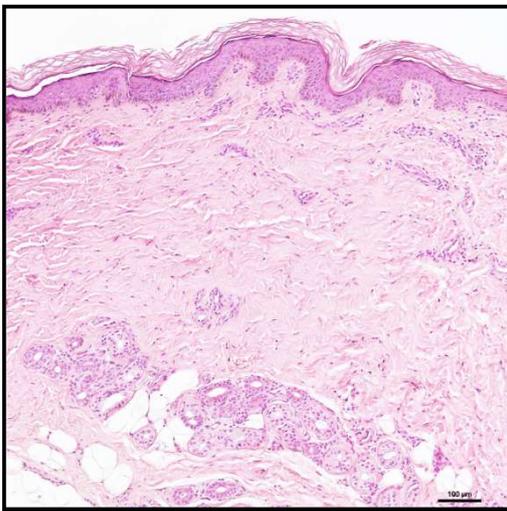


TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PIEL PALMOPLANTAR HUMANA



DOCTORANDO: ALEJANDRO VELA ROMERA

DIRECTORA: DRA. INGRID JOHANNA GARZÓN BELLO

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E
INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PIEL PALMOPLANTAR
HUMANA**

PROGRAMA DE BIOMEDICINA



Tesis doctoral de:

Alejandro Vela Romera

Realizado bajo la dirección de:

Dra. Ingrid Johanna Garzón Bello

Granada, 18 de Octubre de 2018

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Alejandro Vela Romera
ISBN: 978-84-1306-056-9
URI: <http://hdl.handle.net/10481/54527>

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y financiada por el Proyecto Nano GSKin (Acciones Complementarias AC17-0013 del Instituto de Salud Carlos III, Ministerio Español de Sanidad, Consumo y Bienestar Social). Además, parte de los resultados expuestos en la Presente Tesis Doctoral han sido publicados en el siguiente artículo científico original:

Characterization of the human ridged and non-ridged skin: a comprehensive histological, histochemical and immunohistochemical analysis.

Vela-Romera A, Carriel V, Martín-Piedra MA, Aneiros-Fernández J, Campos F, Chato-Astrain J, Prados-Olleta N, Campos A, Alaminos M, Garzón I.

Histochem Cell Biol. 2018 Aug 11. doi: 10.1007/s00418-018-1701-x. PMID: 30099600.

Factor de Impacto: 2.164; Área: Microscopy (2/10); Percentil: 85 (Q1).

This work was supported by award N° AC17/0013 (NanoGSKin) by ISCIII through AES 2017 and within the EuroNanoMed framework. Moreover, some of the results have been previously published in Histochem Cell Biol Journal.

Characterization of the human ridged and non-ridged skin: a comprehensive histological, histochemical and immunohistochemical analysis.

Vela-Romera A, Carriel V, Martín-Piedra MA, Aneiros-Fernández J, Campos F, Chato-Astrain J, Prados-Olleta N, Campos A, Alaminos M, Garzón I.

Histochem Cell Biol. 2018 Aug 11. doi: 10.1007/s00418-018-1701-x. PMID: 30099600.

Factor de Impacto: 2.164; Área: Microscopy (2/10); Percentil: 85 (Q1).

Oigo y olvido. Veo y recuerdo. Hago y entiendo.

Confucio (551-479 a.C.)

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis Doctoral es el resultado del trabajo realizado por el Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Universidad de Granada, ya que gracias a su apoyo, esfuerzo, conocimientos y experiencia, me han permitido alcanzar los objetivos propuestos.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi padre, madre, hermanos y novia, su apoyo y paciencia durante estos cuatro intensos años.

Gracias a mi directora de Tesis Doctoral la Prof. Ingrid Garzón Bello, por su empeño, grandes conocimientos y dedicación. Capaz de compatibilizar trabajo, sus peques, su afición y estudios de arte y sacar tanto tiempo para dedicármelo. Este tiempo me ha permitido conocer a una gran profesional y mejor persona.

Gracias al Prof. Miguel Alaminos Mingorance, por abrirme las puertas del Departamento y apoyarme en mis inquietudes personales. Gracias al Prof. Sebastián Carriel Araya que se volcó en el buen trascurso de esta investigación desde el principio. Por su asesoramiento científico y correcciones, siempre dispuestos a orientarme y a aclararme las muchas dudas que se presentaban diariamente, una ayuda esencial en este trabajo. Muchas gracias también por esos ratitos de conversación sobre fauna marina, nuestra afición en común.

Gracias al Prof. Miguel Ángel Martín Piedra por su ayuda y asesoramiento en el laboratorio y en recursos informáticos. Un experto tanto del microscopio como del telescopio.

Gracias al Prof. Antonio Campos Muñoz, capaz de coordinar y dirigir este Grupo de Investigación tan maravilloso como laureado.

Gracias a M^a Ángeles Robles Vizcaíno, mi maestra de laboratorio, siempre enseñando con una sonrisa en la cara a todos los novatos que nos iniciamos en técnicas histológicas del Departamento.

A mis compañeros de fatigas de investigación, Fernando, Boris, Dani, Gerson, Carlos y Jesús, por tantos momentos buenos y malos entre microscópios, muchas gracias.

A todos los profesores del Departamento de Histología, deseosos de ayudar y contribuir a solventar cualquier problema o duda que se nos ha presentado durante esta investigación.

No puedo dejar de agradecer también a otros departamentos como el de Anatomía y Cirugía por proporcionarme las muestras para este estudio, al personal de administración y servicios de la biblioteca por facilitarme artículos de difícil acceso, al centro de instrumentación científica por ayudarme con la microscopía electrónica.

Agradezco igualmente a mis pacientes, por su paciencia, al restarles tiempo para dedicárselo a este proyecto de investigación.

Por último, hago extensible mi agradecimiento al Dr. Nicolás Prados Oyeta, por su apoyo y ayuda a iniciarme en la aventura de la investigación.

Lo mejor de estos cuatro años, ha sido conocer y compartir momentos con todas estas personas maravillosas.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. FUNDAMENTO | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 2.1. Generalidades de la piel | 4 |
| • 2.1.1. Epidermis | 5 |
| • 2.1.2. Unión dermoepidérmica | 10 |
| • 2.1.3. Dermis | 11 |
| • 2.1.4. Hipodermis | 14 |
| • 2.1.5. Vascularización | 14 |
| • 2.1.6. Inervación | 16 |
| • 2.1.7. Anejos cutáneos | 24 |
| 2.2. La piel palmoplantar | 29 |
| • 2.2.1. Diferencias anatómicas de la piel palmoplantar | 30 |
| - 2.2.1.1. Ausencia de pelos en la piel palmoplantar | 30 |
| - 2.2.1.2. Diferencias en la coloración de la piel palmoplantar | 30 |
| - 2.2.1.3. Presencia de dermatoflifos en la piel palmoplantar | 31 |
| • 2.2.2. Diferencias histológicas de la piel palmoplantar | 32 |
| ▪ 2.2.2.1 Diferencias histológicas de la piel palmoplantar en la epidermis | 32 |
| - 2.2.2.1.1. Grosor epidérmico | 33 |
| - 2.2.2.1.2. Morfología y disposición de los queratinocitos | 34 |
| - 2.2.2.1.3. Estrato lúcido | 36 |
| - 2.2.2.1.4. Citoqueratinas | 37 |
| ▪ 2.2.2.2 Diferencias histológicas de la unión dermoepidérmica en la piel palmoplantar | 40 |
| ▪ 2.2.2.3. Diferencias histológicas de la dermis en la piel palmoplantar | 43 |
| - 2.2.2.3.1. Diferencias de dermis palmoplantar | 43 |
| - 2.2.2.3.2. Aumento de las glándulas sudoríparas ecrinas | 44 |
| - 2.2.2.3.3. Diferencias de la inervación | 45 |
| - 2.2.2.3.4. Diferencias vasculares | 47 |
| ▪ 2.2.2.4. Diferencias histológicas de la piel palmoplantar en la hipodermi | 48 |
| • 2.2.3. Diferencias funcionales de la piel palmoplantar. Interacción dermoepidérmica | 49 |
| • 2.2.4. Patologías de la piel palmoplantar | 51 |

| | |
|--|----|
| 3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS | 53 |
| 3.1. Objetivos | 54 |
| 3.2. Hipótesis | 55 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODO | 56 |
| 4.1. Muestras de piel humana | 57 |
| 4.2. Análisis histológico de las muestras de piel humana | 57 |
| 4.3. Análisis inmunohistoquímico de las muestras de piel humana | 58 |
| 4.4. Análisis histoquímico de las muestras de piel humana | 60 |
| 4.5. Análisis de microscopía electrónica de las muestras de piel humana | 61 |
| 4.6. Análisis estadístico de los datos obtenidos en las muestras de piel humana | 61 |
| 5. RESULTADOS | 62 |
| 5.1. Caracterización de la epidermis de la piel palmoplantar humana | 63 |
| • 5.1.1. Caracterización histológica por microscopía óptica | 63 |
| • 5.1.2. Caracterización histológica por microscopía electrónica | 66 |
| • 5.1.3. Caracterización inmunohistoquímica | 68 |
| 5.2. Caracterización de la membrana basal de la piel palmoplantar humana por inmunohistoquímica y microscopía electrónica | 73 |
| 5.3. Caracterización de la dermis de la piel palmoplantar humana | 75 |
| • 5.3.1. Cuantificación histoquímica de los componentes de la dermis | 75 |
| • 5.3.2. Caracterización inmunohistoquímica de los componentes de la dermis | 80 |
| • 5.3.3. Análisis de los vasos sanguíneos y linfáticos de la dermis | 81 |
| 5.4. Caracterización de la hipodermis de la piel palmoplantar humana | 82 |
| 6. DISCUSIÓN | 84 |
| 7. CONCLUSIONES | 91 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 94 |

1. FUNDAMENTO.

La composición, la función, la estructura y las características fundamentales de la piel varían según la región anatómica en la que se encuentre, es decir, la piel no es un órgano homogéneo. Las áreas anatómicas de piel localizadas en la palma de las manos y la planta de los pies, posee unas características muy específicas, tanto por su estructura como por su función. De esta forma, se tiende a diferenciar histológicamente la piel en dos subtipos, la piel palmoplantar (piel gruesa, lampiña o glabra) y la piel fina que cubre el resto de la superficie corporal. Es por ello, por lo que las patologías generales de la piel, en el área palmoplantar suelen mostrar diferencias clínicas e histopatológicas. Además de estas patologías comunes a la piel fina, encontramos unas patologías propias de la piel palmoplantar. Por lo tanto, además de las diferencias fisiológicas entre la piel fina y palmoplantar, se encuentran diferencias patológicas.

Después de realizar una búsqueda sobre las patologías y la histofisiología de la piel palmoplantar, se aprecia la escasa y antigua bibliografía. Debido a esto y a la cantidad de patologías encontradas en la clínica diaria, es de gran interés ahondar en el conocimiento de las características específicas de la piel palmoplantar. Para este propósito, en esta Tesis Doctoral, se plantea el estudio histológico, histoquímico e inmunohistoquímico de la piel palmoplantar por medio de su comparación con la piel fina humana de un mismo individuo.

Mediante un mejor conocimiento de la estructura y función de la piel palmoplantar podremos avanzar en nuestra práctica clínica diaria, para un mejor tratamiento de lesiones hiperqueratósicas y cicatrices, para mejorar y acelerar el proceso de curación de heridas (úlceras diabéticas y vasculares) o actuar frente a la pérdida de piel palmoplantar con un buen sustituto (traumatismos, quemados, úlceras, iatrogenias).

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. GENERALIDADES DE LA PIEL.

La piel es un órgano complejo que recubre la superficie corporal, pesa aproximadamente el 15% del peso total del organismo y posee un grosor de entre 1 y 4 mm (Kanitakis 2002). Dentro de las funciones de la piel destaca la protección mecánica e inmune, termorregulación, excreción, sensorial y metabólica, permitiendo así una adecuada relación e intercambio con el ambiente que nos rodea. No se puede hablar de la piel como un todo homogéneo, ya que cada parte corporal tiene unas peculiaridades que la hacen única (cuero cabelludo, cara, palmas, genitales). Tradicionalmente, se diferencian dos tipos de piel atendiendo a su grosor, la piel de la planta de los pies y palma de las manos se la conoce como piel gruesa, mientras que al resto de la piel se la considera fina (Geneser 2006). En la piel se distinguen tres capas, la más superficial es la **epidermis**, subyacente a ésta se encuentra la **dermis** y a un nivel más profundo está la **hipodermis** (figura 1).

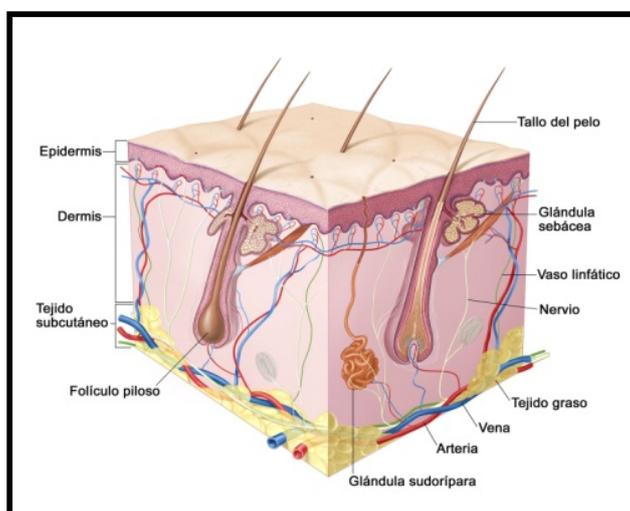


Figura 1. Esquema gráfico representativo de la estructura general de la piel, donde se aprecian las tres capas de la piel, su vascularización, inervación y parte de los anejos cutáneos. Procedente de recurso electrónico <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/piel/paciente/tratamiento-celulas-de-merkel-pdq>.

2.1.1. EPIDERMIS.

La epidermis, es un epitelio de revestimiento estratificado cuyo origen embriológico es el ectodermo, su función principal es actuar como barrera frente al medio externo y está constituida por cinco estratos donde la célula que predomina en número es el queratinocito (95% de las células epidérmicas) (figura 2A). Además, de los queratinocitos, se encuentran otros tipos de células como los melanocitos que se encargan de secretar melanina, las células de Langerhans cuya función principal es la protección inmunológica y las células de Merkel muy importantes en la percepción táctil de la piel (Geneser 2006; Kanitakis 2002).

En este contexto y tal como se mencionó anteriormente, el **queratinocito** (figura 2B) es el componente celular más abundante de la epidermis (figura 2A), es de origen ectodérmico y desde la capa basal epidérmica va ascendiendo por los diferentes estratos de la epidermis hasta llegar al estrato córneo donde se descama y se elimina. La principal función de los queratinocitos es formar la barrera epidérmica que separa el individuo del medio externo (Kanitakis 2002). Los marcadores queratinocíticos más relevantes estudiados en la presente Tesis Doctoral fueron las citoqueratinas (CK), 5/6, 7, 9, 10, marcadores de unión celular claudina-1 y desmoplakina 1/2 y marcadores de diferenciación epitelial como involucrina y filagrina.

Por otra parte, el **melanocito** se origina en la cresta neural y migra hacia la epidermis, localizándose en el estrato basal y manteniendo así, contacto con la membrana basal (1 por cada 4-10 queratinocitos), su densidad varía entre 500-2000 melanocitos por mm², variando según la zona anatómica (máximo en zona genital). El melanocito posee un cuerpo celular redondeado y ligeramente pigmentado, del que parten prolongaciones hacia los queratinocitos circundantes (figura 2B). El conjunto del melanocito y los queratinocitos con los que hace contacto, se denomina unidad melánica epidérmica. Además, carecen de desmosomas y hemidesmosomas que proporcionen un sistema de fijación a células vecinas y la membrana basal (figura 2A). Una vez descritas las principales características histológicas del melanocito es importante destacar su función principal, la producción de melanina. Dicha producción de melanina, es acumulada en unas organelas específicas llamadas melanosomas que serán transmitidas hacia el citoplasma de los queratinocitos adyacentes sobre el núcleo celular por medio de la penetración de las prolongaciones de los melanocitos. Este cúmulo melánico sobre el núcleo celular del queratinocito, proporciona una protección sobre los efectos nocivos de la radiación ultravioleta solar. En el interior del melanocito se encuentran melanosomas en diferentes estadios evolutivos y son identificables mediante técnicas de tinción con plata (Fontana-Masson) o por reacción histoenzimática DOPA. Su principal marcador antigénico es MART1/Melan-A detectado mediante inmunohistoquímica en la presente Tesis Doctoral. Además es importante destacar la presencia de otros marcadores como S100ab y vimentina. En este sentido,

es destacable que las diferencias raciales vienen dadas por la diferente actividad melanocítica, no por el número de melanocitos (Kanitakis 2002).

Una vez descrito el queratinocito y el melanocito es de gran importancia resaltar la **Célula de Langerhans**. La célula de Langerhans proviene, al igual que los macrófagos, de precursores de la médula ósea que llegan a la piel por medio del torrente sanguíneo, donde se diferencian a células de Langerhans maduras. Estas células, son células presentadores de antígeno pertenecientes al sistema inmune de la piel y su localización más frecuente es en el estrato espinoso (figura 2A), aunque se pueden observar en todos los estratos de la epidermis. Al igual que los melanocitos, no poseen uniones a las células circundantes, pero poseen prolongaciones que discurren entre los queratinocitos, formando así un entramado reticular cerrado a través de toda la epidermis suprabasal (figura 2B). Una vez que la célula de Langerhans capta un antígeno puede presentárselos a linfocitos T cercanos o migrar al ganglio linfático. La célula de Langerhans posee en su citoplasma gránulos de Birbeck, cuya morfología es discoide (a veces con forma de raqueta) y es positiva para marcadores de superficie CD1A, usado en la presente Tesis Doctoral y S100 (Kanitakis 2002).

Por último, y no menos importantes se encuentran las **Células de Merkel** las cuales poseen características neuroendocrinas y epiteliales, lo que hace dudar de su origen, atribuyéndole según autores dos posibles orígenes: la cresta neural (Tweedle 1978) y las células madre epidérmicas (Compton et al. 1990; Moll et al. 1990). La célula de Merkel es un mecanoreceptor de adaptación lenta responsable del tacto superficial y también se le atribuye una función endocrina o paracrina. La localización de las células de Merkel se restringe al estrato basal (figura 2A), su número es bajo, y varía según la localización anatómica, pero es más abundante en piel palmoplantar y en los folículos pilosos. En su citoplasma, poseen gránulos neurosecretorios y pequeños desmosomas que las unen a los queratinocitos cercanos (figura 2B). Las células de Merkel expresan la citoqueratina 20 (CK20) tal y como se ha demostrado en la presente Tesis Doctoral, enolasa específica neuronal, cromogranina, sinaptofisina y molécula de adhesión celular neural (N-CAM) (Kanitakis 2002; Tilling et al. 2014).

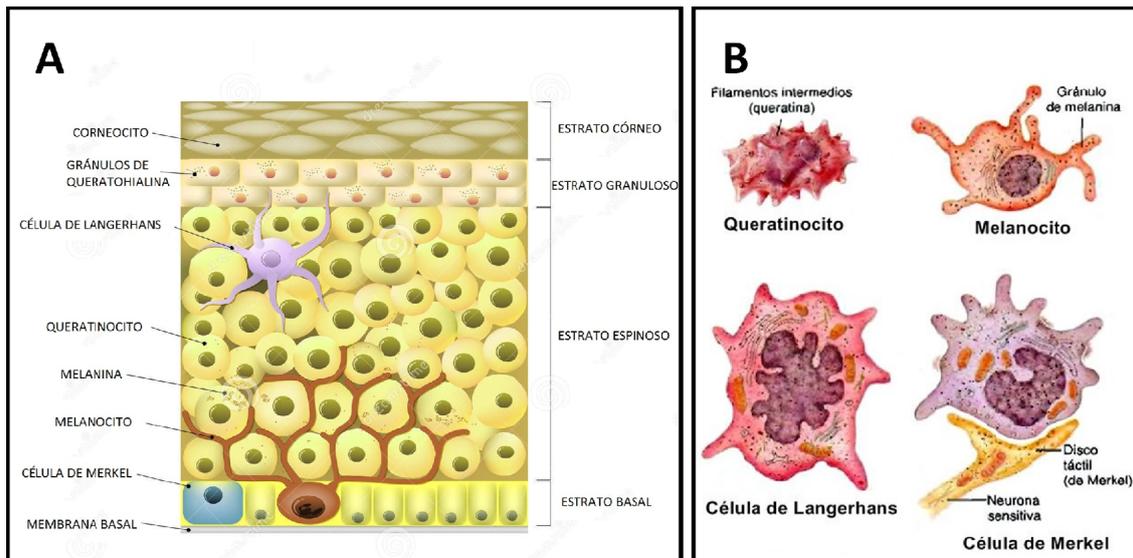


Figura 2. En el gráfico A se muestra de la estructura general de la epidermis donde se aprecian los diferentes estratos y la localización de los tipos celulares que en ella se encuentran. En el gráfico B se aprecia con más detalle la estructura de las células epidérmicas y sus gránulos de secreción. Imágenes procedentes de recurso electrónico <https://www.pinterest.es/pin/673358581761007197/> y <http://danifisiomed.blogspot.com/2017/10/celulas-de-la-epidermis.html>.

Las células epiteliales se unen entre sí con el objetivo de formar la barrera epidérmica, esta unión se lleva a cabo a partir de diversos mecanismos moleculares de unión. Estos mecanismos se definen como **complejos de unión**. Los complejos de unión potencian la adhesión entre células vecinas y se clasifican en uniones adherentes, comunicantes y ocluyentes. En primer lugar, las **uniones adherentes** circundan toda la célula, los puntos concretos de anclaje se denominan desmosomas o maculas adherentes y que contribuyen a la unión intercelular. Las uniones adherentes se relacionan con los filamentos de actina y filamentos intermedios del citoesqueleto, además favorecen la unión entre células epiteliales y la membrana basal denominándose hemidesmosomas. En segundo lugar, las **uniones comunicantes** permiten el movimiento transcitoplasmático de iones y moléculas pequeñas, acoplando su carga y su metabolismo. Finalmente, las **uniones ocluyentes** suelen localizarse en la zona más apical de la célula, rodean el contorno celular y cierran el espacio intercelular. Forman una barrera impermeable selectiva que impide el paso de compuestos a través de la membrana de dos células epiteliales adyacentes.

En la presente Tesis Doctoral se ha analizado la expresión de proteínas de unión de tipo adherente como la desmoplaquina (DSPK1/2) y proteínas de unión de tipo ocluyente como la Claudina-1. La desmoplaquina es una proteína de alto peso molecular predominante en la formación de los desmosomas que participa en la formación de los complejos cadherina-placoglobina de la membrana plasmática y en el anclaje de filamentos intermedios a los desmosomas. Por otra parte, la Claudina-1 se

requiere para prevenir la difusión paracelular de pequeñas moléculas a través de uniones estrechas en la epidermis y es necesaria para la función de barrera normal de la piel. La Claudina-1 es de gran importancia para la homeostasis normal del agua y para prevenir la pérdida de agua excesiva a través de la piel, probablemente a través de un efecto indirecto en los niveles de expresión de otras proteínas, ya que la Claudina-1 en sí parece ser prescindible para la formación de barrera de agua en las uniones estrechas de queratinocitos.

La epidermis se encuentra apoyada sobre la membrana basal. En este contexto, la membrana basal cumple un papel fundamental de soporte de la epidermis, permite el intercambio entre el tejido epitelial (epidermis) y el tejido conjuntivo (dermis) e interviene en procesos de diferenciación celular.

En concreto en la epidermis se diferencian cinco estratos paralelos a la membrana basal (figura 2A), el más interno, se sitúa sobre esta membrana, es el **estrato basal o germinativo**. El estrato basal se compone de una capa de células cilíndricas bajas o cúbicas (6-10 μ m de grosor) con núcleos ovalados, citoplasma basófilo con gran número de tonofibrillas donde predomina la expresión positiva de CK5, CK14 y se aprecian cúmulos de melanosomas sobre los núcleos. A este nivel, las células de la epidermis se renuevan debido a la presencia de células madre queratinocíticas (expresan Ki67 y PCNA), y se encuentran ancladas a la membrana basal por medio de uniones hemidesmosómicas y al resto de queratinocitos por medio de desmosomas, uniones ocluyentes o estrechas y comunicantes o tipo GAP (Kanitakis 2002; Welsch and Sobotta 2008). Además de los queratinocitos, en este estrato se localizan los melanocitos y las células de Merkel (figura 2A).

Superficial al estrato basal se encuentra el **estrato espinoso**, constituido por células con forma poligonal, con ligero aplanamiento horizontal en las capas superiores, los núcleos centrales son redondos, citoplasma de características basófilas, cuenta con 5-15 capas y un espesor de entre 10-15 μ m. Las células del estrato espinoso poseen un mayor contenido de tonofibrillas (filamentos de queratina) que las del estrato germinativo y predominan la expresión positiva de CK1 y CK10. Por otra parte, su citoplasma posee prolongaciones en forma de espinas, estas prolongaciones son uniones desmosómicas y de ahí que se denomine este estrato como espinoso. Así mismo, contiene gránulos ovoides de 10nm de longitud denominados gránulos laminados con numerosas láminas transversales en su interior de contenido lipídico que será vertido al espacio pericelular donde actuará como barrera hidrofílica. Los queratinocitos del estrato espinoso se encargan de la síntesis de involucrina, una proteína empaquetadora que posteriormente será depositada sobre la superficie interna de la membrana plasmática (Kanitakis 2002; Welsch and Sobotta 2008). Es de destacar, que las células de Langerhans detalladas previamente se localizan en el estrato espinoso.

Descrito el estrato basal y el estrato granuloso en sentido ascendente se encuentra el **estrato granuloso**, el cual se compone de 3-5 capas de células aplanadas y un grosor de 25 μm . El queratinocito que se ubica en este estrato, deja de producir queratina e involucrina y su citoplasma empieza a almacenar gran cantidad de gránulos basófilos denominados gránulos de queratohialina junto con haces densos de filamentos de queratina. Los gránulos de queratohialina contienen profilagrina que se transforma en filagrina en el estrato córneo. La filagrina tiene como función la condensación y unión de los haces de filamentos de queratina. Por otra parte, los gránulos laminados que se encuentran en la periferia del citoplasma, vacían su contenido lipídico al espacio extracelular, mientras que la involucrina se deposita en la superficie interna de la membrana plasmática. Por último, se produce una liberación de enzimas lisosómica que degrada todas las organelas, salvo los filamentos y queratohialina (Kanitakis 2002; Welsch and Sobotta 2008).

Superficial al estrato granular se identifica el **estrato lúcido**, propio de la piel palmoplantar. Este estrato se distingue por ser una zona muy delgada de características eosinófilas y escasas capas de células aplanadas densamente empaquetadas donde no se aprecian los núcleos. El estrato lúcido posee dos capas, 1) capa intermedia de Ranvier (supragranulosa), en esta capa los queratinocitos no contienen gránulos de queratohialina y no muestra refringencia propia de la queratina, 2) estrato lúcido propio (subcorneo), los queratinocitos muestran unos contornos degenerados, aplanados y translúcidos, de citoplasma con contenido homogéneo. El estrato lúcido se observa en humanos y animales, cuando la epidermis posee un estrato granular grueso, así mismo, en este estrato se encuentran enzimas y compuestos sulfurados procedentes del interior celular del estrato granuloso. La conjunción de enzimas y compuestos sulfurados forman una barrera bioquímica semipermeable de moléculas frente a agentes químicos y biológicos, un tampón bioquímico que actúa de filtro selectivo entre las células vivas y el medio que nos rodea (barrera epiplásmica) (Zirra 1976).

Por último, el estrato más superficial de la epidermis es el **estrato córneo**, donde las células son anucleadas, planas, hexagonales, contienen una gran densidad de queratinas y tienen un grosor de aproximadamente 30-40 μm . En el estrato córneo los queratinocitos reciben el nombre de corneocitos y se distingue por ser un estrato más grueso y eosinófilo (Kanitakis 2002; Welsch and Sobotta 2008).

Hasta el momento se han descrito las diferentes poblaciones celulares de la epidermis, junto con los estratos o capas que la componen. En este contexto, es importante poner de relieve que el 90% de la población celular de la epidermis está compuesta por queratinocitos y un 10% restante corresponde a poblaciones celulares constituidas por células de melanocitos, Langerhans y Merkel. Los queratinocitos de la epidermis experimentan un proceso evolutivo que va desde el estrato basal al córneo

denominado **proceso de queratinización** (figura 3). En esta evolución por los cinco estratos epidérmicos, se produce una diferenciación del queratinocito que conlleva unos cambios morfológicos y bioquímicos. Los cambios morfológicos incluyen la aparición de diferentes gránulos, contorno celular, desaparición del núcleo y demás organelas. Los cambios bioquímicos están representados por deshidratación, expresión de diferentes queratinas, proteínas de unión y otras proteínas como es el caso de la filagrina y la involucrina. En concreto, la filagrina se une a los filamentos intermedios de queratina y promueve la formación de enlaces disulfuro entre los filamentos intermedios durante la diferenciación terminal de la epidermis. Unido al proceso de diferenciación terminal de los queratinocitos, la expresión de involucrina en los estratos apicales marca el proceso de diferenciación terminal de queratinocitos ya que participa en la formación de la envoltura insoluble de los queratinocitos del estrato córneo. En general, el proceso de queratinización finaliza con la descamación como consecuencia de la pérdida gradual de desmosomas que evolucionan hasta convertirse en corneodesmosomas los cuales son degradados por enzimas con el objeto de llegar a la descamación final (Ishida-Yamamoto and Igawa 2014; Pavelka and Roth 2005).

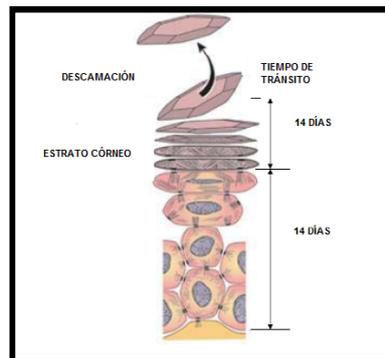


Figura 3. Esquema gráfico representativo del proceso de queratinización y la posterior descamación de los queratinocitos epidérmicos. Imagen procedente de recurso electrónico <http://www.dhermaestetica.com/category/antiarrugas/page/2/>.

2.1.2. UNIÓN DERMOEPIDÉRMICA.

El tejido epitelial (epidermis) está separado del tejido conjuntivo (dermis) subyacente por una capa extracelular de sostén denominada **membrana basal**. Ambos tejidos interactúan gracias a la unión dermoepidérmica formada por la membrana basal sintetizada por los queratinocitos del estrato basal y los fibroblastos de la dermis. La interacción epidermis y dermis permite el intercambio de nutrientes e interviene en los procesos de diferenciación y maduración de ambos tejidos, además de permitir el

paso celular durante procesos inflamatorios e inmunológicos. La membrana basal tiene forma ondulada, de esta manera la epidermis emite invaginaciones hacia la dermis llamadas crestas epidérmicas y a su vez, la dermis emite evaginaciones hacia la epidermis llamadas papilas dérmicas. La membrana basal está constituida por la lámina basal cercana al epitelio y la lámina reticular en contacto con el tejido conjuntivo. A su vez la **lámina basal** está formada por la lámina lúcida en contacto con la membrana celular y subyacente la lámina densa, compuesta por colágeno IV formando un reticulado filamentoso, y otras proteínas de notada importancia como la laminina, encargada de fijar las células epiteliales a la membrana basal, la glicoproteína entactina que une el colágeno IV con la laminina y por el proteoglicano perlecano. En la **lámina reticular** se encuentran abundantes fibras reticulares rodeadas de proteínas y polisacáridos (Welsch and Sobotta 2008). Finalmente, en la membrana basal se distinguen numerosos antígenos que podemos identificar por medio de técnicas inmunohistoquímicas, entre los más representativos destacan en la lámina lúcida, varios tipos de laminina (5, 6 y 10), y en la lámina densa resalta la presencia de colágeno IV y laminina 5 (Kanitakis 2002).

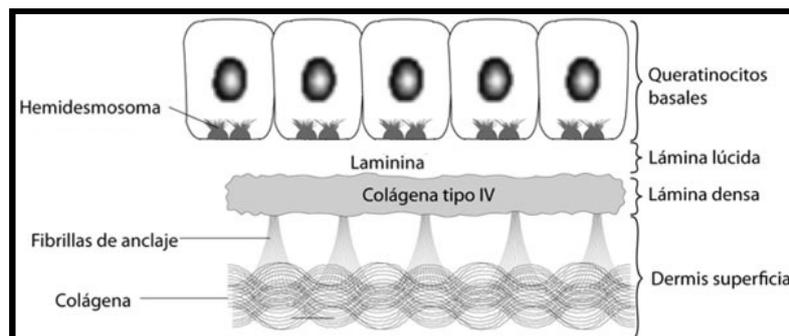


Figura 4. Gráfico representativo de la estructura de la membrana basal y su localización en la unión dermoepidérmica. Imagen procedente de recurso electrónico <http://reader.digitalbooks.pro/book/preview/35923/chap03>.

2.1.3. DERMIS.

Subyacente a la membrana basal se encuentra la dermis, una capa de tejido conjuntivo de origen mesodérmico que sirve de soporte estructural a la epidermis, le proporciona un adecuado aporte vascular para el intercambio metabólico y una abundante inervación nerviosa. La dermis está compuesta por diversas poblaciones celulares donde destacan principalmente los fibroblastos, células dendríticas y mastocitos. Además de su componente celular, destaca la presencia de matriz extracelular, cuya composición es de carácter fibrilar y no fibrilar. El componente fibrilar (fibras

colágenas, elásticas y reticulares) se encarga principalmente de otorgar las propiedades físicas y mecánicas a la piel. Por otra parte, el componente no fibrilar (proteoglicanos, glicosaminoglicanos y glicoproteínas multiadhesivas) permite la adhesión de las células a la matriz extracelular y mantiene el equilibrio ácido-básico en la dermis.

El **componente celular** de la dermis (Kanitakis 2002) está representado principalmente por los fibroblastos, son las células fundamentales del tejido conectivo, encargadas de sintetizar los componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular. Desde el punto de vista macroscópico y microscópico, los fibroblastos tienen forma estrellada y un abundante retículo endoplasmático, además de poseer proteínas tales como la vimentina, FibAS o prolina-4 hidroxilasa. En cuanto al proceso de diferenciación celular de los fibroblastos, se denomina fibrocito a su forma quiescente y más pequeña, fibroclasto cuando poseen actividad fagocitaria y miofibroblasto cuando poseen capacidad contráctil. Otra de las poblaciones celulares a destacar en la dermis son las células dendríticas, de forma estrellada, son macrófagos presentadores de antígeno con función inmunitaria. Las células dendríticas se distinguen en dos tipos, el tipo I que se encuentran rodeando a los capilares de la dermis papilar, rodeando a los adenómeros de las glándulas sudoríparas y en los septos de la hipodermis; expresan marcadores mesenquimales como vimentina y el tipo II que se localizan en la dermis media y profunda y en folículos pilosos, y expresan CD34. Otras células frecuentes en la dermis son los mastocitos, mediadores en procesos inflamatorios y alérgicos, son células mononucleares producidas en la médula ósea que se distribuyen vía hemática hasta llegar al tejido conjuntivo. Los mastocitos contienen numerosos gránulos citoplasmáticos con contenido de histamina, heparina y serotonina, y son visibles en la técnica de azul de Toluidina o con inmunohistoquímica (triptasa y quimasa, proteína c-KIT).

Tras la descripción del componente celular, cabe resaltar la matriz extracelular con su componente fibrilar y no fibrilar. En lo que respecta al **componente fibrilar**, contiene un 90% de colágeno, principalmente del tipo I y III, detectados por inmunohistoquímica en la presente Tesis Doctoral. Se encuentra agrupados en forma de haces verticales en la dermis papilar y horizontales de mayor grosor en la dermis reticular. Las propiedades mecánicas de la piel están determinadas por la orientación de las fibras de colágeno (Fontanella et al. 2014) y son visibles con la técnica histoquímica de Picrosirius, utilizada en este estudio. Otro de los componentes fibrilares de la matriz extracelular de la dermis son las fibras elásticas responsables de la capacidad retráctil de la piel, son delgadas en la dermis papilar y de mayor grosor en la dermis reticular donde están más horizontalizadas. La visualización histológica de las fibras elásticas se lleva a cabo mediante la técnica de la Orceína como se muestra en el desarrollo de esta Tesis Doctoral y muestran variaciones dependientes de la edad y de las áreas corporales. En menor proporción se encuentran las fibras reticulares

compuestas principalmente por colágeno tipo III, visibles con tinciones histoquímicas de plata como la reticulina de Gomori o bien, técnicas inmunohistoquímicas de detección de colágeno III, ambas usadas en la presente Tesis Doctoral.

Por otra parte, el **componente no fibrilar** de la dermis consiste en macromoléculas existentes entre las fibras y células de la dermis, dentro de dichos componentes destaca la presencia de proteoglicanos (Decorina, Versicano y Biglicano) los cuales se han identificado mediante técnicas inmunohistoquímicas e histoquímicas mediante la tinción de azul alciano, así como glicosaminoglicanos y glicoproteínas. Estos componentes facilitan la difusión de oxígeno y nutrientes entre los vasos y el componente celular del tejido.

Una vez descritos los principales componentes dérmicos cabe destacar que el grosor de la dermis varía según su localización anatómica, siendo más gruesa en la espalda y la región palmo-plantar (Kanitakis 2002; Landsman et al. 2009). La dermis topográficamente está compuesta por dos regiones, la dermis papilar y la dermis reticular. La **dermis papilar** es la más superficial, constituida por tejido conectivo laxo adulto destacando la presencia de componente no fibrilar de la dermis y en menor cantidad el componente fibrilar, en forma de digitaciones ascendentes (papilas dérmicas) que se alternan con digitaciones descendentes de la epidermis (crestas epidérmicas). Este sistema alternado de interdigitaciones produce un aumento en la superficie de contacto entre dermis y epidermis. En la dermis papilar destaca la presencia de vasos (asas capilares), terminaciones nerviosas, haces de colágeno (tipo III principalmente) y delgadas fibras elásticas, ambas perpendiculares a la membrana basal. A nivel de las papilas dérmicas se concentra la mayor parte de mecanorreceptores. Por otro lado, la **dermis reticular** es más profunda, y está compuesta por tejido conectivo denso adulto no modelado que a diferencia de la dermis papilar, está principalmente constituida por una mayor cantidad de componente fibrilar representado mayoritariamente por colágeno (tipo I), haces de mayor tamaño y paralelos a la membrana basal, junto con fibras elásticas de mayor grosor.

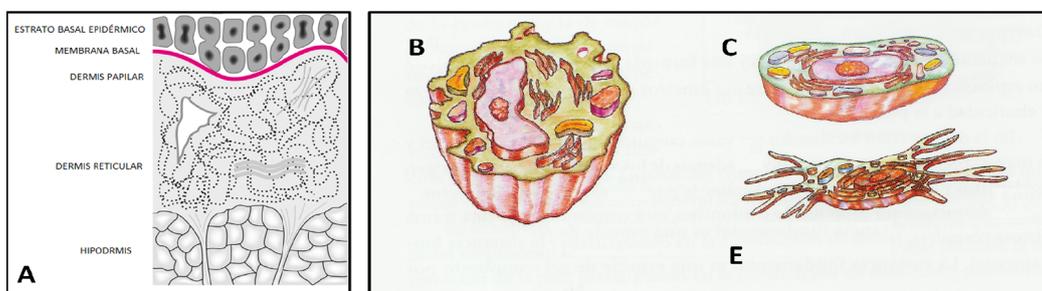


Figura 5. El gráfico A representa la estructura de las dos regiones de la dermis, la dermis papilar y la dermis reticular. Seguidamente se muestran las células más representativas que podemos encontrar en la dermis como son el dendrocito B, el mastocito C y el fibroblasto D. Imágenes procedente de recurso electrónico <https://accessmedicina.mhmedical.com/Content.aspx?bookid=1434§ionid=94945701> y <https://jaldun.com/la-dermis>.

2.1.4. HIPODERMIS.

Por último, la capa más profunda de la piel es la hipodermis o tejido subcutáneo, de origen mesodérmico, formado por tejido conjuntivo laxo y adiposo cuyas funciones principales son las de protección mecánica, aislamiento térmico y reserva energética mediante el almacenaje lipídico. Los adipocitos suelen aparecer vacíos por el tratamiento histológico con xileno de las muestras y expresan la proteína S100 y vimentina la cual ha sido estudiada en la presente Tesis Doctoral. Los adipocitos se reúnen en lóbulos primarios y secundarios dejando septos de tejido conjuntivo entre ellos, en los que se pueden encontrar plexos vasculonerviosos (Kanitakis 2002; Geneser 2006).

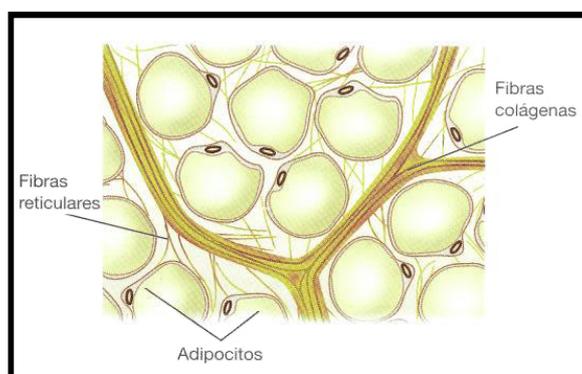


Figura 6. Gráfico representativo de la estructura de la hipodermis, donde se aprecian los adipocitos rodeados y empaquetados por septos fibrosos de colágeno y reticulina, los cuales los agrupan en lóbulos primarios y secundarios. Imagen procedente de recurso electrónico https://tuniaf.com/?h=206101011_478c69ed94e_5&h_l=&h_5=sub_id_2&h_2=14399615#.

2.1.5. VASCULARIZACION.

La dermis está ampliamente vascularizada para permitir un correcto aporte nutritivo, termorregulación, curación de heridas, reacción inmune y control de la presión arterial. La piel en su porción dérmica consta de **dos plexos arteriovenosos** horizontales unidos por numerosos vasos comunicantes dispuestos verticalmente. En primer lugar, el plexo profundo se sitúa en la unión dermis-hipodermis y proporciona nutrición a los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas. En segundo lugar, el plexo superficial se encuentra en la unión de la dermis papilar-reticular y proporciona vascularización a las papilas dérmicas por medio de un asa vascular, asciende la arteriola que llega al capilar, de donde posteriormente va descendiendo la vénula. El asa vascular en determinadas zonas anatómicas como en los dedos, el lecho ungueal, nariz y oreja, posee unas comunicaciones entre la arteriola y la vénula, llamado shunt

arteriovenoso (o cuerpo glómico neuromioarterial) controlado por fibras amielínicas. El shunt arteriovenoso, permite el paso sanguíneo desde la arteriola a la vénula sin pasar por el capilar. A nivel de la hipodermis en el plexo profundo (diámetro de entre 50-100 μ m) las arteriolas y vénulas son de mayor tamaño que en el plexo superficial (diámetro de unos 25 μ m). En este sentido, gran parte de los capilares que se alojan en la dermis papilar son de tipo fenestrado (diámetro de entre 5-15 μ m) con una capa externa de periocitos (contráctiles y con miofilamentos) discontinua rodeada de una membrana basal. El endotelio que reviste dichas estructuras vasculares presente expresión positiva de CD31, un marcador específico que interviene en la adhesión y señalización celular. Además de la expresión de CD31, las células endoteliales de la piel poseen grandes haces de vimentina y filamentos de actina, los cuales se pueden detectar mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas utilizando marcadores como la actina de musculo liso (SMA-ACT) y esmotelina.

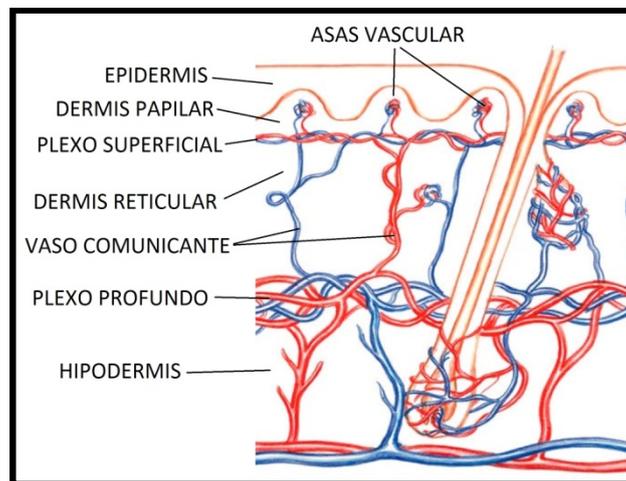


Figura 7. Gráfico representativo de la estructura de la red arteriovenosa de la piel, donde se diferencian los plexos superficial y profundos, las asas vasculares a nivel de la dermis papilar y los vasos comunicantes entre los dos plexos. Procedente de recurso electrónico <https://www.elenaconde.com/diferencias-los-injertos-epidermicos-dermo-epidermicos-sello/>.

Además del sistema vascular arteriovenoso anteriormente descrito, se encuentra el **sistema vascular linfático**, que juega un importante papel en la regulación de la presión del líquido intersticial, el drenaje del líquido extracelular y la reacción inmune. El sistema linfático inicia en los capilares linfáticos ciegos que forman un plexo linfático superficial a nivel subpapilar y otro plexo linfático profundo inferior al plexo profundo vascular. El entramado linfático está muy desarrollado a nivel digital, palmoplantar y en el escroto. En concreto, los vasos linfáticos son apreciables mediante la técnica histoquímica de orceína ya que permite marcar su capa elástica. Por otra parte, el endotelio linfático expresa podoplanina (D2-40), proteína detectable gracias a las técnicas inmunohistoquímicas como las usadas en este estudio. A excepción de los

vasos linfáticos más superficiales, los vasos linfáticos más profundos poseen válvulas con capacidad de movimiento y están desprovistos de lámina basal y pericitos. Los vasos linfáticos de la dermis profunda (principalmente en miembros inferiores) poseen ocasionalmente capa muscular y no elástica y sus células endoteliales están unidas a las fibras de colágeno y elastina cercanas por medio de filamentos de anclaje que se extienden por el aumento de presión tisular y favorece el drenaje del exceso de líquido intersticial (Kanitakis 2002).

2.1.6. INERVACIÓN.

La piel es ricamente inervada y consta de una porción aferente (sensitiva) que da información al sistema nervioso central (SNC) sobre las percepciones del exterior (tacto, presión, vibración, dolor, temperatura, picor). Esta información es mediada por sensores mielinizados, fibras amielínicas, terminaciones libres y corpúsculos táctiles. La porción eferente (motora) está compuesta por fibras amielínicas simpáticas que regulan la vasodilatación, la secreción de sudor y la piloerección. El tejido nervioso en la piel es difícil de ver mediante la utilización de técnicas rutinarias por lo que es necesario usar técnicas de inmunohistoquímica como detección de proteína de neurofilamento para ver los axones, proteína S100 para las células de Schwann, y vimentina para fibroblastos perineurales, mientras que para identificar las terminaciones libres es necesaria la detección de proteína N-CAM y PGP9.5 (Kanitakis 2002).

Cada tipo de piel (fina y palmoplantar) está inervada por unos tipos de mecanorreceptores e inervación diferente, esto hace que cada tipo de piel tenga percepciones diferentes las cuales se representan y procesan en la médula espinal y el cerebro, permitiendo la riqueza de las percepciones táctiles (Zimmerman et al. 2014). En la piel destacan cuatro tipos de terminaciones sensoriales especializadas identificadas histológicamente: corpúsculos de Meissner y Pacini y los complejos de neuronas celulares de Merkel y terminaciones de Ruffini. La estructura histológica de cada tipo de terminación le confiere diferentes características mecánicas, para producir una señal nerviosa aferente ante una estimulación específica (Zimmerman et al. 2014; Hall and Guyton 2016; Macefield 2005). En este contexto, los diferentes tipos de mecanorreceptores sensoriales (Meissner, Pacini, Merkel y Ruffini) se pueden clasificar de dos formas, En primer lugar, según su mecanismo de adaptación (receptor de adaptación rápida o lenta) y en segundo lugar, según su campo receptivo (campo receptivo pequeño y grande), es decir, la extensión del área sensible a inducir la activación del mecanoreceptor.

Según el mecanismo de adaptación:

- Receptores de **adaptación rápida** (fásicos): detectan cambios en la intensidad del estímulo, pero dejan rápidamente de transmitir el impulso hasta que el estímulo aumente o disminuya. Los corpúsculos de Meissner y Pacini se excitan durante unos milisegundos con la presión brusca y a continuación termina su excitación, aunque siga el estímulo, luego vuelve a excitarse si cede la presión. Los receptores de adaptación rápida no responden a estímulos constantes, solo responden ante modificaciones de dicho estímulo.
- Receptores de **adaptación lenta** (tónicos): frente a un estímulo constante, se lleva a cabo la transmisión de la señal nerviosa hacia el sistema nervioso central (SNC), manteniendo al SNC en constante alerta sobre la situación del cuerpo y su relación con el medio. Un ejemplo de estos receptores de adaptación lenta son las células de Merkel, los corpúsculos de Ruffini y los receptores para el dolor.

Según el tamaño del campo receptivo:

- Receptores con **campo receptivo pequeño**: son mecanorreceptores circulares u ovoides de sensibilidad máxima, destacan los corpúsculos de Meissner y las células de Merkel (los mecanorreceptores más externos tienen mayor discriminación).
- Receptores con **campo receptivo grande**: son mecanorreceptores con bordes grandes y poco definidos, como los corpúsculos de Pacini y de Ruffini (los mecanorreceptores más internos tienen menor discriminación).

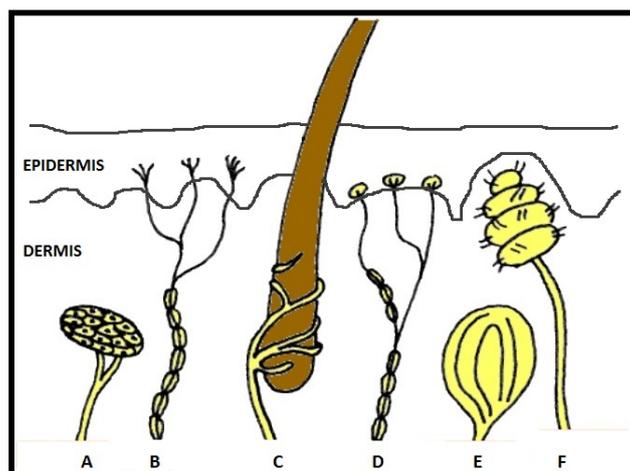


Figura 8. Esquema gráfico representativo de la estructura de los receptores sensitivos de la piel: A) Terminaciones de Ruffini, B) terminaciones nerviosas libres, C) Receptor sensorial del cabello, D) Células de Merkel, E) Corpúsculo de Pacini, F) Corpúsculo de Meissner. Imagen procedente de recurso electrónico <http://elorganodeltactoct.blogspot.com/p/tema-3.html>.

Respecto a la transmisión de señales nerviosas, las sensibilidades más discriminativa usan fibras rápidas, mientras que las sensaciones más groseras (como el cosquilleo y el tacto poco localizado) usan fibras más lentas y pequeñas (Hall and Guyton 2016). En este sentido, los tipos de fibras de conducción nerviosa que destacan en la piel humana son en primer lugar, las **fibras mielínicas gruesas y rápidas (30-70 m/s) tipo A α y A β** presentes en los corpúsculos de Meissner, Pacini, terminaciones de Ruffini y en los receptores pilosos. En segundo lugar, destacan las **fibras mielínicas tipo A δ (5-30 m/s) y fibras mielínicas más finas tipo C (1-2 m/s)** en las terminaciones libres.

Una vez descritas las características de excitación y conducción de los principales receptores de la piel, en el siguiente apartado de la presente Tesis Doctoral se describirán con detalle los receptores que se encuentran en la piel humana (fina y palmoplantar), destacando principalmente las terminaciones libres, las células de Merkel, el corpúsculo de Meissner, corpúsculo de Pacini, corpúsculo de Ruffini y el órgano terminal del pelo.

1) Terminaciones libres: En la epidermis estas terminaciones finalizan en el estrato granuloso, son terminaciones no encapsuladas que carecen de capsula de tejido conectivo, tienen múltiples modalidades sensoriales como tacto y temperatura, sin distinción morfológica aparente. Estas terminaciones libres, rodean la mayoría de los folículos pilosos y se fijan a las vainas radicales externas (Ross and Pawlina 2016; Hall and Guyton 2016) (figura 8, B)

2) Células de Merkel: Hay dos hipótesis sobre el origen de las Células de Merkel, la cresta neural (Tweedle 1978) o de la epidermis (Moll et al. 1990; Compton et al. 1990). Histológicamente, las células de Merkel son células claras del estrato basal del epitelio, de unas 10 μ m de diámetro que se localizan en la piel y mucosa (figura 8, D). Las células de Merkel cuentan con tejido nervioso cercano y están especializadas en la percepción nerviosa de la presión. Las células de Merkel aparecen ancladas a la membrana basal y poseen protrusiones con forma de espinas de longitudes variables que se anclan a los queratinocitos cercanos, además poseen unos desmosomas pequeños que las unen a queratinocitos próximos (figura 9). Las células de Merkel poseen unos gránulos de secreción (de unos 100nm) cerca de la unión con el nervio y cuentan con melanosomas procedentes de los melanocitos, se diferencia de otras células no-queratinocíticas por la falta de dendritas (Munde et al. 2013). Las células de Merkel están concentradas en la cresta de las glándulas ecrinas de la piel palmoplantar, en racimos cerca de los folículos pilosos en la piel fina y en ciertas mucosas. La densidad de las células de Merkel varía según la zona anatómica de la piel, dependiendo de lo involucradas que estén en la percepción táctil. Los pulpejos de los dedos de pies y manos es donde mayor densidad de células de Merkel podemos encontrar. Dichas células son abundantes en los labios, parte anterior del paladar duro y la encía (Munde et al. 2013), en yemas de los dedos y con menor número en zonas pilosas, (Lacour et al.

1991). Las células de Merkel presentan patrones diferentes de distribución en la epidermis: a) en grupos, b) disposiciones lineales y arciformes, c) dispersas.

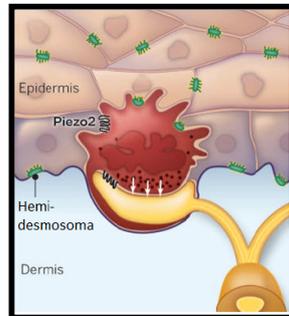


Figura 9. Gráfico representativo de una célula de Merkel donde se aprecia su localización a nivel del estrato basal de la epidermis y su relación con las células vecinas (Zimmerman et al. 2014).

Desde el punto de vista funcional, las células de Merkel permiten percibir un estímulo de manera continua. Las células de Merkel junto con los receptores del corpúsculo de Meissner cumplen funciones importantes en la localización de sensaciones táctiles y en la determinación de texturas (Hall and Guyton 2016; Macefield 2005). Para identificar histológicamente las células de Merkel es necesaria la utilización de técnicas inmunohistoquímicas con marcadores específicos como la citoqueratina 20 (CK20) (Munde et al. 2013). En la presente Tesis doctoral, se ha utilizado este marcador para determinar la presencia de células de Merkel en la piel humana.

3) Corpúsculo de Meissner: Desde el punto de vista histológico, los corpúsculos de Meissner presentan una estructura encapsulada, de morfología ovalada de aproximadamente 30-75 μm de ancho y 150 μm de largo (Dillon et al. 2001) o una longitud de entre 80-150 μm y 20-40 μm de diámetro (Vega et al. 2012). Desde el punto de vista de su localización, los corpúsculos de Meissner se alojan en las papilas dérmicas a nivel subepidérmico. Los corpúsculos de Meissner exteriormente contienen uniones de colágeno que van desde su cápsula hasta los hemidesmosomas de los queratinocitos basales de la epidermis, los cuales transmiten las presiones desde la epidermis hasta los corpúsculos de Meissner (Dillon et al. 2001). El corpúsculo de Meissner está compuesto de células lamelares aplanadas (figura 10) que forman una estructura elipsoide perpendicular a la superficie de la piel, con uno o más axones tortuosos (Zimmerman et al. 2014), rodeadas de matriz extracelular en el núcleo interno y una membrana basal (laminina, colágeno IV y perlacano) en la cápsula externa (Vega et al. 2009). Cada unidad en forma de disco, consiste en una dilatación terminal axonal amielínica rodeada por células lamelares derivadas de células de Schwann. Estas unidades discoides están dentadas en sus superficies externas y son

lisas en sus superficies internas. Durante la estimulación, la fuerza se transfiere a través de fibras de colágeno conectadas a los bordes dentados de las células lamelares, lo que conduce a la flexión de los terminales del axón hasta que se comprime el centro de la célula laminar lisa. Esta compresión genera potenciales de acción durante el inicio del estímulo y produce una respuesta de adaptación rápida (Zimmerman et al. 2014). El corpúsculo de Meissner consta de tres partes: a) un axón central derivado de una fibra nerviosa mielinizada $A\alpha$ o $A\beta$, aunque también ha sido descritos axones accesorios lo que hace pensar otras posibles funciones como la nociceptora; b) células gliales no mielínicas procedentes de la modificación y especialización de células de Schwann llamadas células lamelares, que se distribuyen paralelos a la superficie de la piel, poseen membrana basal y su matriz extracelular contiene colágeno; c) cápsula fibroblástica incompleta de origen endoneural y perineural (Vega et al. 2012). Los corpúsculos de Meissner de la piel palmoplantar poseen fibras nerviosas aferentes $A\alpha\beta$ mecanorreceptoras, pero además poseen fibras C nociceptoras. Los corpúsculos de Meissner poseen tres tipo de inervación: 1) axón de gran calibre mielinificado que expresan neurofilamento y proteína mielínica básica (MBP), 2) axón fino que expresan CGRP y sustancia P, 3) axón fino que expresa VR1 (Vega et al. 2009).

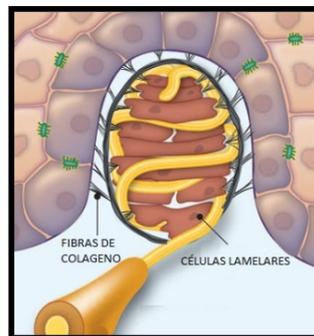


Figura 10. Gráfico representativo del corpúsculo de Meissner donde se aprecia su unión a la membrana basal por medio de fibras de colágeno y las células lamelares que lo forman (Zimmerman et al. 2014).

Según diferentes autores los corpúsculos de Meissner se localizan en las partes lampiñas y especialmente abundantes en las yemas de los dedos y los labios (Hall and Guyton 2016), dentro de las papilas dérmicas de la piel palmoplantar (Zimmerman et al. 2014) y más específicamente en los dermatoglifos de los pulpejos (Dillon et al. 2001). Diferentes autores han descrito la mayor densidad corpuscular en los dedos del pie, aproximadamente 33-45 /mm² y 2,7 en el pulpejo de los dedos de la mano y en 1,33 /mm² en la palma de la mano. En cuanto a la relación entre la edad y la densidad corpuscular no existen resultados concluyentes que demuestren su estrecha relación (Vega et al. 2009; Vega et al. 2012).

Los corpúsculos de Meissner son muy sensibles al movimiento de los objetos sobre la superficie de la piel y a la vibración de baja frecuencia (2-80 Hz), produciendo información sobre el tacto y vibración (Hall and Guyton 2016; Zimmerman et al. 2014; Macefield 2005). Los corpúsculos de Meissner son mecanorreceptores de bajo umbral de adaptación rápida sensible a las deformaciones dinámicas y con un campo receptivo de unos 3-5mm. Además, se piensa que los corpúsculos de Meissner pueden tener capacidad nociceptiva debido a su posible poliinervación y múltiples funciones (mecanorreceptor y nociceptor) (Vega et al. 2012).

4) Corpúsculos de Pacini: Los corpúsculos de Pacini son los más grandes, se encuentran en la profundidad de la dermis de la piel palmoplantar. Tienen forma ovalada, contienen laminillas en capas y alcanzan hasta 3 a 4 mm de longitud en manos humanas adultas. La forma y el tamaño pueden variar dependiendo de la ubicación anatómica de un individuo. Histológicamente, el corpúsculo de Pacini contiene láminas no neuronales dispuestas en capas concéntricas y forman un núcleo interno, una capa intermedia o zona de crecimiento y una zona externa. El núcleo interno está compuesto de células hemilaminares estrechamente empaquetadas, bilateralmente simétricas distribuidas a ambos lados del terminal del axón A β , con fibras de colágeno de diámetro pequeño que cursan longitudinalmente entre las hendiduras. El núcleo interno rodea a una única fibra nerviosa mielinizada que corre a lo largo del eje longitudinal del corpúsculo. Las células del núcleo interno se derivan de las células de Schwann y pueden desempeñar un papel en la respuesta neuronal del corpúsculo de Pacini a la presión mecánica sostenida. El núcleo interno está rodeado por la zona de crecimiento o capa intermedia constituida fundamentalmente por colágeno tipo V que varía con la edad y contiene células que eventualmente se incorporan a una de las otras dos zonas. Finalmente, la zona externa contiene aproximadamente 30 lamelas de colágeno tipo II principalmente dispuestas concéntricamente, así como decorina. Estas lamelas contienen células planas de tipo epitelial, con espaciamiento laminar radialmente creciente y fibrillas colágenas dispuestas en la superficie externa (figura 11). De igual forma, las lamelas están separadas por fluido. Un único axón altamente mielinizado penetra en cada corpúsculo y sus ramas axonales no mielinizadas, o filopodios, se proyectan radialmente dentro de las hendiduras entre las células del núcleo interno (Quindlen et al. 2016; Zimmerman et al. 2014).

Funcionalmente, la transmisión de la presión en este corpúsculo depende de su alta viscoelasticidad debida a su composición de glicoproteínas, glicosaminoglicanos y proteoglicanos (Vega et al. 2009). En el corpúsculo de Pacini también pueden encontrarse además del axón mecanorreceptor sensitivo mielinizado, otro no mielinizado que podría ser también sensitivo o simpático. El corpúsculo de Pacini es un mecanorreceptor cutáneo de adaptación rápida en la dermis profunda de la piel palmoplantar, especialmente de las manos. Estos corpúsculos detectan las vibraciones

de alta frecuencia 20-1000Hz (Quindlen et al. 2016) o 30-800Hz (Macefield 2005) y cambios de presiones rápidas. Se cree que las células lamelares del núcleo externo del corpúsculo de Pacini y el fluido circundante actúan como un filtro de paso, amortiguando los estímulos mecánicos de baja frecuencia mientras permite que la más mínima vibración de alta frecuencia alcance los filopodios axonales a través de fibras de colágeno interconectadas. Por lo tanto, la ultraestructura de capas cilíndricas de corpúsculos de Pacini facilita la sensibilidad de alta frecuencia (Zimmerman et al. 2014). La tensión inducida por un estímulo vibratorio se amplifica por un factor de 8-12 desde la superficie externa del corpúsculo hasta la neurita central (Quindlen et al. 2016). Los corpúsculos de Pacini son muy sensibles a los estímulos mecánicos enérgicos, responden vigorosamente al soplar sobre el campo receptivo, respondiendo al roce del flujo de aire generado por el experimentador soplando con los labios sobre el área del campo receptivo, se pueden estimular tocando sobre áreas remotas desde el sitio de máxima mecanosensibilidad. Además, responden a estímulos mecánicos enérgicos, distantes, vibratorio, y no responden a un estímulo sostenido (Macefield 2005).

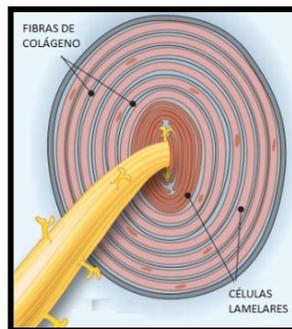


Figura 11. Gráfico representativo del corpúsculo de Pacini donde se aprecian las diferentes capas de colágeno y de células lamelares que lo componen (Zimmerman et al. 2014).

5) Órganos terminales de Ruffini: Es un corpúsculo con diámetro de unos 50 μ m y un axón mielinizado de 4-6 μ m. Histológicamente, los terminales del axón de dicho corpúsculo, poseen dilataciones focales y pequeñas protuberancias digitiformes proyectadas en el tejido conectivo endoneural. Las terminaciones se caracterizan por la presencia de abundantes mitocondrias, numerosas vesículas, partículas de glucógeno y material lipídico (Halata and Munger 1981). El corpúsculo de Ruffini se localiza en la piel profunda y en las capsulas articulares de los mamíferos. Funcionalmente hablando, el corpúsculo de Ruffini es de adaptación lenta y responde a tensiones aplicadas sobre el tejido, tiene umbrales muy altos para las tensiones compresivas aplicadas perpendicularmente. Así mismo, estos corpúsculos responden

a las fuerzas directas y también al estiramiento lateral de la piel, sensibilidad direccional (Macefield 2005).

El corpúsculo de Ruffini se encuentra en la piel fina, mientras que su presencia en la piel palmoplantar es discutida. Numerosos autores defienden su ausencia, mientras que otros dicen encontrar estructuras parecidas a los Corpúsculos de Ruffini. En este sentido, Pare y colaboradores defienden la existencia de muy pocos Corpúsculos de Ruffini en la piel palmoplantar humana (Pare et al. 2003).

6) Órgano terminal del pelo: El órgano terminal del pelo es un mecanorreceptor como los que se han descrito anteriormente. Sin embargo, su particularidad radica en la complejidad de su estructura, ya que está compuesto de fibras nerviosas las cuales se localizan en la base del pelo, inferior a la glándula sebácea. Histológicamente, el órgano terminal del pelo está constituido por células de Schwann rodeadas por fibras de colágeno orientadas longitudinalmente alrededor de cada célula formando una unidad. Esta unidad, posee numerosos hemidesmosomas que se distribuyen a lo largo de las membranas de las células epiteliales del folículo piloso y que a su vez, contactan con las terminaciones nerviosas y los procesos terminales de células de Schwann. El órgano terminal del pelo está compuesto por tres tipos de terminales longitudinales de conducción distinta. En este sentido, dos de los terminales longitudinales se adaptan rápidamente y son sensibles al movimiento y la vibración de baja frecuencia, mientras que el otro terminal se adapta de forma intermedia y está relacionado con el tacto emocional y placentero de las caricias. Todos los terminales longitudinales tienen forma de cilindros aplanados y se intercalan entre dos o tres células Schwann. Resumiendo, la función básica del órgano terminal del pelo es detectar el movimiento y contacto de objetos sobre la superficie del cuerpo (Zimmerman et al. 2014; Macefield 2005).

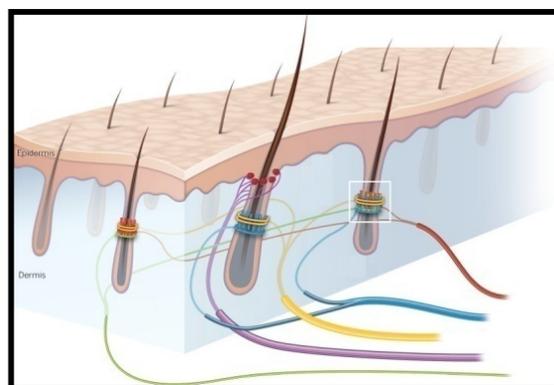


Figura 12. Gráfico que representa las conexiones nerviosas que rodean a los folículos pilosos a nivel de la dermis (Zimmerman et al. 2014).

2.1.7. ANEJOS CUTANEOS

Además de las tres capas descritas anteriormente (epidermis, dermis e hipodermis) y los sistemas de vascularización e inervación, en la piel existen otras estructuras denominadas anejos cutáneos, que incluyen las glándulas sudoríparas (ecrina y apocrina), unidad pilosebácea (los músculos piloerectores, glándulas sebáceas y el pelo) y las uñas.

Las **glándulas sudoríparas ecrinas** están presentes en toda la piel, con mayor densidad a nivel palmoplantar ($300/\text{cm}^2$), axilas y antebrazos. Su porción secretora está inervada por fibras amielínicas colinérgicas y se sitúan a nivel de la dermis profunda y la unión dermoepidérmica. Son glándulas tubulares simples cuya porción secretora forma un ovillo a nivel más profundo. La porción secretora está formada por células claras (eosinófilas) y otra oscuras (basófilas) rodeadas por una capa de células mioepiteliales delgadas por dentro de la membrana basal. La porción excretora está formada por un conducto constituido por una doble capa de células cúbicas que expresan CK6 y CK16. La porción excretora en su zona más profunda tiene forma de ovillo donde se mezcla con la parte secretora y en su zona más superficial adopta una forma recta hasta que sale al exterior (figura 13). La capa basal del conducto tiene alta actividad mitótica y es responsable de la renovación de las células del acrosiringio. Las glándulas sudoríparas desempeñan funciones importantes en el metabolismo hidroclorado, en la termorregulación por la evaporación del sudor y humedad de la superficie cutánea que también está relacionada con la prensión de los objetos con las manos. El control de la producción del sudor por las glándulas sudoríparas ecrinas lo realiza el sistema nervioso vegetativo simpático; al aumentar la actividad del sistema simpático, aumenta la cantidad de secreción de sudor (Kanitakis 2002; Geneser 2006). Por otro lado, las glándulas sudoríparas ecrinas, junto con los folículos pilosos, influyen en la entrada de químicos en la piel (Tagami 2008) y en ambos también, se encuentran células madre capaces de regenerar la epidermis (además de la capa basal epidérmica) (Biedermann et al. 2010).

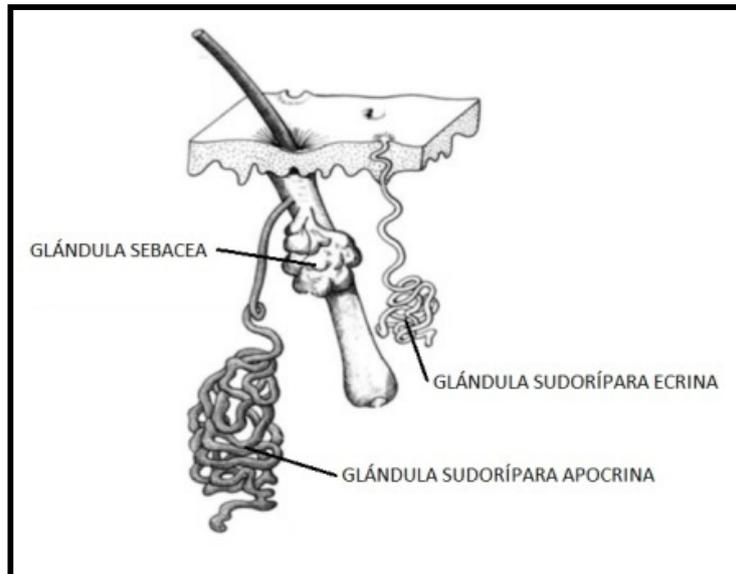


Figura 13. Gráfico representativo de la forma de las glándulas de la piel y su relación histológica con el pelo en la piel fina. Imagen procedente de recurso electrónico <http://anatomiacamilarojas.blogspot.com/2014/04/histologia.html>.

Por otra parte, las **glándulas sudoríparas apocrinas** están formadas por un gran lóbulo secretor y un conducto excretor dérmico que desemboca en el folículo pilosebáceo saliendo al exterior su contenido junto con el sebo (figura 13). Se localizan en axila, periné, pubis, conducto auditivo externo y en el párpado. Estas glándulas son estimuladas por las hormonas sexuales desde la adolescencia al igual que las glándulas sebáceas. La glándula sudorípara apocrina es una glándula tubular simple con una porción secretora con forma de ovillo y constituida por un epitelio simple cúbico o cilíndrico circundadas por células mioepiteliales en forma de huso y ramificadas. La porción excretora está constituida por un epitelio de dos capas y sin células mioepiteliales que desemboca en la parte superior del folículo piloso. Las glándulas sudoríparas apocrinas producen el sudor apocrino de consistencia lechosa inodoro, que al ser descompuestas por bacterias son las responsables del olor característico de zonas como las axilas y los órganos sexuales (Geneser 2006).

La **unidad pilosebacea** es parte constitutiva de los anejos cutáneos y está compuesta por el músculo erector del pelo, la glándula sebácea, y el pelo.

a) El músculo erector del pelo o piloerector está compuesto por fibras musculares lisas y recibe inervación del sistema nervioso simpático. Se inserta en la vaina dérmica del folículo piloso y el otro extremo en la dermis papilar, con una dirección oblicua (figura 14). Cuando se contrae, por una parte tensa el pelo y lo pone de punta, mientras que por otra, produce una pequeña umbilicación de la superficie de la piel. La contracción del músculo es por lo tanto involuntaria y responde a estímulos como el frío o el miedo (Geneser 2006).

b) Las glándula sebácea se encuentran en toda la piel excepto a nivel palmoplantar y del dorso del pie. Hay dos tipos de glándulas sebáceas, las que están conectadas a los folículos capilares en las unidades pilosebáceas que depositan sebo sobre el tallo capilar (figura 13 y 14) y aquellas que existen aisladas en áreas sin pelo de los párpados, nariz, pene, labio menor, la mucosa interna de la mejilla y pezones, las cuales vierten su contenido de excreción directamente al exterior. La glándula sebácea posee una porción secretora y una porción excretora al igual que las demás glándulas descritas en la presente Tesis Doctoral. La porción secretora se compone de sáculos redondeados en forma de racimo de uvas que vierten su contenido a un conducto de excreción corto. Las células basales situadas en el exterior del adenómero, son pequeñas, aplanadas y muy basófilas y se van desplazando al centro a la vez que se van llenando de gotas lipídicas para finalmente ser excretadas y formar el producto de secreción, el sebo. El sebo, es una mezcla de diferentes lípidos cuya función es la de "lubricar" y proteger la superficie de la piel ya que forma el manto ácido en la superficie de la piel que actúa como barrera contra bacteria, virus y otros contaminantes potenciales que pueden penetrar la piel. La protección del manto ácido permite mantener los niveles de pH idóneos en la piel (4.5-6.2) y esta acidez ayuda a neutralizar la naturaleza alcalina de los contaminantes (Geneser 2006).

c) El pelo, es un elemento constitutivo de la unidad pilosebácea se aloja dentro de una invaginación tubular epidérmica que se extiende por la dermis llamada folículo piloso. El pelo contiene dos porciones, una porción externa denominada tallo y una porción interna ubicada dentro del folículo denominada raíz del pelo. Cada folículo piloso se relaciona con un músculo piloerector y una glándula sebácea. El folículo piloso consta de una vaina radicular interna y otra externa derivadas de la epidermis, que son rodeadas por tejido conectivo dérmico llamada vaina dérmica. La porción más profunda del folículo piloso está engrosada y se denomina bulbo piloso, inferior al bulbo piloso se encuentra la papila dérmica compuesta de tejido conectivo laxo (figura 14). Las células epiteliales que rodean la papila carecen de diferenciación y constituyen

la matriz. Las células de la matriz poseen alta capacidad mitótica y en su proceso de división celular ascendente forman el pelo y la vaina radicular interna. El pelo en su ascenso va sufriendo el proceso de queratinización y muerte celular propias del tallo piloso. En el pelo, podemos distinguir tres zonas histológicas, una parte interna llamada médula, una zona media llamada corteza donde el pelo contiene la melanina y la parte más externa llamada cutícula del pelo con células totalmente planas (Geneser 2006).

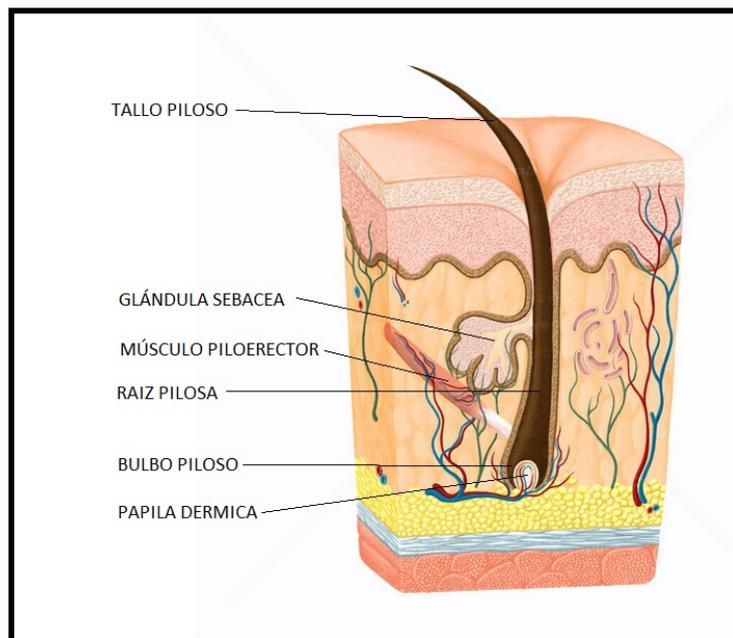


Figura 14. Gráfico representativo de la estructura la unidad pilosebácea, donde se aprecian sus estructuras principales: el músculo piloerector, la glándula sebácea y el pelo con sus zonas más relevantes (tallo, raíz, bulbo y la papila dérmica). Imagen procedente de recurso electrónico <http://www.centralx.es/p/anatomia/sistema-tegumentario/piel>.

Finalmente, **la uña** está formada por una parte visible distal, la placa ungueal y otra interna proximal no visible, la raíz ungueal. En la superficie podemos distinguir una zona proximal donde se continúa con la piel llamado eponiquio y la lúnula. En la zona distal y superficial, se localiza el borde libre que debemos cortar regularmente, e inferior a él, se encuentra el hiponiquio, mientras que en los laterales, distinguimos los canales ungueales. La placa ungueal se compone de varias capas de células claras queratinizadas con grandes haces de tonofilamentos, aplanadas y con núcleos degenerados. La uña se encuentra sobre el lecho ungueal, compuesto por el epitelio de la dermis subyacente. Inferior a la raíz ungueal se encuentra la matriz de la uña, donde se encuentran las células mitóticas que generan la uña y la hacen crecer (Geneser 2006) (figura 14).

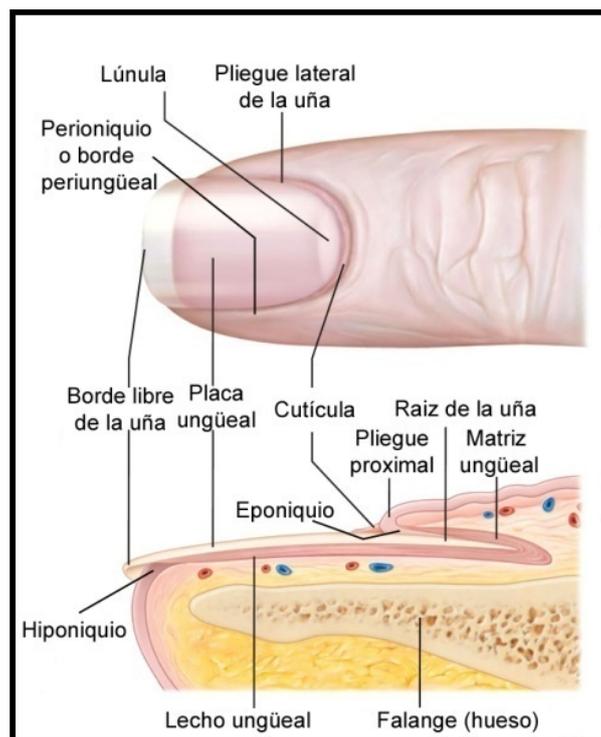


Figura 15. Gráfico representativo de la estructura de la uña donde se muestran todas sus partes. Imagen procedente de recurso electrónico <http://productosnails.com/salud/las-unas/>.

2.2. LA PIEL PALMOPLANTAR

Una vez descritas la composición, la función y las características histológicas fundamentales de la piel, es importante poner de relieve las variaciones macroscópicas e histológicas según la región anatómica que se estudie. En este sentido, en la presente Tesis Doctoral se han considerado las posibles diferencias anatómicas e histológicas entre la piel fina y la piel palmoplantar (piel gruesa, lampiña o glabra), motivo por el cual es de gran importancia el estudio en profundidad de ambos tipos de piel. A lo largo del siguiente apartado se describirán con detalle las características anatómicas, histológicas y funcionales de la piel palmoplantar, además de los recientes hallazgos bibliográficos que abarcan este tema.

La piel palmoplantar es una de las regiones del cuerpo humano que posee características singulares, ocupa aproximadamente el 5% del total de la piel y es descrita por numerosos autores como una piel especial por su estructura y función. Además de poseer las mismas funciones que tiene el resto de la piel, a nivel palmoplantar también podemos destacar la enorme resistencia a la presión, inexistente en otras áreas anatómicas. A nivel plantar, la superficie de la piel tampoco es homogénea en su totalidad. Se pueden distinguir dos zonas bien diferenciadas (figura 16), una zona que recibe presión (pulpejos de los dedos, apoyo de las cabezas metatarsales, arco longitudinal externo y talón) y otra zona que no recibe presión (el arco longitudinal interno) que parece ser zona de transición entre piel fina y palmoplantar (Kelikian et al. 2011). Funcionalmente estas zonas varían de un individuo a otro dependiendo del tipo de apoyo del pie (pie plano o cavo).



Figura 16. Fotografía de la planta del pie normal (A) y otra donde se muestran las zonas que soportan diferentes presiones (B) en amarillo las zonas de máxima presión y en rojo las que soportan poca presión.

2.2.1. DIFERENCIAS ANATÓMICAS DE LA PIEL PALMOPLANTAR.

Teniendo en cuenta las diferencias anatómicas, histológicas y funcionales en la piel palmoplantar cabe destacar que dichas diferencias se asocian principalmente a su configuración histológica. En concreto, desde el punto de vista anatómico se pueden encontrar diferencias identificables a nivel macroscópico, entre ellas, destaca la ausencia de pelos en la piel palmoplantar, diferencias de coloración y la presencia de dermatoglifos, que serán descritas en profundidad en el presente apartado.

2.2.1.1. Ausencia de pelos en la piel palmoplantar.

Una de las diferencias identificables a nivel macroscópico es la ausencia de pelos a nivel palmoplantar. Esta carencia, conlleva a la ausencia de todo el complejo pilosebáceo anteriormente descrito (Geneser 2006; Biedermann et al. 2015) (figura 17). Esta particularidad macroscópica podría considerarse una de las más notorias, ya que se aprecia a simple vista y estaría asociada al exceso de presión y roce continuo al que se ve sometida la piel palmoplantar.

2.2.1.2. Diferencias de coloración de la piel palmoplantar.

La coloración de la piel está determinada por diferentes componentes celulares y proteicos tanto de la epidermis como de la dermis. En este contexto, en la epidermis destaca la presencia de melanocitos cuya función es secretar uno de los pigmentos que aportan coloración a la piel, la melanina. La escasa pigmentación melánica podría estar asociada a dos factores. En primer lugar, a una inferior actividad melanocítica (Hasegawa et al. 2008; Biedermann et al. 2015) y en segundo lugar, a un menor número de melanocitos en la epidermis palmoplantar (Yamaguchi et al. 2009). En este sentido, cabe destacar que la densidad de melanocitos en piel palmoplantar es cinco veces menor que en piel fina debido a que durante la embriogénesis los melanocitos disminuyen su migración hacia la piel palmoplantar (Yamaguchi et al. 2004). Por otra parte, los rasgos de coloración también están determinados por factores vinculantes a la dermis, en concreto, al lecho vascular el cual determina el color rojizo proporcionado por el contenido de hemoglobina dentro de los eritrocitos circulantes (Rook and Fonseca Capdevila 1988). Además de los pigmentos mencionados anteriormente (melanina y hemoglobina) que aportan coloración a la piel, se ha

relacionado la ingesta de carotenos en la dieta como un factor coadyuvante que aporta un color amarillento a la piel (Geneser 2006). Todos los factores determinantes de la coloración, entre ellos, la concentración de melanina y el lecho vascular establecen características de coloración específicas en la piel fina con respecto a la piel palmoplantar. En la piel palmoplantar es destacable una coloración más clara y rojiza con respecto a la piel fina (figura 17).

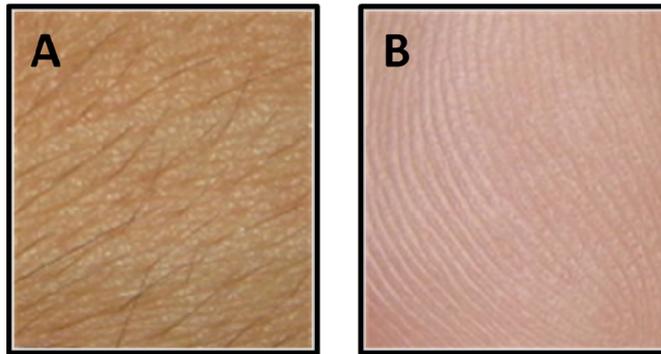


Figura 17. Fotografía externa de la piel fina del dorso de la mano (A) y plantar (B) de un mismo individuo, donde se aprecian diferencias como la coloración más clara, ausencia de pelos y presencia de dermatoglifos en paralelo de la piel palmoplantar.

2.2.1.3. Presencia de dermatoglifos en la piel palmoplantar.

Otra característica exclusiva de la piel palmoplantar que se puede apreciar macroscópicamente es la existencia de surcos paralelos en la superficie de la piel (Sangiorgi et al. 2005) (figura 17B y 18), al contrario que en la piel fina donde se aprecian surcos en forma poligonal (figura 17A). Esta distribución en paralelo forma los denominados **dermatoglifos**, sólo presentes en simios superiores y humanos (Rook and Fonseca Capdevila 1988). Aunque los dermatoglifos son estructuras observables a nivel macroscópico, a nivel histológico se pueden identificar en la región de la epidermis. Dichas características histológicas de los dermatoglifos se describirán en el apartado de la unión dermoepidérmica.



Figura 18. A) Fotopodograma donde se aprecia el área de piel plantar donde se ejerce presión en posición bípeda y se distinguen dibujadas las líneas dermatoglifas en paralelo. B) Esquema donde se representa de forma general, la forma y orientación que suelen tener las líneas dermatoglifas a nivel plantar.

2.2.2. DIFERENCIAS HISTOLÓGICAS DE LA PIEL PALMOPLANTAR

Una vez descritas las principales diferencias anatómicas de la piel palmoplantar con respecto a la piel fina, se describirán las principales diferencias histológicas palmoplantares a nivel de las tres capas tisulares que componen la piel (epidermis, dermis e hipodermis) tal y como lo demuestra la revisión de la literatura (Moore and Jolly 2000; Oh et al. 2011; Ledoux and Blevins 2007).

2.2.2.1. Diferencias histológicas de la piel palmoplantar en la epidermis

La piel palmoplantar, a nivel de la epidermis revela importantes diferencias histológicas relacionadas con el grosor epidérmico, la morfología y disposición de los queratinocitos, la presencia de estrato lúcido y la expresión de citoqueratinas, las cuales se detallarán en profundidad en el presente apartado.

2.2.2.1.1. Grosor Epidérmico.

Una de las principales diferencias histológicas a nivel de la piel palmoplantar es el mayor grosor de la epidermis sobre todo a expensas del estrato córneo (Oh et al. 2011) (figura 19), esta diferencia se visualiza con microscopía óptica y con la ecografía, donde también se aprecian unas estructuras muy ecogénicas paralelas al eco de entrada. Los grosores medios de la epidermis en piel fina son de unos 0,1 mm y en piel palmoplantar varían entre 1 mm y 1,4 mm (Thoolen et al. 2000). El grosor total de la epidermis palmoplantar es mayor debido a que todos los estratos epidérmicos tienen más número de capas (Geneser 2006). Este aumento en el número de capas de los estratos viene asociado a que las células suprabasales de la piel palmoplantar también tienen capacidad de división (Rook and Fonseca Capdevila 1988), lo cual representa un incremento en la proliferación y división celular.

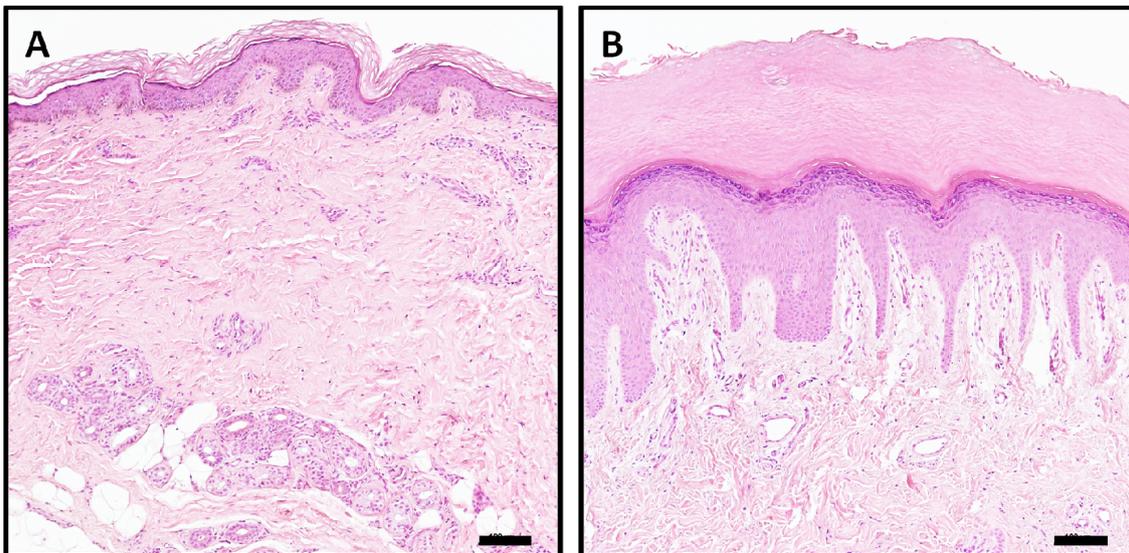


Figura 19. Tinción de H&E a 100X de la piel fina (A) y la piel plantar (B) de un mismo individuo, donde se aprecia la diferencia en el grosor y el número de capas de la epidermis. La longitud de la barra es de 100 μ m.

Además de las diferencias de grosor descritas en la piel palmoplantar, se ha descrito que el grosor a nivel plantar no es continuo, sino que varía según en la zona, M. Lamoulié (Ann Kinésilhér., 1980, 7, 9-24.) donde la zona más gruesa a nivel plantar se encuentra en la zona posterior de talón y la más fina a nivel de los pulpejos de los dedos menores (figura 20).

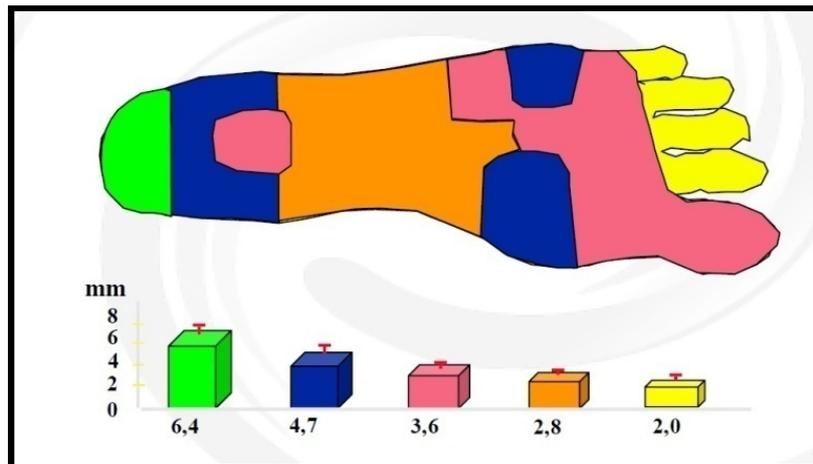


Figura 20. Esquema representativo de las diferencias de los grosores en la planta del pie según M. Lamoulié (Ann Kinésilhér., 1980). Procedente del material docente del curso PP1 de la Escuela Superior de Posturología Villeneuve.

2.2.2.1.2. Morfología y disposición de los queratinocitos.

En cuanto a la piel palmoplantar, es de destacar que, con respecto a la piel fina, la morfología celular respecto a la cresta epidérmica tiene ciertas particularidades en los diferentes estratos del tejido epitelial. En concreto, en la piel palmoplantar las células epiteliales del estrato basal que se ubican sobre la papila dérmica (apical) y en los laterales de las crestas epidérmicas son de forma columnar, núcleos ovales, con apéndices que se introducen en la dermis. Estas células poseen abundantes haces ondulados de filamentos de queratina paralelos a la membrana plasmática que van desde los hemidesmosomas hasta las placas desmosómicas. Además de su ubicación apical y lateral, es de destacar que las células basales del fondo de la cresta epidérmica tienen forma redondeadas o poligonales, pocos apéndices y haces menos densos de filamentos de queratina. Por lo tanto, se observa gran heterogeneidad en las células basales de la piel palmoplantar según su posición respecto a la cresta epidérmica. Respecto al estrato espinoso, estudios realizados por Swensson y Eady afirman que el estrato espinoso se organiza en dos zonas, una zona cercana al estrato basal (basal) y otra zona alejada del estrato basal (apical). En la zona basal del estrato espinoso las células son de forma columnar o poligonal, con núcleo oval o redondo y fibras de queratina entre las que se aprecian agregados en forma de esponja, similares a las células del estrato basal, pero con menor número de desmosomas. En la zona apical del estrato espinoso las células son poligonales más aplanadas, el núcleo celular aparece rodeado de una estrecha banda libre de filamentos de queratina, los filamentos de queratina aparecen horizontales y los haces de filamentos de queratina aparecen más densos y de mayor grosor. En el estrato granular histológicamente las

células presentan estrechamiento del halo perinuclear. Con respecto a los filamentos de queratina, dichos filamentos se visualizan junto a la queratohialina y van perdiendo su aspecto fibrilar, además de apreciarse los gránulos de queratohialina con gran variabilidad dentro de la misma célula (Swensson and Eady 1996).

Una vez descrita la morfología de los queratinocitos con respecto a la cresta epidérmica de la piel palmoplantar, se describirá la disposición de dicha células. En este contexto, cabe mencionar que los queratinocitos de la piel palmoplantar se encuentran más desorganizados con respecto a la piel fina (Rook and Fonseca Capdevila 1988) a nivel epidérmico, ya que en la piel fina se disponen formando columnas más o menos lineales. Esta organización se deshace en la piel palmoplantar, esto podría atribuirse a que la unión dermoepidérmica en la zona palmoplantares más irregular, las crestas epiteliales son más profundas y permiten zonas de convergencia y divergencia de los queratinocitos (figura 21).

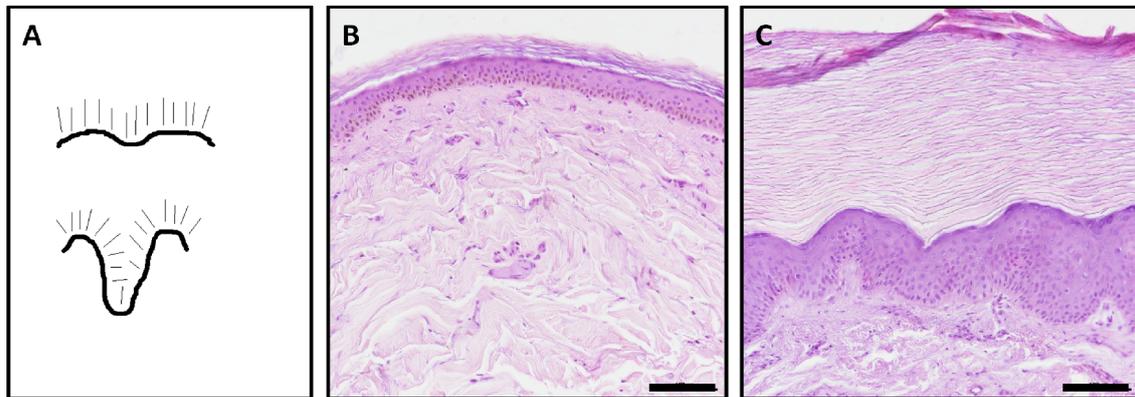


Figura 21. A) Esquema representativo de la evolución de los queratinocitos en la epidermis, desde basal a apical. En la piel fina (dibujo superior) es de una evolución más lineal vertical, mientras que en la piel palmoplantar (dibujo inferior), se produce de una forma más desorganizada, donde las líneas de evolución están en oblicuo, con convergencias y divergencias. B) Tinción de H&E a 200x de piel fina donde se aprecia mas uniformidad en el grosor epidérmico. C) Tinción de H&E a 200x de piel plantar del mismo individuo que la foto B, donde se aprecia grandes diferencias en el grosor epidérmico y se distinguen zonas de convergencia y divergencia. Barra de magnificación 100µm.

Los queratinocitos de la piel palmoplantar no ascienden por el estrato córneo estrictamente en sentido vertical, sino que lo hacen en sentido diagonal, ligeramente lateralizados hasta las crestas corneas (figura 22). Este hallazgo han sido previamente reportado en queratinocitos marcados con melanina en nevus (Palleschi et al. 2006). A diferencia de Palleschi, Swensson y colaboradores afirman que los queratinocitos crecen estrictamente en columnas verticales (Swensson et al. 1998).

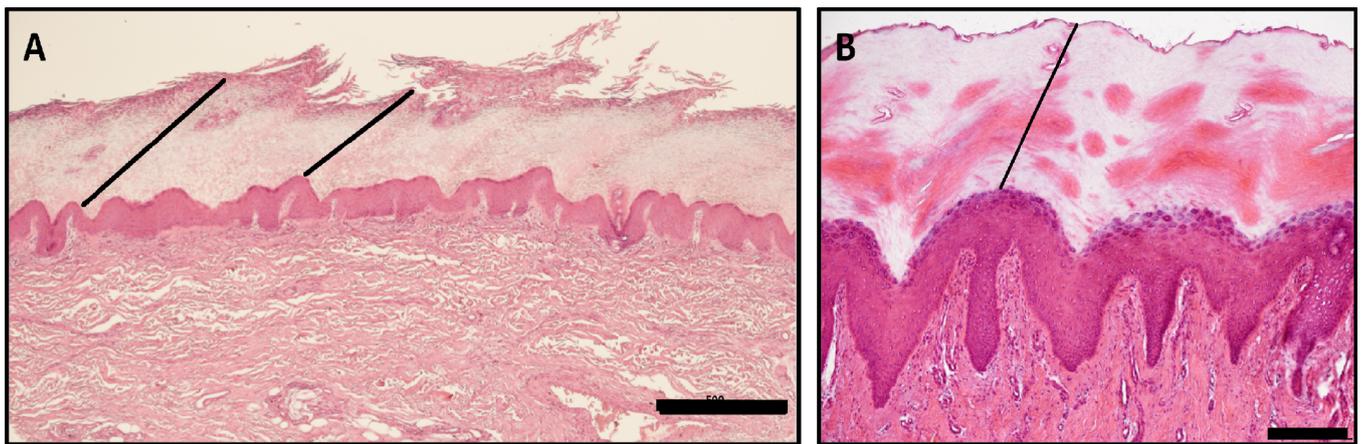


Figura 22. Tinciones de H&E donde se aprecia la evolución en oblicuo del estrato córneo de la piel palmoplantar. En la foto A a 40X (barra de magnificación 500 μ m) se aprecian líneas oblicuas del estrato córneo (barra negra). En la foto B a 100X (barra de magnificación 100 μ m) se aprecia el desplazamiento hacia lateral del acrosiringio a su paso por el estrato córneo (barra negra), no coincidiendo completamente la cresta que forma el estrato granuloso con la cresta del estrato córneo.

2.2.2.1.3. Estrato lúcido.

La presencia del estrato lúcido se ha descrito como exclusivo de la piel palmoplantar, siendo una de las características histológicas más relevantes (Swensson and Eady 1996). El estrato lúcido de la piel palmoplantar es muy birrefringente y está constituido de células epiteliales eosinófilas en estado terminal de diferenciación (figura 23). Las células epiteliales del estrato lúcido carecen de núcleo y organelas que se sustituyen por el depósito abundante de queratina (Ross and Pawlina 2016). Las células epiteliales del estrato lúcido se organizan formando dos capas: la primera capa se denomina **capa intermedia de Ranvier**. Esta capa es la más basal y se considera el verdadero estrato lúcido o barrera epiplásmica. En dicha capa, no se observan de gránulos de queratohialina ni existe refringencia propia de la queratina. La segunda capa constitutiva del estrato lúcido es el **estrato lúcido propio**, el cual se localiza a nivel apical y consta de células de contorno irregular, aplanadas y translúcidas (Zirra 1976).

El estrato lúcido se observa en humanos y animales, cuando la epidermis posee un estrato granular grueso subyacente. En el estrato lúcido se encuentran enzimas y compuestos sulfurados procedentes del interior celular del estrato granuloso, dichas enzimas y compuestos sulfurados forman la barrera epiplásmica, una barrera biológica semipermeable que actúa como tampón bioquímico y filtro selectivo (Zirra 1976; Swensson and Eady 1996).

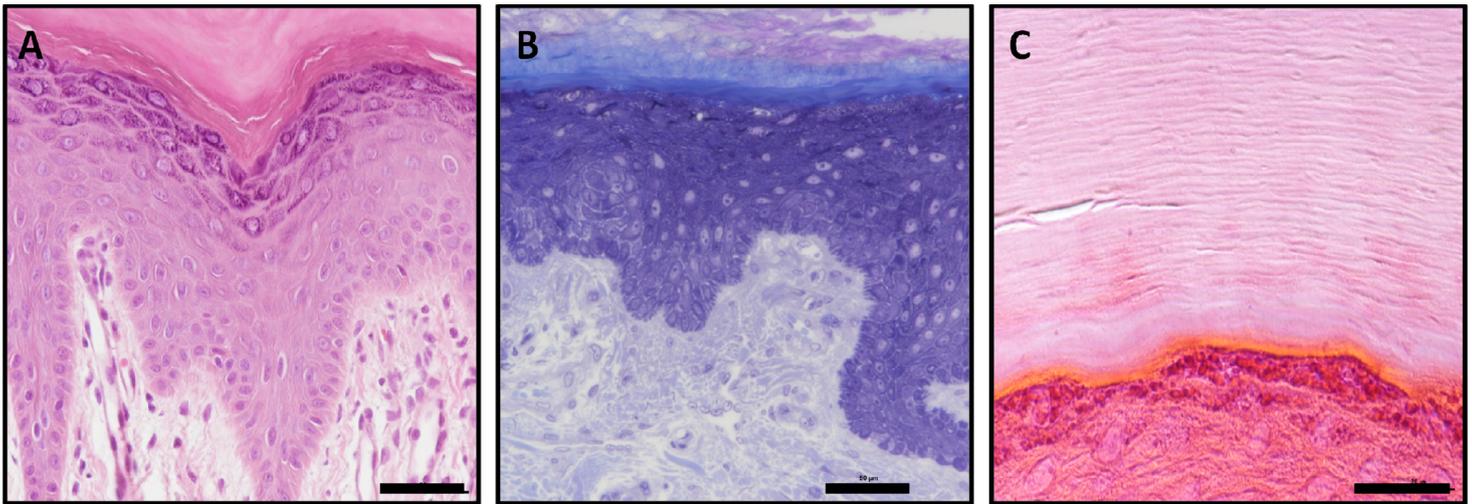


Figura 23. Visualización del estrato lúcido A) tinción de H&E a 400x (barra de magnificación 50 μ m), B) tinción en azul de toluidina de un corte semifino a 400x (barra de magnificación 50 μ m) y C) tinción de H&E a 1000x (barra de magnificación 20 μ m) donde se aprecia el mismo color anaranjado en los gránulos de queratohialina del estrato granuloso y en el estrato lúcido.

2.2.2.1.4. Citoqueratinas.

Las citoqueratinas (CKs) son monómeros ácidos y básicos que se unen entre ellos en proporción 1/1 (ácido/base) para formar un filamento intermedio de queratina, estos monómeros se unen en haces y forman el tonofilamento (Welsch and Sobotta 2008). Los filamentos de queratina son unos filamentos intermedios con espesor de unos 10nm y son un componente fundamental del citoesqueleto celular encargado de proporcionar estabilidad dimensional, presentes en todas las células epiteliales de mamíferos. Estos filamentos se unen desde los desmosomas y hemidesmosomas al resto del citoesqueleto de los queratinocitos, proporcionando una conexión mecánica entre todas las células epidérmicas y la propia dermis.

Dependiendo de su acidez y su peso molecular las citoqueratinas pueden clasificarse en ácidas (tipo I) de bajo peso molecular o bien, básicas de alto peso molecular (tipo II) (Kanitakis 2002; Moll et al. 2008).

- Las citoqueratinas de tipo I son proteínas ácidas (pH <5,5) de bajo peso molecular, oscilando entre 40kDa y 64kDa. Las queratinas de tipo I se codifican en el cromosoma 17q y abarcan el siguiente grupo de citoqueratinas: CK9, CK10, CK11, CK12, CK13, CK14, CK15, CK16, CK17, CK18, CK19 y CK20.

- Las citoqueratinas de tipo II son proteínas neutras o básicas (pH >6) de alto peso molecular, pudiendo variar entre 52kDa y 67kDa. Las citoqueratinas de tipo II se codifican en el cromosoma 12q y abarcan el siguiente grupo de citoqueratinas: CK1, CK2, CK3, CK4, CK5, CK6, CK7 y CK8.

La asociación de una citoqueratina de tipo I a una citoqueratina de tipo II forman los filamentos intermedios, los cuales se distribuyen en el citoplasma de las células epiteliales. Las citoqueratinas varían topográficamente en los queratinocitos según las diferentes capas de la epidermis y su localización respecto a la cresta epidérmica primaria que contiene el acrosiringio (figura 24). En la presente Tesis Doctoral se ha analizado la expresión de las CKs (CK5/6, CK7, CK9, CK10 y CK20) según su localización, a nivel basal y suprabasal. La localización de las CKs dentro de las células epiteliales, determina el grado de maduración de cada célula epitelial.

A nivel basal se expresan principalmente las citoqueratinas CK5 y CK14 (Moll et al. 2008) asociadas a niveles altos de actividad mitótica celular. En asociación a la CK5 y CK14 se encuentra la CK17, localizada en la capa basal de la cresta epidérmica primaria, zona donde se alojarían las células madre epidérmicas (en lo más profundo, más protegidas) y en los conductos de las glándulas sudoríparas (Swensson et al. 1998).

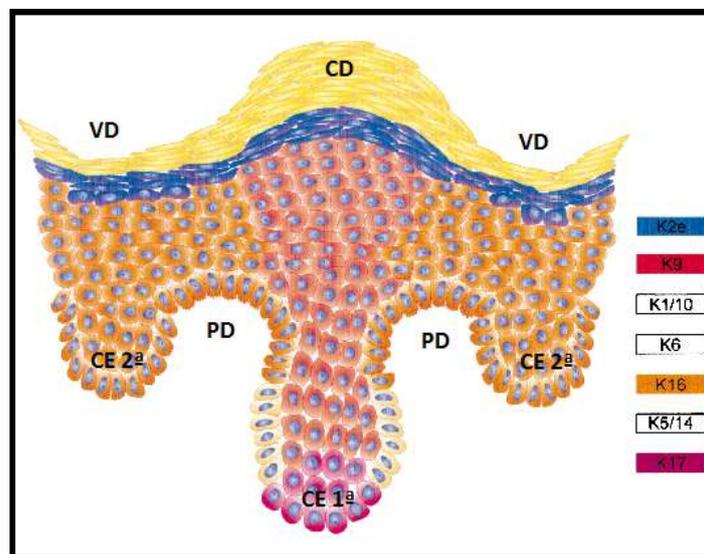


Figura 24. Esquema de la distribución de las diferentes citoqueratinas (K) epidérmicas según su localización en la piel palmoplantar según (Swensson et al. 1998).Cresta epidérmica primaria (CE1ª), cresta epidérmica secundaria (CE2ª), papila dérmica (PD), cresta dérmica (CD) y valle dérmico (VD).

Por otra parte, a nivel suprabasal (estrato espinoso y granuloso), destaca la expresión de las CK1 y CK10 (Moll et al. 2008), ya que se vinculan a altos niveles de diferenciación celular (Geneser 2006; Kanitakis 2002). Otra de las CKs a destacar a nivel suprabasal es la CK9, detectada por primera vez a la semana 15 de gestación en algunas células suprabasales de la epidermis plantar y ocasionalmente, en las células basales (Moll et al. 1987; Kierszenbaum and Tres 2012). La CK9 es un marcador específico de piel palmoplantar (figura 25), aunque también se puede apreciar con poca frecuencia en piel fina asociada a la salida del acrosiringio (Moll et al. 1987; Knapp et al. 1986). Además, se encuentra en una alta proporción en los queratinocitos dispuestos en columnas verticales y concentrados alrededor de los conductos intraepidérmicos de las glándulas sudoríparas (Moll et al. 1987). La CK9 es necesaria para el desarrollo de piel palmoplantar, proporciona resistencia máxima a la presión (Fu et al. 2014). Es de destacar que la mayoría de los queratinocitos que expresan CK9 también expresan las CKs 10 y 11. Los queratinocitos de la piel palmoplantar expresan CK9 mediante dos mecanismos descritos en la literatura. El primero de ellos, un mecanismo de expresión independiente de la interacción dermo-epidérmica por parte de los queratinocitos palmoplantares (Compton et al. 1998). Compton y colaboradores, tras realizar autoinjertos de epidermis palmoplantar en zonas de piel fina sin restos de dermis subyacente se observó que estos queratinocitos seguían expresando CK9 hasta 5 años después del injerto. El segundo mecanismo de expresión de CK9 en piel palmoplantar es altamente dependiente de la interacción dermo-epidérmica como demostró Yamaguchi y colaboradores tras realizar autoinjertos de epidermis de piel fina sobre dermis plantar donde observaron la expresión de CK9 por parte de los queratinocitos de piel fina, inducida por los fibroblastos dérmicos de la piel palmoplantar (Yamaguchi et al. 1999; Yamaguchi et al. 2001).

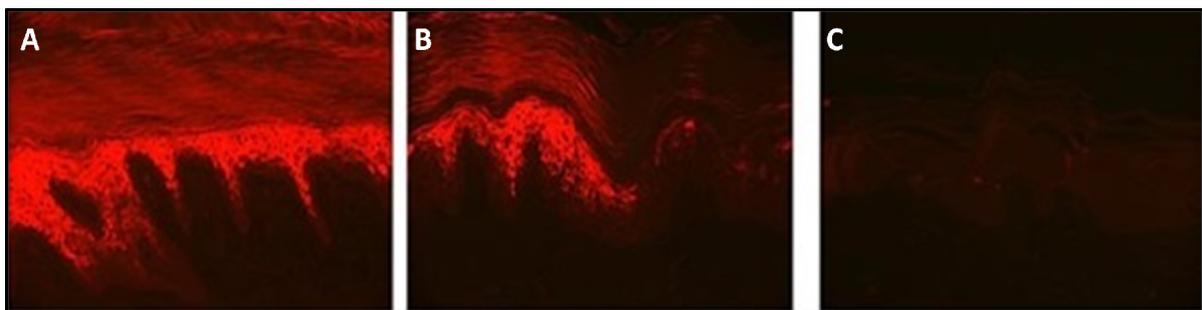


Figura 25. Imágenes de inmunofluorescencia donde se marca la expresión de la citoqueratina 9 en la piel. A) Piel palmoplantar, B) Zona de transición entre piel fina y palmoplantar y C) Piel fina (Yamaguchi et al. 2008)

Aparte de la CK9, descrita en el presente apartado, la CK16 es otra de las CKs a destacar ya que su expresión ha sido vinculada a células que se dividen rápidamente,

pero parece que también podrían ser las causantes de proporcionar flexibilidad y elasticidad a la piel, ocupando columnas diferentes a la CK9 sobre las crestas papilares epidérmicas secundarias (Swensson et al. 1998).

Por otra parte, la CK19 se expresa a nivel suprabasal en conductos de glándulas sudoríparas ecrinas tanto en piel fina como en la piel palmoplantar (Welsch and Sobotta 2008). Determinar la expresión de CKs a nivel de los queratinocitos es de gran importancia en estudios de caracterización de la epidermis de la piel fina y palmoplantar. Sin embargo, dado que la epidermis contiene una población de células no queratinocítica es de gran relevancia destacar el papel de la CK20 como marcador específico de Células de Merkel de la piel fetal (desde la semana 8) y del adulto (Moll et al. 1995).

Una vez descritas con detalle las CKs de gran relevancia en la piel palmoplantar es importante destacar que una de las principales diferencias que se pueden apreciar desde el punto de vista histológico, es el mayor porcentaje de volumen citoplasmático de filamentos intermedios en la piel palmoplantar respecto a la piel fina (Swensson and Eady 1996).

2.2.2.2. Diferencias histológicas de la unión dermoepidérmica en la piel palmoplantar.

Una vez descritas las principales diferencias histológicas de la epidermis palmoplantar, se describirán las diferencias a nivel de la unión dermoepidérmica. La unión dermoepidérmica es la estructura encargada de mantener la asociación entre epidermis y la dermis subyacente. A partir de esta unión, se llevan a cabo numerosos procesos metabólicos que promueven el desarrollo y la diferenciación de ambos tejidos (epidermis y dermis). Por este motivo, su estudio y caracterización en la piel fina y palmoplantar es de considerada importancia.

En este sentido, las diferencias identificables histológicamente a nivel de la unión dermoepidérmica entre piel fina y la piel palmoplantar radican principalmente en que esta unión es más simple cuanto más fina es la piel (Geneser 2006). En la piel palmoplantar, las crestas epidérmicas son más largas, más finas y más numerosas (Fawcett et al. 1994) y sus papilas dérmicas son más pronunciadas (Biedermann et al. 2015), encontrándose un marcado patrón de interdigitaciones entre papilas dérmicas y crestas epidérmicas (Swensson and Eady 1996).

Las crestas epidérmicas se distinguen entre primarias y secundarias. Las **crestas epidérmicas primarias** se encuentran a nivel del acrosiringio y se alternan con las

crestas epidérmicas secundarias que carecen de él (figura 24 y 26B). Esta relación entre epidermis y dermis proporciona una mayor superficie de contacto y favorece a los procesos de intercambio de nutrientes. Debido a este aumento de superficie de contacto, existe un mayor número de células por unidad de superficie corporal, lo que lleva a un aumento del grosor de la piel (Ross and Pawlina 2016), un mayor requerimiento nutricional y una mayor demanda vascular.

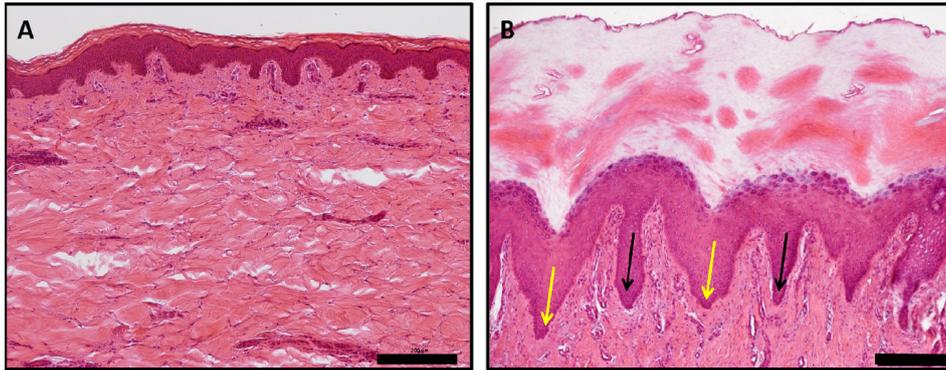


Figura 26. Foto a 100X (barra de 100 μ m) representativo de la diferencias de tamaño y forma de las papilas dérmica en la piel fina (A) y la piel palmoplantar (B). En la piel palmoplantar se distinguen dos tipos de crestas epidérmicas, la primaria (flecha negra, por donde sale el conducto excretor de la glándula sudorípara ecrina) y la secundaria (flecha amarilla). Se puede apreciar como el acrosiringio está cerca de la superficie en la cresta dérmica del estrato córneo y el valle formado entre dos crestas dérmicas. Esta alternancia entre crestas y valles superficiales es la que origina los dermatoglifos.

La presencia de los dermatoglifos es una de la principales diferencias anatómicas entre la piel palmoplantar y la piel fina tal y como se describió anteriormente. La presencia de dermatoglifos a nivel macroscópico se correlaciona a nivel histológico con una alternancia de crestas (cresta dérmica) y valles (valle dérmico) del estrato córneo (figura 26B) y sirve para mejorar la adherencia entre la piel y los objetos que manipulamos con las manos o el suelo que pisamos con los pies (Geneser 2006). Además, actúa un amplificador mecánico para los receptores dérmicos y hace que la piel palmoplantar sea 10 veces más resistentes en sentido longitudinal que transversal a los dermatoglifos (Wang and Hayward 2007).

Los laterales dérmicos de la cresta epidérmica primaria por donde pasa el acrosiringio, tienen forma reticular de panal y son más lisos (figura 27A). Por otro lado, los laterales de las crestas epidérmicas secundarias son más estrechas, tienen forma de dobleces o plicaturas, poseen microondulaciones en paralelo a lo largo del eje de la papila y son más rugosos (figura 27B). La unión dermo-epidérmica varía según la edad (Kawabe et al. 1985).

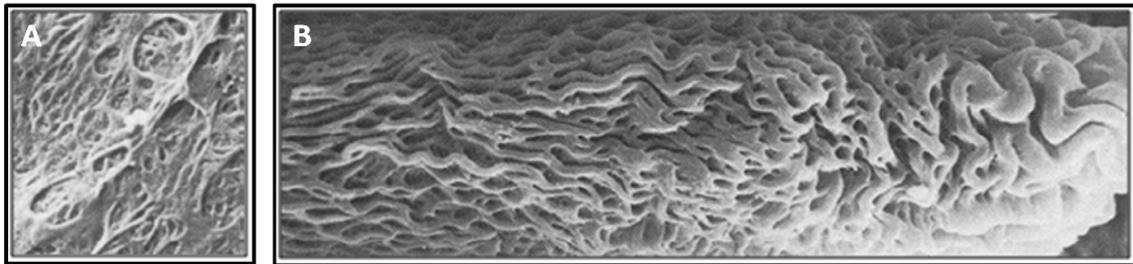


Figura 27. Los laterales dérmicos en la piel palmoplantar de la cresta epidérmica primaria (A) por donde pasa el acrosiringio tienen forma reticular de panal, es más liso. Las paredes de las crestas epidérmicas secundarias (B) más estrechas tienen forma de dobleces o plicaturas, microondulaciones en paralelo a lo largo del eje de la papila, es más rugoso (Kawabe et al. 1985).

Finalmente, cabe destacar que la distribución en paralelo de las papilas dérmicas en la piel palmoplantar puede visualizarse mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido (figura 28). Igualmente, se pueden visualizar los extremos distales del conducto excretor de las glándulas sudoríparas, los cuales se disponen con regularidad en el fondo de las crestas epidérmicas primarias (Sangiorgi et al. 2005), para dar salida al exterior en la cresta dérmica (cresta superficial cornea), donde desembocan los poros de las glándulas sudoríparas (Palleschi et al. 2006).

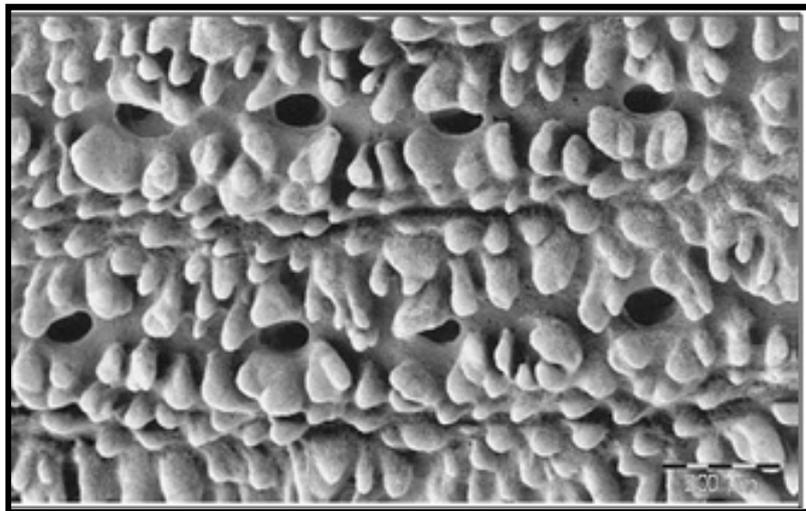


Figura 28. Imagen con microscopía electrónica de barrido de la piel palmoplantar de la superficie dérmica donde se aprecia la distribución en paralelo del inicio del acrosiringio y las papilas dérmicas (Sangiorgi et al. 2005).

2.2.2.3. Diferencias histológicas de la dermis en la piel palmoplantar.

La piel palmoplantar a nivel de la epidermis y la unión dermoepidérmica revela importantes diferencias histológicas. En el presente apartado, se describirán con detalle las principales diferencias de la dermis palmoplantar con respecto a la piel fina. En concreto, se estudiarán las diferencias relacionadas con: el tejido conjuntivo dérmico, aumento de glándulas sudoríparas ecrinas y diferencias nerviosas y vasculares.

2.2.2.3.1. Diferencias de la dermis palmoplantar.

Histológicamente, la dermis palmoplantar es más gruesa que la dermis de la piel fina, midiendo 3mm aproximadamente (Oh et al. 2011). Como se mencionó en el apartado de introducción de la dermis, la dermis está constituida por una dermis papilar y reticular. En la **dermis papilar** se encuentran las papilas dérmicas. Con respecto a las papilas dérmicas de la piel palmoplantar, estudios mediante microscopía electrónica de barrido y transmisión demuestran que estas papilas se disponen en filas paralelas y separadas unos 150µm, con una altura de 300µm y un grosor de 100µm de diámetro en su parte media (figura 28). En la mitad superior de las papilas dérmicas, sobre la superficie hay una capa vellosa que podría jugar un papel en la unión dermoepidérmica (Omagari and Ogawa 1990). Dentro de las papilas dérmicas, se alojan capilares de un diámetro aproximado de 20µm, estos capilares se asocian en parejas cruzándose a lo largo del eje longitudinal de la papila.

A nivel celular, la dermis papilar está constituida principalmente por fibroblastos, los fibroblastos ubicados en la dermis papilar de la piel palmoplantar tienen mayor número extensiones citoplasmáticas, morfología dendrítica en forma de red tridimensional. Sin embargo, los fibroblastos ubicados alrededor de los capilares tienen forma escamosa y están adheridos a ellos a modo de capa envolvente. En la **dermis reticular**, los fibroblastos adquieren una forma plana y estrellada, con expansiones que se anastomosan con células vecinas formando un emparillado bidimensional con líneas paralelas entre las que se aprecian fibras delgadas de unos 2µm que podrían ser fibras nerviosas (Omagari and Ogawa 1990; Lu et al. 2002). Finalmente, otra particularidad a destacar en la piel palmoplantar, es la unión dermo-hipodérmica, la cual no está bien definida en la piel palmoplantar con respecto a la piel fina (Thoolen et al. 2000).

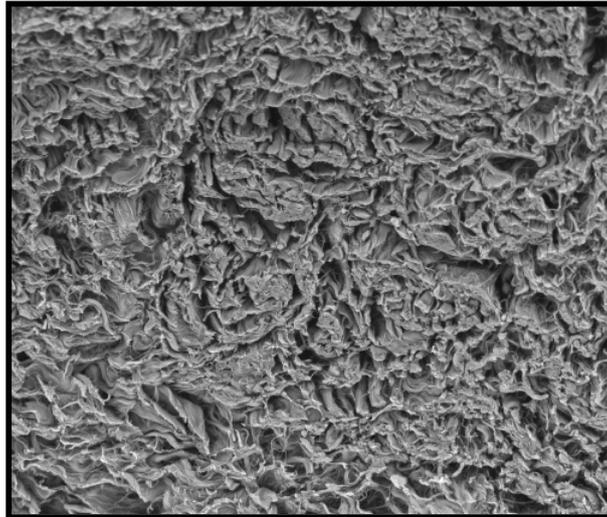


Figura 29. Imagen de microscopía electrónica de barrido de la dermis de piel palmar a 525x donde se aprecian principalmente los haces de colágeno cortados transversalmente.

2.2.2.3.2. Aumento de glándulas sudoríparas ecrinas.

A nivel palmoplantar se localizan mayor número de glándulas sudoríparas ecrinas que en la piel fina (Biedermann et al. 2015), en la zona palmoplantar se contabilizaron unas 620/cm² mientras que a nivel de piel fina unas 65/cm² (Hagforsen et al. 2010). Debido a que la piel palmoplantar tiene menos capa lipídica que la piel fina, por ello en contacto con humedad (agua o sudor) se macera antes y posee más pérdidas de humedad que la piel fina, por eso las glándulas sudoríparas son más numerosas y proporcionan la humedad necesaria (Tagami 2008). La porción más externa de los conductos excretores de las glándulas sudoríparas en la piel palmoplantar se localizan en la cresta epidérmica más profunda, o también llamada primaria, entre dos filas de papilas dérmicas (Sangiorgi et al. 2005). En el punto donde el conducto excretor penetra través de la dermis de la piel palmoplantar se aprecia un engrosamiento de la epidermis, probablemente sea un mecanismo de protección de las glándulas sudoríparas ecrinas ante las fuerzas tangenciales (Thoolen et al. 2000) (figura 30). Otras diferencias funcionales descritas en estudios, describen que el sudor aumenta linealmente con el ejercicio en piel fina pero no en la piel palmoplantar (Buard et al. 2010) y que el tabaco produce mayor sudoración en la piel palmoplantar pero no en la piel fina (Uehara et al. 2010).

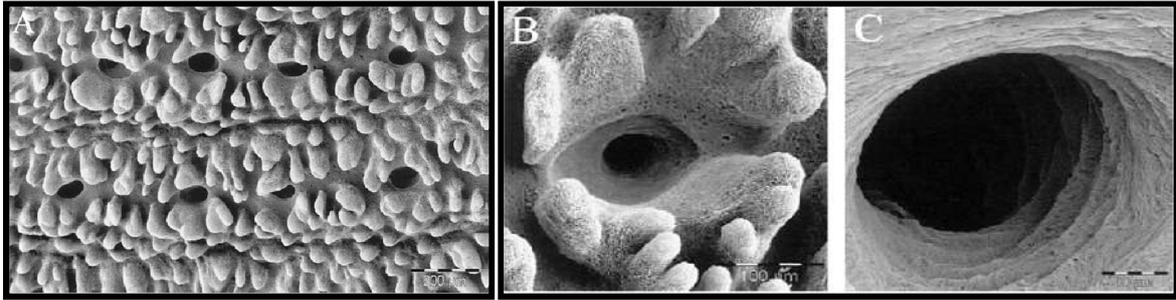


Figura 30. Imágenes con microscopía electrónica de barrido de piel palmoplantar donde se aprecia la distribución en paralelo del inicio del acrosiringio en la unión dermoepidérmica y su disposición con regularidad en el fondo de las crestas epidérmicas primarias (A). A mayor aumento se aprecia la salida de la dermis del conducto excretor de las glándulas sudoríparas (B y C) (Sangiorgi et al. 2005).

2.2.2.3.3. Diferencias de la inervación.

La piel plantar es lo único que nos mantiene unidos físicamente al suelo durante la posición bípeda, tanto en estática como dinámica. Es la interfase entre hombre y tierra, por lo que no es de extrañar que tenga una inervación nerviosa sensitiva especial. Las diferencias en la morfología y neurofisiología de la piel fina y palmoplantar proporciona las diferencias sensoriales entre ambos tipos de piel. Fibras nerviosas en la piel palmoplantar suelen poseer mayor velocidad de conducción que en la piel fina (Zimmerman et al. 2014).

La piel palmoplantar cuenta con un mayor número de terminaciones nerviosas y concretamente de forma encapsulada rodeadas de tejido conjuntivo (Rook and Fonseca Capdevila 1988; Ross and Pawlina 2016). Como ejemplos de terminación nerviosa encapsulada, se encuentran los corpúsculos de Pacini en hipodermis y dermis profunda. También son muy numerosos los corpúsculos de Meissner que se encuentran en las papilas dérmicas y son muy abundantes en los pulpejos de los dedos. Por el contrario, los corpúsculos de Ruffini se encuentran principalmente en la dermis de la piel fina ya que son mecanorreceptores que responde al estiramiento de la piel (Zimmerman et al. 2014) y como se ha descrito anteriormente, la piel fina posee mayor capacidad de estiramiento que la piel palmoplantar (Wang and Hayward 2007). La mayor capacidad de estiramiento de la piel fina se debe a una menor conexión entre dermis e hipodermis, la cual genera diferencias significativas en la sensibilidad de movimiento de aferentes táctiles en la piel fina y palmoplantar. Por ello, la mayoría de aferencias en el dorso de la mano responden a lo largo del rango fisiológico de movimiento de la articulación, aumentando su frecuencia de activación a medida que la piel se estira durante la flexión de las articulaciones digitales, mientras que esto no se observa a nivel palmar (Macefield 2005).

Además de diferencias entre la piel fina y palmoplantar, también se encuentran diferencias entre la palma y la planta, ya que la mayoría de los mecanorreceptores

plantares son de adaptación rápida (70%), a diferencia de a nivel palmar, donde la mayoría son de adaptación lenta (figura 31) (Kennedy and Inglis 2002). Por otra parte, estudios desarrollados por McGlone sostienen que las fibras nerviosas C táctiles se encuentran exclusivamente en piel fina y no se detectan en la piel palmoplantar (McGlone et al. 2012). En contraste a estos estudios, Treede afirma la existencia de fibras C en la piel palmoplantar, pero con diferente velocidad de conducción que en la piel fina (Treede et al. 1995).

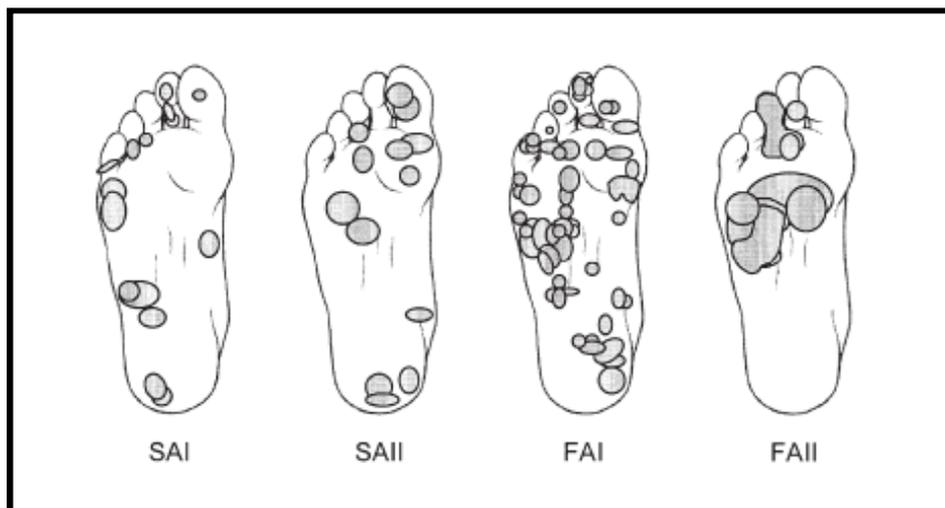


Figura 31. Mapa de mecanorreceptores plantares. Células de Merkel (SAI), Corpusculo de Ruffini (SAII), Corpúsculo de Meissner (FAI) y Corpúsculo de Pacini (FAII) La mayoría de los mecanorreceptores plantares son de adaptación rápida (70%),.. (Kennedy and Inglis 2002).

Respecto a la percepción de estímulo doloroso, la piel palmoplantar tiene menos nociceptores que la piel fina (Hilliges et al. 1995). Motivo por el cual las intensidades dolorosas son mayores en piel fina que en la piel palmoplantar. Este hecho se relaciona con que la latencia de percepción en la piel palmoplantar es inferior a la piel fina y a que los nociceptores térmicos en piel palmoplantar se encuentran al doble de profundidad que en piel fina (Frahm et al. 2010).

Tras el estudio de las terminaciones nerviosas encapsuladas de la piel palmoplantar con respecto a la piel fina, otra diferencia se encuentra a nivel de las células de Merkel, las cuales son más abundantes en la piel palmoplantar sobre todo a expensas de los pulpejos de los dedos (Munde et al. 2013; Hall and Guyton 2016). Aparte de las diferencias descritas anteriormente, existen otras diferencias relacionadas con la sensibilidad nerviosa de la piel y su mecanismo de activación del sistema nervioso central y periférico. En este sentido, mediante análisis cerebral por tomografía por emisión de positrones (PET) se describe que un mismo estímulo táctil superficial de la

piel activa zonas cerebrales diferentes, ya que al estimular la piel fina del antebrazo se produce una respuesta emocional y afectiva (sistema límbico), mientras que el mismo estímulo de la piel palmar produce una respuesta objetiva-analítica (corteza somatosensitiva) (McGlone et al., 2012). Por el contrario, no se han encontrado diferencias entre piel fina y palmoplantar a nivel de los termorreceptores epidérmicos (Atherton et al. 2007), ni tampoco en la variación de la sensibilidad vibratoria dependiendo de la temperatura (frío aumenta el umbral y el calor disminuye el umbral en todas las áreas anatómicas estudiadas por igual) (Schlee et al. 2009).

2.2.2.3.4. Diferencias vasculares.

La piel palmoplantar posee mayor aferencia vascular que la piel fina y posee un único sistema de vasoconstricción por medio del sistema nervioso simpático noradrenérgico, mientras que la piel fina posee dos sistemas, uno de vasoconstricción y otro de vasodilatación, mediados también por el sistema nervioso noradrenérgico (Metzler-Wilson et al. 2012; Buard et al. 2010; Wilson et al. 2005; Yamazaki and Sone 2006).

La piel palmoplantar posee numerosas anastomosis arteriovenosas (AAVs) a nivel de la base del asa capilar de la papila dérmica, mientras que la piel fina carece de ellas. Estas AAVs son vasos musculares inervados por el sistema simpático noradrenérgico que cuando se dilatan permiten un cortocircuito entre la arteria y la vena a nivel de la base papilar, produciendo una disminución del flujo sanguíneo al final del asa capilar (Metzler-Wilson et al. 2012; Buard et al. 2010; Yamazaki and Sone 2006) (figura 32).

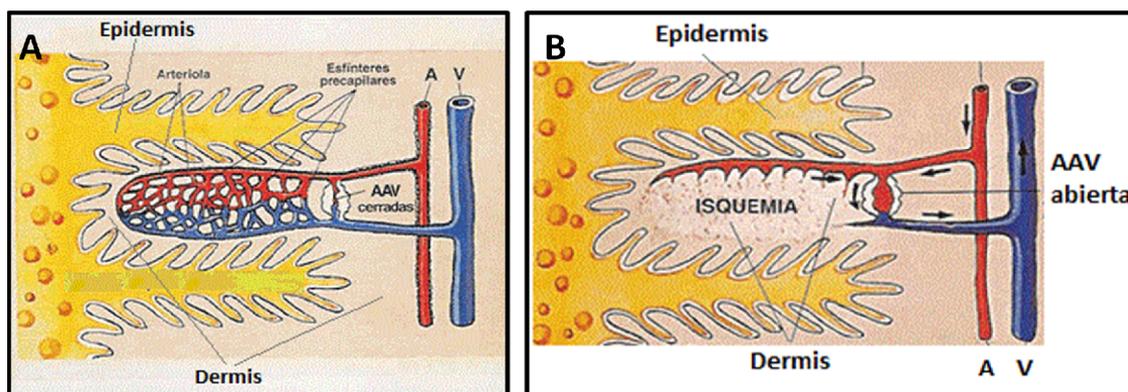


Figura 32. Esquema de la anastomosis arteriovenosa (AAV) de la piel palmoplantar cuando está cerrada (A) y cuando está abierta (B). Imagen procedente de recurso electrónico <http://www.agroparlamento.com/agroparlamento/notas.asp?n=2134>.

Estas dos diferencias, de inervación nerviosa y de presencia de AAVs conlleva a que la piel palmoplantar posea una mayor capacidad de autorregulación del flujo sanguíneo (Wilson et al. 2005; Buard et al. 2010).

A parte de las diferencias estructurales descritas anteriormente, otros estudios ponen de manifiesto diferencias vasculares entre piel fina y palmoplantar a nivel funcional, afirmando que el calentamiento local de la piel no produce un máximo flujo sanguíneo en la piel palmoplantar pero sí en la piel fina (Metzler-Wilson et al. 2012). Estudios de Uehara en el 2010 afirman que el tabaco produce un aumento adicional de la vasoconstricción en caso de estrés mental en la piel palmoplantar y el ejercicio físico moderado produce efectos vasodilatadores que contrarrestan la vasoconstricción del estrés mental (Uehara et al. 2010). Estudios relacionados con el entrenamiento físico demuestran que dicho entrenamiento aumenta la temperatura de la piel palmoplantar pero no la de piel fina durante el estrés mental (Yano et al. 2009). En general, el ejercicio disminuye la sensibilidad para la vasodilatación térmica en la piel palmoplantar y no en la fina. La piel palmoplantar tiene capacidad de amortiguación los cambios de flujo sanguíneo inducidos por cambios en la presión sanguínea por mecanismos de autorregulación, ausentes en la piel fina (Buard et al. 2010). Todos estos estudios hacen pensar que la piel palmoplantar podría tener propiedades neuroendocrinas como así demuestra la expresión de marcadores específicos como la sinaptofisina (Hagforsen et al. 2010).

2.2.2.4. Diferencias histológicas de la piel palmoplantar en la hipodermis.

Tras describir las principales diferencias a nivel epidérmico, unión dermoepidérmica y de la dermis, en el presente apartado se describirán las principales diferencias de la piel palmoplantar con respecto a la piel fina a nivel de la hipodermis. En este contexto, es importante poner de relieve que la separación entre la dermis e hipodermis está poco definida en comparación con la piel fina (Thoolen et al. 2000). Con respecto a la zona plantar, cabe mencionar que la hipodermis posee bandas fibrosas de colágeno y elastina que van desde la capa dérmica a la fascia profunda, proporcionando una firme unión entre ellas. De esta manera, las bandas forman celdillas fibrosas que encierran la grasa plantar (figura 33) (Kelikian et al. 2011) y permiten un correcto empaquetado de grasa, para una buena amortiguación, disipación y absorción de las altas presiones plantares (Oh et al. 2011). Cuando esta almohadilla de grasa plantar se pierde, desplaza o deteriora, se predispone la aparición de dolor, lesiones cutáneas e incluso úlceras (Rocchio 2009). Es de destacar en esta capa, la gran capacidad de amortiguación, disipación y absorción de presiones entre dos planos duros (suelo y hueso en el caso plantar).

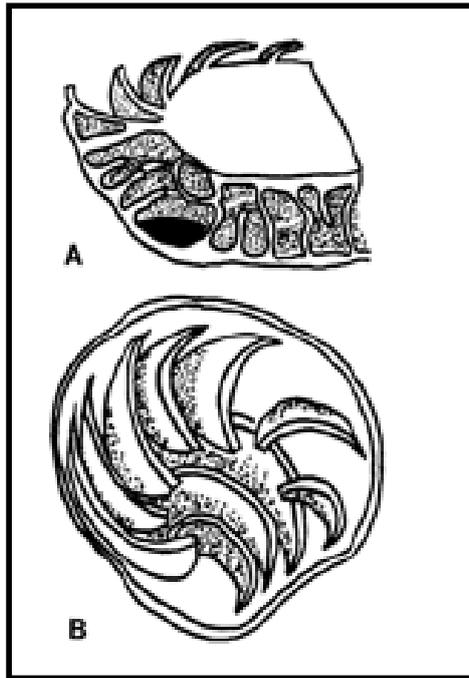


Figura 33. Esquema representativo de la distribución de septos fibrosos que compartimentalizan la grasa a nivel del talón en un corte sagital (A) y en un corte coronal (B) (Kelikian et al. 2011).

2.2.3. DIFERENCIAS FUNCIONALES DE LA PIEL PALMOPLANTAR. INTERACCIÓN DERMEOEPIDÉRMICA.

Es bien conocido que tanto la epidermis como la dermis juegan un papel crucial en el desarrollo sincrónico de ambos tejidos, esta relación está mediada por las interacciones epitelio-mesenquimales, las cuales están determinadas en el proceso de desarrollo embrionario. Concretamente, a nivel palmoplantar, los fibroblastos de la dermis influyen en la expresión genética de las células epidérmicas por medio de la proteína Dickkopf-1 (Dkk1). Esta proteína pertenece al grupo de la familia de las Dickkopf, que están involucradas en el desarrollo embrionario de los vertebrados (Niehrs 2006). Como consecuencia de esta interacción, se ha demostrado que los fibroblastos dérmicos de la piel palmoplantar producen en mayor cantidad la proteína DKK1 que induce cambios a nivel de la epidermis que no se observan en la piel fina como los siguientes:

A) Estímulo de una mayor proliferación de los queratinocitos in vivo (Yamaguchi et al. 2008), lo que conllevaría a un aumento del grosor epidérmico (Yamaguchi et al. 2004).

B) Disminución en el número, crecimiento y función de los melanocitos (Yamaguchi et al. 2008) además de disminuir la maduración de melanosomas y su transferencia a los queratinocitos (Biedermann et al. 2015). Como resultado, se produce una hipopigmentación de la piel palmoplantar.

C) La adición de Dkk1 a cultivos de queratinocitos, produce aumento de expresión de CK9 en los queratinocitos (Yamaguchi et al. 2009).

Estos tres efectos favorecen el mayor grosor y resistencia, además de un color más claro de la epidermis palmoplantar (figura 34).

Diversos estudios, demuestran que utilizando la capacidad de expresión génica que tienen los fibroblastos de la dermis plantar sobre la epidermis, nos permite utilizar epidermis de piel fina sobre la dermis palmoplantar, pues estos queratinocitos comenzarán a comportarse como queratinocitos propios de esta zona. Tradicionalmente, los injertos de grosor total de piel fina en zonas palmoplantares suelen dar problemas de hiperqueratosis e hiperpigmentación. Por el contrario, el uso de injertos de una capa de queratinocitos obtenidos de piel fina sobre dermis palmoplantar no producen ni hiperqueratosis ni hiperpigmentación y tras seis meses se observa la expresión de CK9 (Yamaguchi et al. 2001) típico perfil de expresión encontrado en la epidermis palmoplantar. En la misma línea, otro autor concluye que los queratinocitos de piel fina (sin expresión de CK9) implantados sobre fibroblastos de piel palmoplantar, expresaron CK9 (Biedermann et al. 2015). Estos hallazgos confirman que la interacción dermoepidérmica es de crucial importancia para el desarrollo de la epidermis y la dermis palmoplantar (Yamaguchi et al. 1999; Yamaguchi et al. 2001; Ebersole et al. 2010).

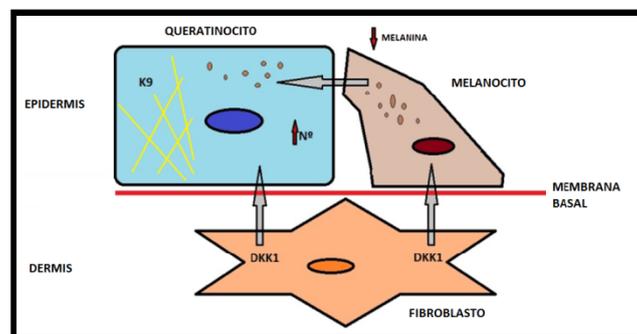


Figura 34. Esquema de la interacción dermoepidérmica de la piel palmoplantar, donde el fibroblasto por medio de una mayor producción de DKK1, induce una menor producción de melanina en el melanocito, una mayor expresión de CK9 y un aumento en la proliferación en el queratinocito.

A lo largo de este apartado se han descrito las principales diferencias histológicas de la piel palmoplantar respecto a la piel fina, el principal objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral. Las diferencias existentes entre la piel fina y la piel palmoplantar se deben principalmente a factores genéticos y epigenéticos. Con respecto a los factores genéticos, cabe destacar que la expresión de genes asociados a piel fina o gruesa está determinada en las primeras semanas de desarrollo fetal. En este sentido, las crestas

dérmicas se forman en el tercer mes de vida fetal (Poirier and Massot 2002) y autores como Geneser y Thoolen han descrito la piel palmoplantar fetal más gruesa con respecto a la piel fina fetal (Geneser 2006; Thoolen et al. 2000). Así mismo la expresión de CK9, la citoqueratina típica de la piel palmoplantar, aparece en la semana veinte de desarrollo fetal (Knapp et al. 1986) marcando el proceso de diferenciación terminal de la piel palmoplantar. A nivel epigenético existen factores externos tales como la presión mecánica, la concentración de calcio y de vitamina A, que podrían influir sobre las principales características de la piel palmoplantar (Yamaguchi et al. 1999).

2.2.4. PATOLOGÍAS DE LA PIEL PALMOPLANTAR.

La anatomía, la histología y la función normal de la piel palmoplantar pueden verse afectada por diversas patologías de tipo congénitas y con mayor frecuencia las adquiridas. Dentro de las patologías congénitas cabe destacar el grupo de las **queratodermias palmoplantares**, que son una variedad heterogénea de alteraciones caracterizadas por un gran engrosamiento que afecta específicamente a la piel palmoplantar (Van Steensel 2010; Sakiyama and Kubo 2016; Kierszenbaum and Tres 2012). Así mismo, otra patología de etiología desconocida con posible implicación inmunológica es el **eccema dishidrótico**, que cursa con unas vesículas que originan picor y quemazón a nivel palmoplantar (Nishizawa 2016).



Figura 35. Queratodermia palmoplantar (A y B), eccema dishidrótico (C).

Las patologías palmoplantares que más frecuentemente se ven en consulta son las de tipo adquirido, entre las que destacan las de causa **traumática y tumoral**. Así mismo, existen patologías de tipo sistémico como la diabetes, la artritis o problemas vasculares que favorecen la presencia de **úlceras** a nivel plantar (Kasiya et al. 2017). El tratamiento de dichas patologías requiere frecuentemente intervención quirúrgica, en donde se suelen usar colgajos o autoinjertos de la piel palmoplantar vecina o del

miembro contralateral, ya que el uso de piel fina completa para reparar estas zonas genera numerosos problemas. En el caso de patologías severas donde la reconstrucción quirúrgica no es posible se recurre a la amputación (Oh et al. 2011; Simman 2004; Liu et al. 2014; Nagata et al. 2013; Zhang et al. 2009; Maker and Iteld 2015). **La atrofia o desplazamiento de la hipodermis** a nivel plantar produce una alteración de la almohadilla plantar grasa plantar, predisponiendo así, la aparición de dolor, lesiones cutáneas e incluso úlceras (Rocchio 2009).

La xerosis es una sequedad extrema de la piel, que cursa con alteraciones de la estructura de la capa córnea de la piel, así como del metabolismo hídrico, que da lugar a una piel seca, áspera y cuya causa suele estar asociada a enfermedades como la diabetes, atopia, déficit de vitamina A y a factores externos como los ambientes de temperaturas extremas y de poca humedad o medicamentos (Parker et al. 2017). A nivel de la piel plantar se localizan **lesiones hiperqueratósicas** como los IPKs (intractable plantar keratosis) (Garcia Carmona et al. 2009; Tollafeld 2017; Brousseau-Foley and Cantin 2015), causantes de gran dolor, impotencia funcional y alteraciones posturales nocivas en el resto del organismo, a los que se le aplica diferentes tipos de tratamientos.



Figura 36. Carcinoma (A), melanoma (B), traumatismo (C), úlcera (D), IPK (E), xerosis (F) y helomas miliares (G). Procedente de recurso electrónico <http://www.masdermatologia.com/pdf/0085.pdf> (A), <http://www.newhealthadvisor.com/mole-on-bottom-of-foot.html> (B), <http://medsaludin.es/que-hacer-si-se-corta-con-el-vidrio-primeros-ayudios.html> (C).

3.- OBJETIVOS E HIPÓTESIS.

3.1.- OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

- Realizar una caracterización de la piel de la región palmoplantar para determinar patrones histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos como base para la generación de tejidos mediante ingeniería tisular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar la epidermis de la piel palmoplantar humana a nivel histológico, histoquímico e inmunohistoquímico utilizando marcadores específicos de diferenciación epitelial.
- Determinar la estructura, la ultraestructura y los componentes de la membrana basal de la piel palmoplantar humana a nivel histológico, histoquímico e inmunohistoquímico.
- Caracterizar la dermis de la piel palmoplantar humana a nivel histológico, histoquímico e inmunohistoquímico utilizando marcadores de diferenciación específicos de las células y la matriz extracelular del tejido conectivo dérmico.
- Caracterizar la hipodermis de la piel palmoplantar humana a nivel histológico, histoquímico e inmunohistoquímico utilizando marcadores de diferenciación específicos de las células y la matriz extracelular del tejido conectivo hipodérmico.
- Establecer criterios de selección de los diferentes tipos de piel humana para aplicaciones clínicas específicas.

3.2. HIPÓTESIS.

A nivel plantar existen numerosas lesiones dolorosas causantes de gran invalidez, entre ellas el heloma neurofibroso y el quiste de inclusión o el heloma inveterado, las cuales no están bien descritas desde un punto de vista científico, además de los traumatismos, tumores y quemaduras. Así mismo, las peculiaridades histológicas e histofuncionales de la piel palmoplantar humana no han sido determinadas hasta el momento, siendo muy escasas las publicaciones científicas sobre este tema. Todo ello hace necesario estudiar la estructura y función de la piel palmoplantar. En este sentido, comprender mejor histofisiología de la región palmoplantar, incluyendo las uniones entre queratinocitos, la composición de la membrana basal o la matriz extracelular de la dermis, constituye un reto a nivel científico encaminado hacia la búsqueda de nuevas y mejores alternativas terapéuticas tales como la generación de este tipo de piel mediante ingeniería tisular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Muestras de piel humana.

Para la presente Tesis Doctoral se obtuvieron muestras humanas de piel dorsal de la mano (PDM), piel de la palma de la mano (PPM), piel dorsal del pie (PDP) y piel de la planta del pie (PPP) de 6 donantes cadavéricos (<24h) cuya edad osciló entre 19 y 80 años (promedio 48.8 ± 21.0). Tanto la piel palmoplantar como la fina se obtuvieron de los mismos donantes para evitar variaciones interpersonales. En cada caso, se obtuvieron biopsias de piel de grosor completo, con un tamaño promedio de 1cm^2 aproximadamente, por medio de un bisturí frío de las siguientes zonas anatómicas: 1) la piel fina de la mano del dorso de los metacarpianos (PDM) y la palmar a nivel de las cabezas metacarpales (PPM) y 2) la piel fina del pie del dorso de los metatarsianos (PDP) y la plantar a nivel de las cabezas metatarsales (PPP). Para la realización del estudio se obtuvo una autorización del Departamento de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

4.2. Análisis histológico de las muestras de piel humana.

Una vez obtenida cada muestra se dividió en tres fragmentos y se fijaron en tres soluciones fijadoras. La primera de ellas, formaldehído neutro tamponado al 4,0% (para microscopía óptica, histoquímica e inmunohistoquímica para Melan-A, CD1A, esmotelina, SMA-ACT, CD-31 y D2-40), la segunda, methacarn que consiste en 60% de metanol, 30% de cloroformo y 10% de ácido acético glacial (para la inmunohistoquímica de CK5/6, CK7, CK9, CK10, CK20, claudina-1, DSPK 1-2, involucrina, filagrina, laminina, colágeno tipos I, III y IV, decorina, biglicano y versicano) y finalmente en glutaraldehído al 2.5% (para microscopía electrónica). Las muestras fijadas en formaldehído y methacarn se incluyeron en parafina, se realizaron secciones de $5\mu\text{m}$ y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) usando métodos de rutina. Las secciones teñidas con H&E se fotografiaron usando un microscopio óptico Nikon Eclipse 90i (Nikon Corp., Tokio, Japón) y se cuantificó el grosor de cada estrato epitelial en cada muestra usando una escala como referencia.

4.3. Análisis inmunohistoquímico de las muestras de piel humana.

Las proteínas específicas de la piel en epidermis, membrana basal y dermis se detectaron mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos primarios anti-Melan-A para la detección de melanocitos, CD1A para la identificación de células de Langerhans, citoqueratina 20 (CK20) para células de Merkel y CK5/6, CK7, CK9 y CK10, claudina-1, desmoplaquina 1/2, involucrina, filagrina como marcadores epiteliales. Así mismo, se utilizó laminina, colágeno tipo III y IV como marcadores de la unión dermoepidérmica y colágeno I, decorina, biglicano y versicano como marcadores de la dermis. A nivel vascular se usaron esmotelina, SMA-ACT, CD-31, D2-40 y para la valoración hipodérmica vimentina (Tabla 1). Las muestras de tejido previamente cortadas se desparafinaron y se rehidrataron, la recuperación antigénica se llevó a cabo a 98°C solo para tejidos fijados con formalina, debido a que las muestras fijadas en metharcarn no requerían recuperación antigénica. Posteriormente, se eliminó la peroxidasa endógena con 3% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en tampón fosfato salino (PBS) y se realizó un doble bloqueo de los sitios inespecíficos con suero equino y caseína. Seguidamente, se agregaron anticuerpos primarios y las muestras se incubaron en condiciones de humedad mediante el uso de una cámara húmeda durante 12 horas (o/n) a 5°C. Una vez realizada la hibridación con el anticuerpo primario, se procedió a hibridar los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción de Ag-Ac se visualizó usando diaminobencidina (DAB) y se contrastó con hematoxilina de Harris. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio óptico Nikon Eclipse 90i (Nikon Corp., Tokio, Japón) y la intensidad de la señal inmunohistoquímica se evaluó de forma semicuantitativa clasificando en: intensa (+++), moderada (++) , leve (+) o negativa (-) como se describió anteriormente (Garcia-Martinez et al. 2017). Para cuantificar el número de células no queratinocíticas de la epidermis por 100µm de longitud en cada muestra, se usó el anticuerpo Melan-A para los melanocitos, el CD1A para cuantificar las células de Langerhans y la CK20 como marcador de las células de Merkel.

| Anticuerpos | Concentración | Recuperación Ag | Referencia |
|------------------------------|---------------|--|---|
| Antimouse melan-A | RTU | EDTA, pH 8, 95°C durante 25 min | Master Diagnostica, Granada, Spain, cat. Nº. MAD-001767QD |
| Antirabbit CD-1A | RTU | Buffer citrato , pH 6, 95°C durante 25 min | Master Diagnostica, Granada, Spain, cat. Nº. MAD-000673QD |
| Antirabbit citoqueratina 20 | 1:100 | Buffer citrato , pH 6, 95°C durante 25 min | Abcam, Cambridge, UK, cat Nº ab76126 |
| Antirabbit citoqueratina 5-6 | RTU | Buffer citrato , pH 6, 95°C durante 25 min | Master Diagnostica, Granada, Spain, cat. Nº. MAD-210651Q |
| Antimouse citoqueratina 7 | RTU | Buffer citrato , pH 6, 95°C durante 25 min | Master Diagnostica, Granada, Spain, cat. Nº. MAD-001004QD |
| Antimouse citoqueratina 9 | 1:20 | Buffer citrato , pH 6, 95°C durante 25 min | Abcam, Cambridge, UK, cat Nº ab19124 |
| Antimouse citoqueratina 10 | RTU | Buffer citrato , pH 6, 95°C durante 25 min | Master Diagnostica, Granada, Spain, cat. Nº. MAD-000150QD |
| Antimouse claudina-1 | RTU | Buffer citrato , pH 6, 95°C durante 25 min | Master Diagnostica, Granada, Spain, cat. Nº. MAD-000523QD |
| Antimouse desmoplakina 1-2 | RTU | Buffer citrato , pH 6, 95°C durante 25 min | Acris, Herdurante d, Germany, cat Nº AM09122SU-N |
| Antimouse involucrina | RTU | Buffer citrato , pH 6, 95°C durante 25 min | Master Diagnostica, Granada, Spain, cat. Nº. MAD-000164QD |
| Antimouse filagrina | 1:50 | Buffer citrato , pH 6, 95°C durante 25 min | Abcam, Cambridge, UK, cat Nº ab17808 |
| Antimouse laminina | 1:1000 | Buffer citrato , pH 6, 95°C durante 25 min | Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, cat. Nº. L8271 |
| Antirabbit colageno III | 1:250 | Buffer citrato , pH 6, 95°C durante 25 min | Abcam, Cambridge, UK, cat Nº ab7778 |
| Antimouse colageno IV | RTU | EDTA, pH 8, 95°C durante 25 min Pepsina, 37°C durante 5 min | Master Diagnostica, Granada, Spain, cat. Nº. MAD-000733QD |
| Antimouse colageno I | 1:200 | EDTA, pH 8, 95°C durante 25 min | Acris, Herdurante d, Germany, cat Nº R1038 |
| Antigoat decorina | 1:500 | Condroitinasa , 37°C, 60 min | R&D System, cat Nº AF143 |
| Antirabbit biglicano | 1:100 | Buffer citrato , pH 6, 95°C durante 25 min | Abcam, Cambridge, UK, cat Nº ab49701 |
| Antirabbit versicano | 1:100 | Condroitinasa , 37°C, 60 min | Abcam, Cambridge, UK, cat Nº ab19345 |
| Antimouse esmotelina | RTU | EDTA, pH 8, 95°C durante 25 min | Master Diagnostica, Granada, Spain, cat. Nº. MAD-000445QD |
| Antimouse SMA-ACT | RTU | Buffer citrato , pH 6, 95°C durante 25 min | Master Diagnostica, Granada, Spain, cat. Nº. MAD-001195QD |
| Antimouse CD-31 | RTU | EDTA, pH 8, 95°C durante 25 min | Master Diagnostica, Granada, Spain, cat. Nº. MAD-002048QD |
| Antimouse D2-40 | RTU | EDTA, pH 8, 95°C durante 25 min | Master Diagnostica, Granada, Spain, cat. Nº. MAD-000402QD |
| Antimouse vimentina | 1:200 | Buffer citrato , pH 6, 95°C durante 25 min | Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, cat. Nº. V6389 |

Tabla1. Tabla donde se muestran el protocolo utilizado en la presente Tesis Doctoral para la realización de las pruebas inmunohistoquímicas. En ella se recogen los anticuerpos, las concentraciones, la recuperación antigénica para las muestras en formol y las referencias comerciales de los anticuerpos. Preparado para uso directo (RTU).

4.4. Análisis histoquímico de las muestras de piel humana.

Para identificar los principales componentes de la matriz extracelular, tanto fibrilares como no fibrilares de la dermis humana se realizaron técnicas histoquímicas específicas para detectar la presencia de fibras de colágeno, fibras elásticas, fibras reticulares y proteoglicanos. Para esto, las secciones de tejido desparafinado y rehidratado se tiñeron usando el método Fontana-Masson Picrosirius (FMP) para melanina, colágeno y morfología, usando la técnica ideada y descrita por el Dr. Carriel (Carriel et al. 2011). Para detectar la presencia de fibras elásticas histoquímicamente se realizó la tinción de orceína (Oliveira et al. 2013). Posteriormente, para identificar las fibras reticulares se utilizó la técnica de Reticulina de Gomori. Finalmente, la tinción con Alcian Blue se realizó para detectar la presencia de proteoglicanos en las muestras de piel humana, siguiendo protocolos previamente establecidos (Kiernan 1999). El método FMP también se usó para determinar el área ocupada por las células epiteliales en cada estrato epidérmico.

La cuantificación de la señal histoquímica determinada por el porcentaje de área ocupada por estructuras teñidas y la intensidad de la señal, se realizó utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, EE. UU.), como se describió previamente (Carriel et al. 2017; Carriel et al. 2013). La intensidad se determinó seleccionando aleatoriamente 10 puntos de cada imagen usando la herramienta multipunto del software y la intensidad media se calculó restando la señal blanca al valor calculado por el programa. El área se determinó convirtiendo las imágenes en binarias (blanco y negro) y utilizando la función de umbral para aislar los colores de interés. Una vez realizado el binario, la función “fracción de área” se usó para calcular automáticamente el porcentaje de elementos negros (áreas positivas) presentes en un área específica de la sección de tejido. Todas las imágenes fueron tomadas y analizadas usando exactamente las mismas condiciones (tiempo de exposición, balance de blancos, fondo, etc.) con el software Nikon NIS-Elements. Para analizar el área celular de los queratinocitos encontrados en cada estrato y el número de queratinocitos por 100µm de longitud epitelial, se usó el software Nikon NIS-Elements utilizando las muestras teñidas con el método FMP, ya que mostraban una mejor definición del contorno celular.

4.5. Análisis de microscopía electrónica de las muestras de piel humana.

Para microscopía electrónica de barrido (MEB), las muestras biológicas fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5%, deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona (30%, 50%, 70%, 95% y 100%) y preparadas para la realización del punto crítico. Una vez realizado el punto crítico, las muestras se montaron en portaobjetos de aluminio y se recubrieron con oro para su evaluación en un microscopio electrónico de barrido Quanta 200 (FEI, Eindhoven, Países Bajos).

Para microscopía electrónica de transmisión (MET), las muestras fijadas en glutaraldehído al 2,5% se fijaron en tetróxido de osmio al 1%, se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona (30%, 50%, 70%, 95% y 100%), se incluyeron en resina de Spurr y se realizaron cortes en secciones ultrafinas usando un ultramicrotomo. Las secciones ultrafinas se tiñeron con acetato de uranilo acuoso y citrato de plomo y se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión aEM902 (Carl ZeissMeditec, Inc., Oberkochen, Alemania).

4.6. Análisis estadístico de los datos obtenidos en las muestras de piel humana.

El análisis estadístico de las muestras de piel humana, se obtuvieron las medias y las desviaciones estándar para cada tipo de piel (PDM, PPM, PDP, PPP) para los siguientes parámetros cuantitativos: espesor de cada estrato, área celular, número de células encontradas en cada estrato, intensidad y porcentaje de las estructuras teñidas con cada método histoquímico. En segundo lugar, los resultados obtenidos para cada tipo de piel se compararon entre dos grupos diferentes utilizando la prueba U de Mann-Whitney y se consideró el valor p por debajo de 0.05 estadísticamente significativo para las pruebas de doble cola.

5. RESULTADOS.

5.1. Caracterización de la epidermis de la piel palmoplantar humana.

5.1.1. Caracterización histológica por microscopía óptica.

El análisis histológico de las tinciones de Hematoxilina y Eosina mostró que la piel humana del dorso de mano y pie se caracterizan por presentar un epitelio queratinizado estratificado con 8-12 capas de células epiteliales subyacente a un estrato córneo delgado. Por el contrario, la piel palmoplantar mostró un alto número de capas epiteliales que oscilaron entre 30-60 capas aproximadamente y un estrato córneo mucho más grueso. La cuantificación del espesor de las capas epiteliales mostró diferencias significativas entre los grupos comparados y en general, la piel palmar y plantar es significativamente más gruesa que la dorsal del pie y la mano. Además, la piel plantar es significativamente más gruesa que la piel palmar ($p < 0.05$), mientras que la piel dorsal de la mano y del pie mostraron un grosor similar. Cuando se compararon los diferentes estratos epidérmicos, no se encontraron diferencias significativas en el estrato basal de las diferentes muestras. Sin embargo, los estratos espinoso, granuloso y córneo tienden a estar más desarrollados en la piel palmoplantar, especialmente en la región plantar (Figura 37 y Tabla 2).

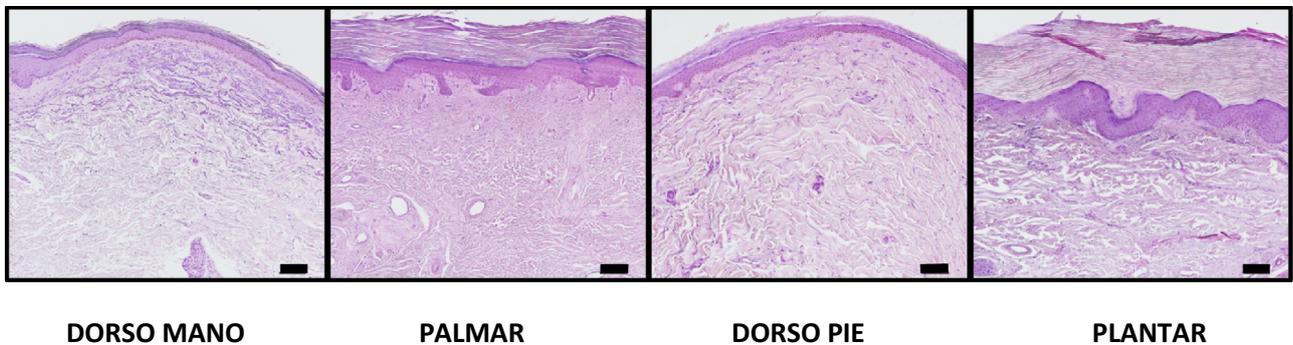
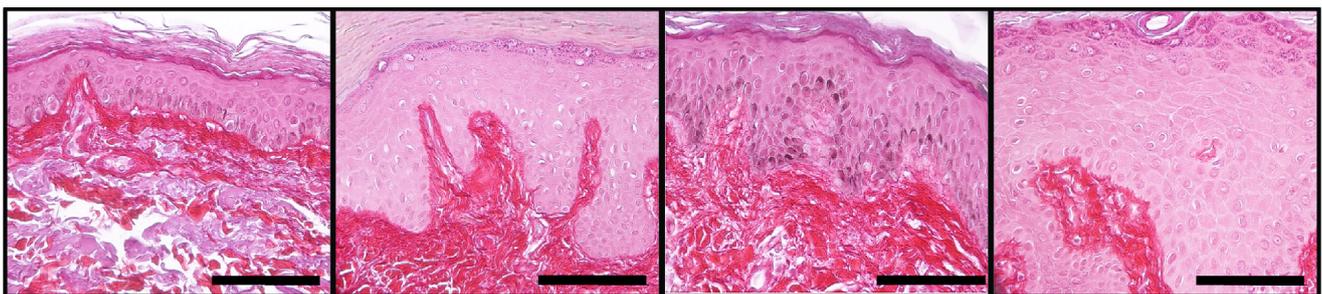


Figura 37. Tinciones de H&E a 100X donde se aprecian una visión global y la diferencia de grosor epitelial en las diferentes muestras de estudio en un mismo individuo, sobre todo a expensas del estrato córneo a nivel palmoplantar. La barra de magnificación mide 100 μ m.

| | GROSOR DE LOS ESTRATOS EN μ | | | | | ÁREA CELULAR EN μ^2 | | | | NUMERO DE CÉLULAS POR CADA 100 μm LINEALES | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------|------------------|-------------------|----------------|-------------------------|------------------|-------------------|----------------|---|------------------|-------------------|----------------|-------------|-----------------------|-------------------|
| | EPIDERMIS | ESTRATO BASAL | ESTRATO ESPINOSO | ESTRATO GRANULOSO | ESTRATO CÓRNEO | ESTRATO BASAL | ESTRATO ESPINOSO | ESTRATO GRANULOSO | ESTRATO CÓRNEO | ESTRATO BASAL | ESTRATO ESPINOSO | ESTRATO GRANULOSO | ESTRATO CÓRNEO | MELANOCITOS | CÉLULAS DE LANGERHANS | CÉLULAS DE MERKEL |
| Piel Dorso Mano (PDM) | 75.1±6.5 | 11.6±0.0 | 22.1±6.5 | 4.2±0.1 | 33.1±1.6 | 57.6±5.5 | 74.2±30.3 | 61.5±19.2 | 32.5±11.4 | 20.3±2.0 | 31.0±3.9 | 7.3±2.4 | 114.3±26.1 | 1.9±0.2 | 1.2±0.2 | 0.07±0.04 |
| Piel Palma Mano (PPM) | 264.0±30.6 | 13.0±2.5 | 46.6±4.5 | 13.1±0.8 | 148.5±36.4 | 58.3±3.3 | 129.7±29.8 | 135.5±53.6 | 66.5±19.6 | 22.2±3.0 | 36.8±5.0 | 11.1±5.0 | 252.1±129.2 | 0.4±0.1 | 0.1±0.0 | 0.36±0.10 |
| Piel Dorso Pie (PDP) | 116.5±85.2 | 13.4±3.9 | 45.9±37.3 | 7.9±8.5 | 35.9±27.8 | 59.8±11.1 | 91.0±41.6 | 83.4±52.7 | 31.8±5.1 | 22.3±3.6 | 44.3±17.9 | 8.4±4.1 | 101.4±11.5 | 2.6±2.1 | 2.6±1.6 | 0.03±0.03 |
| Piel Planta pie (PPP) | 724.4±232.0 | 15.8±4.7 | 126.7±60.1 | 29.7±14.4 | 487.7±160.2 | 70.7±16.9 | 195.5±45.1 | 217.4±49.9 | 128.7±31.2 | 22.3±3.5 | 63.1±20.8 | 13.4±6.0 | 392.7±136.7 | 0.7±0.5 | 1.1±1.2 | 0.37±0.26 |
| Pie | 448.1±361.4 | 90.0±64.4 | 19.8±16.2 | 91.5±53.1 | 282.3±262.3 | 65.7±15.0 | 148.0±68.5 | 156.5±85.2 | 84.7±55.3 | 22.3±3.3 | 54.5±21.0 | 11.1±5.6 | 260±180.4 | 1.7±1.8 | 1.8±1.5 | 0.20±0.25 |
| Mano | 169.5±103.0 | 34.4±14.1 | 8.6±4.8 | 57.2±42.9 | 90.8±66.2 | 58.0±4.2 | 102.0±40.7 | 98.5±54.4 | 49.5±23.4 | 21.2±2.6 | 33.9±5.2 | 9.2±4.2 | 183.2±113.4 | 1.1±0.8 | 0.7±0.6 | 0.21±0.17 |
| Piel palmoplantar | 540.2±294.6 | 94.7±61.0 | 23.1±13.7 | 115.9±35.4 | 352.0±213.0 | 65.7±14.3 | 169.2±50.8 | 184.7±64.3 | 103.8±41.3 | 22.3±3.1 | 52.6±20.8 | 12.5±5.5 | 336.5±145.7 | 0.6±0.4 | 0.7±1.0 | 0.37±0.19 |
| Piel Fina | 98.1±64.2 | 35.3±29.5 | 6.3±6.3 | 33.9±20.4 | 34.7±19.8 | 58.8±8.6 | 83.5±35.9 | 73.7±40.7 | 32.1±7.9 | 21.4±3.0 | 38.4±14.7 | 7.9±3.3 | 107.1±19.2 | 2.3±1.6 | 2.0±1.3 | 0.05±0.04 |
| PDP vs. PDM | 0.6213 | 0.6213 | 0.3231 | 0.6213 | 0.6213 | 0.6213 | 0.6213 | 0.3231 | 0.6242 | 0.3231 | 0.1383 | 1.000 | 0.8064 | 0.6213 | 0.0481 | 0.12133 |
| PDP vs. PPP | 0.0062 | 0.4652 | 0.0285 | 0.0176 | 0.0062 | 0.2733 | 0.0106 | 0.0062 | 0.0061 | 0.8551 | 0.1441 | 0.1441 | 0.0061 | 0.0465 | 0.0758 | 0.0084 |
| PPP vs. PPM | 0.0101 | 0.3909 | 0.0101 | 0.0862 | 0.0101 | 0.3909 | 0.0319 | 0.0862 | 0.0101 | 1.000 | 0.0101 | 1.000 | 0.1981 | 0.6198 | 0.2109 | 0.6198 |
| PDM vs. PPM | 0.018 | 1.0000 | 0.018 | 0.018 | 0.018 | 1.000 | 0.0180 | 0.0180 | 0.0795 | 0.2367 | 0.2367 | 0.2367 | 0.0795 | 0.0180 | 0.0180 | 0.0179 |
| Pie vs. Mano | 0.1365 | 0.3209 | 0.0471 | 0.3209 | 0.3209 | 0.4421 | 0.2060 | 0.2060 | 0.1860 | 0.4421 | 0.0018 | 0.7780 | 0.5629 | 0.7216 | 0.0611 | 0.5895 |
| Piel Fina vs. Piel palmoplantar | 0.0004 | 0.4134 | 0.0032 | 0.0014 | 0.0002 | 0.4470 | 0.0002 | 0.0001 | 0.0004 | 0.4002 | 0.1564 | 0.0535 | 0.0004 | 0.0009 | 0.0115 | 0.0005 |

Tabla 2. Análisis cuantitativo del grosor, área celular y número de células de la epidermis de la piel humana. El grosor está medido en micras (media±desviación estandar), mientras que el area celular está mostrado en micras cuadradas (media±desviación estandar). Las últimas seis filas corresponden al valor "p" de la comparación estadística de dos grupos específicos de piel. Piel Dorso Mano (PDM), Piel Palma Mano (PPM), Piel Dorso Pie (PDP), Piel Planta pie (PPP).

Estos resultados están de acuerdo con los datos obtenidos para el área de células correspondiente a cada estrato según las mediciones realizadas sobre tinciones con el método FMP (Figura 38). Como se muestra en la Tabla 2, el área de células en el estrato basal fue similar en todas las muestras de piel. Sin embargo, el área de los queratinocitos en los estratos espinoso y granuloso de la piel palmoplantar eran más del doble que las mismas células que se encuentran en la piel fina, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Además, los corneocitos a nivel plantar tenían un área significativamente más alta que los corneocitos de la región palmar. Por otro lado, la cuantificación del número de células encontradas por unidad de longitud ($100\mu\text{m}$), reveló que el número de células tendía a ser similar entre los diferentes tipos de piel en los estratos basal y granuloso, mientras que se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el estrato espinoso al comparar la piel del pie frente a la piel de la mano, especialmente cuando se consideró la piel palmoplantar de estas dos regiones (Figura 38). El número de corneocitos del estrato corneo fue significativamente mayor en la piel palmoplantar respecto a la piel fina, sobre todo a nivel de la piel plantar.



DORSO MANO

PALMAR

DORSO PIE

PLANTAR

Figura 38. Tinciones con la técnica FMP a 400X de la epidermis de las diferentes muestras de estudio en un mismo individuo, donde se puede distinguir con claridad el contorno de las células epiteliales y calcular su área. Esta técnica permite la marcación de colágeno (en rojo) y de la melanina (en negro) como bien se puede apreciar a nivel del dorso del pie. La barra de magnificación indica $100\mu\text{m}$.

Cuando se cuantificaron otros tipos de células no queratinocíticas de la epidermis por medio de pruebas inmunohistoquímicas, también se encontraron diferencias significativas (Figura 39 y Tabla 2). En resumen, el número de melanocitos encontrados por unidad de longitud (según lo determinado por Melan-A) fue aproximadamente 4 veces mayor en piel fina que en piel palmoplantar, tanto para el pie como para la mano y fue especialmente abundante en el dorso del pie. Estos resultados coinciden con los hallazgos obtenidos mediante la técnica FMP que revela la presencia de melanina principalmente en la piel fina (Figura 38). En cuanto a las células de

Langerhans (según lo determinado por CD1A), la piel fina tenía casi 3 veces más número de células con respecto al número de células que se encuentran en la piel palmoplantar. La piel del dorso del pie mostró más células de Langerhans con respecto a la piel del dorso de la mano ($p < 0,05$). Finalmente, las células de Merkel (determinadas por la CK20) fueron significativamente más abundantes en la piel palmoplantar en comparación con la piel fina (Figura 39 y Tabla 2).

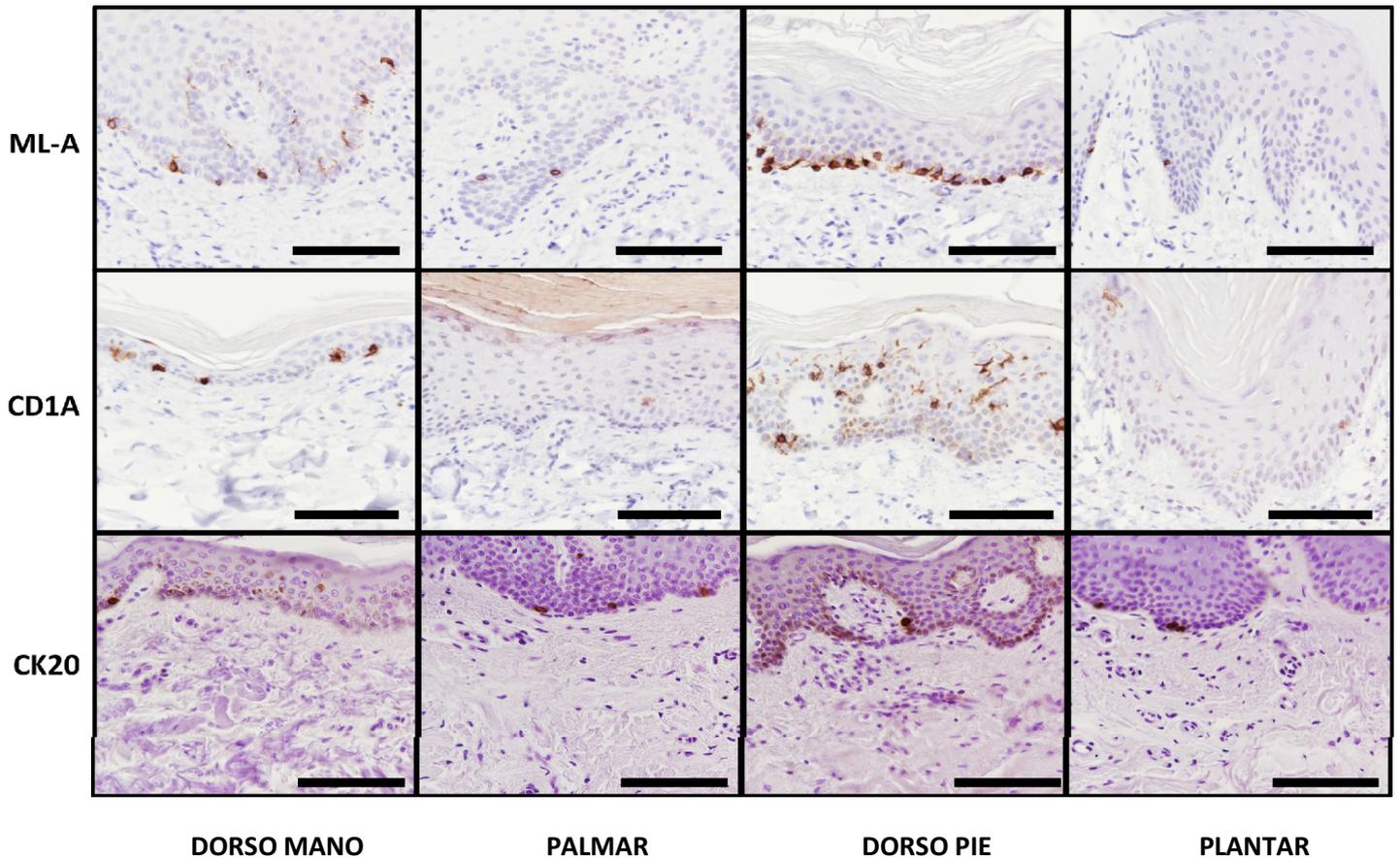


Figura 39. Pruebas inmunohistoquímicas a 400x de la epidermis de las diferentes muestras de estudio en un mismo individuo. En la primera fila se ha marcado la presencia de melanocitos por medio del anticuerpo Melan-A, en la segunda fila se ha marcado las células de Langerhans usando el anticuerpo específico para CD1A y en la tercera fila se pone de manifiesto la presencia de células de Merkel por medio del anticuerpo para la CK20. La barra de magnificación indica 100 μ m.

5.1.2. Caracterización histológica por microscopía electrónica.

Para caracterizar las capas epiteliales más apicales de cada tipo de piel, usamos microscopía electrónica. En primer lugar, la MEB mostró que la superficie de todos los tipos de piel consistía en numerosas células irregulares o poligonales que tienden a desprenderse de las células adyacentes, con muy pocas diferencias entre los tipos de

piel. En segundo lugar, el análisis con MET del estrato córneo mostró que los corneocitos eran muy similares en los cuatro tipos de piel comparados y que todas las células mostraban muy pocas organelas intracelulares con abundantes fibras de queratina. Las células carecían de desmosomas y uniones estrechas, pero mostraron numerosas interdigitaciones entre las células vecinas. Se encontraron espacios vacíos dispersos a lo largo del área de contacto intercelular, lo que sugiere que las células pueden comenzar a separarse unas de otras en esos puntos específicos. Además, los corneodesmosomas eran muy abundantes en el espacio intercelular que se encuentra entre las células vecinas (Figura 40).

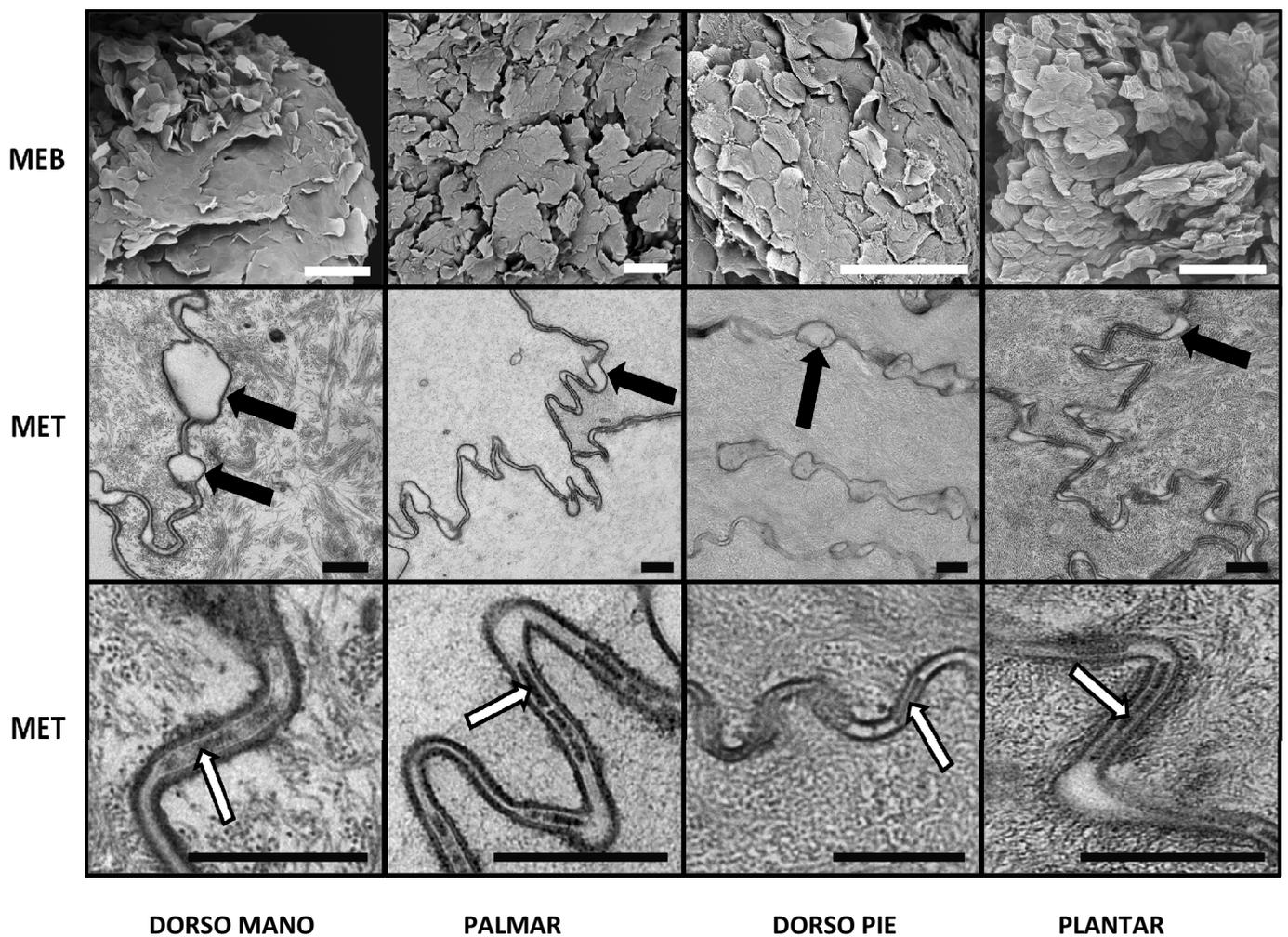


Figura 40. Análisis con microscopía electrónica de los cuatro tipos de piel estudiada en la presente Tesis Doctoral. La primera fila muestra el análisis con microscopía electrónica de barrido (MEB) del estrato córneo donde la barra de magnificación es de 100 μ m. La segunda y tercera fila muestran el análisis con microscopía electrónica de transmisión (MET) del estrato córneo donde la barra de magnificación es de 500nm. En la segunda fila las flechas negras muestran unas dilataciones en las uniones intercelulares donde los corneocitos comienzan a separarse. En la tercera fila, las flechas blancas señalan los corneodesmosomas con signos de degradación. Estos hallazgos indican el comienzo del proceso de descamación.

5.1.3. Caracterización inmunohistoquímica.

Con el fin de identificar proteínas específicas en la capa epitelial de la piel fina y gruesa, se llevó a cabo análisis inmunohistoquímicos. Primero, la detección de citoqueratina CK5/6 reveló expresión positiva intensa en la capa epitelial basal de los cuatro tipos de piel humana, sin diferencias significativas entre muestras en el estrato basal, pero la piel palmoplantar tendió a marcar más en capas suprabasales. Por el contrario, la CK7 fue negativa en el epitelio de todos los tipos de piel. La CK9 fue altamente positiva en el estrato basal y negativa en las suprabasales de la piel delgada de manos y pies (PDM y PDP). Sin embargo, la CK9 fue positivo en los estratos suprabasales y negativo en el estrato basal de piel palmoplantar (PPM y PPP). Finalmente, CK10 fue altamente positivo en los estratos suprabasales de todas las muestras de piel y negativo en los basales (Figura 41 y Tabla 3).

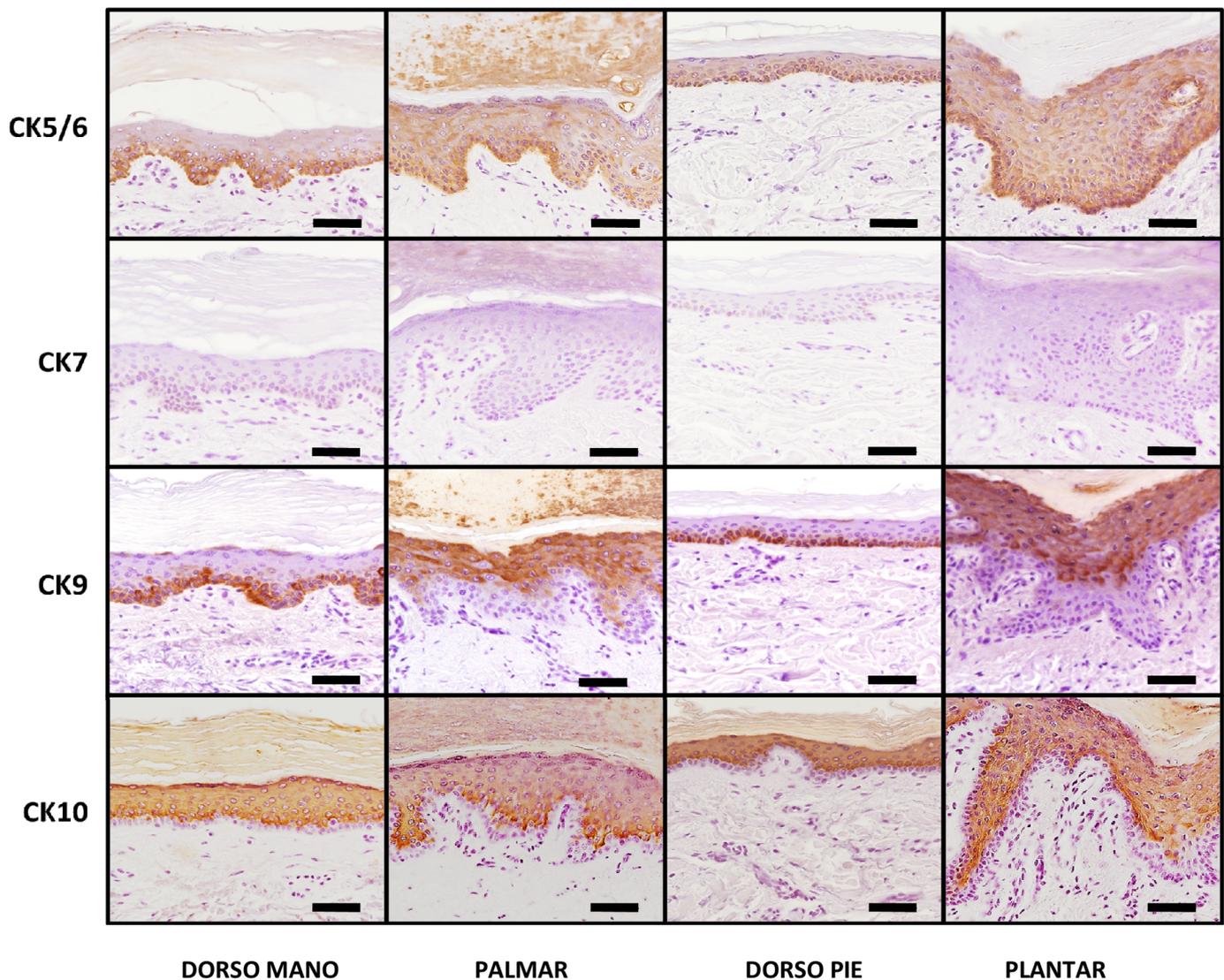


Figura 41. Análisis por inmunohistoquímica de las citoqueratinas Ck5\6, CK7, CK9 Y CK 10 en la epidermis, en los cuatro tipos de piel analizados el presente Tesis Doctoral a 400X. La CK5\6 muestra una fuerte inmunorreacción en el estrato basal de todos los tipos de piel, mientras que los estratos suprabasales es más intensa en la piel palmoplantar. La CK7 es negativa para todos los tipos piel. La CK9 muestra una marcación basal en la piel fina, mientras que por el contrario, en la piel palmoplantar, la marcación es de células bien diferenciadas del estrato espinoso, granuloso y levemente en el córneo. La CK10 muestra una marcación de las células suprabasales. La barra de magnificación mide 50µm

| MARCADOR | PDM | PPM | PDP | PPP |
|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Citoqueratina 5/6 | (EB) +++ / (ES) + | (EB) +++ / (ES) ++ | (EB) +++ / (ES) + | (EB) +++ / (ES) ++ |
| Citoqueratina 7 | (EB) - / (ES) - | (EB) - / (ES) - | (EB) - / (ES) - | (EB) - / (ES) - |
| Citoqueratina 9 | (EB) +++ / (ES) - | (EB) - / (ES) +++ | (EB) +++ / (ES) - | (EB) - / (ES) +++ |
| Citoqueratina 10 | (EB) - / (ES) +++ | (EB) - / (ES) +++ | (EB) - / (ES) +++ | (EB) - / (ES) +++ |
| Claudina-1 | (EB) - / (ES) +++ | (EB) - / (ES) +++ | (EB) - / (ES) +++ | (EB) - / (ES) +++ |
| Desmoplakina 1/2 | (EB) - / (ES) +++ | (EB) - / (ES) +++ | (EB) - / (ES) +++ | (EB) - / (ES) +++ |
| Involucrina | (EB) - / (ES) +++ | (EB) - / (ES) ++ | (EB) - / (ES) +++ | (EB) - / (ES) ++ |
| Filagrina | (EB) - / (ES) ++ | (EB) - / (ES) ++ | (EB) - / (ES) ++ | (EB) - / (ES) ++ |
| Laminina | + | + | ++ | ++ |
| Colágeno III | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Colágeno IV | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Colágeno I | ++ | ++ | ++ | +++ |
| Decorín | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Biglycán | + | + | ++ | +++ |
| Versicán | ++ | + | ++ | ++ |
| Vimentina | ++ | ++ | ++ | ++ |

Tabla 3. Análisis inmnohistoquímico de los componentes más relevantes de la epidermis, membrana basal, dermis e hipodermis. Expresión en el estrato basal de la epidermis (EB), y expresión en el estrato suprabasal de la epidermis (ES). La señal de intensidad fue valorada semicuantitativamente mediante la escala de alto (+++), medio (++) , bajo (+) o negativo (-). Piel Dorso Mano (PDM), Piel Palma Mano (PPM), Piel Dorso Pie (PDP), Piel Planta pie (PPP).

El análisis de las uniones intercelulares según lo determinado por inmunohistoquímica reveló la expresión positiva de claudina-1 y desmoplakina 1/2 en capas suprabasales de todos los tipos de piel estudiados en la presente Tesis Doctoral, especialmente en el estrato espinoso, con muy pocas diferencias entre las muestras (Figura 42 y Tabla 3).

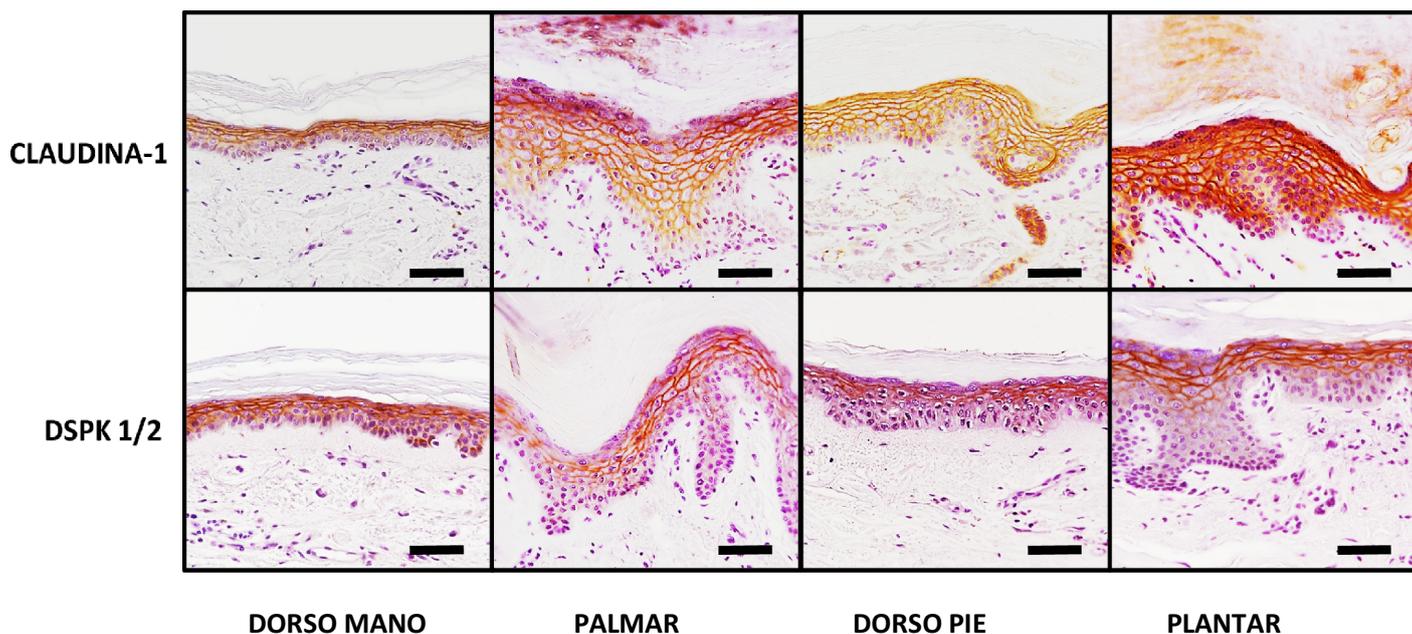


Figura 42. Análisis inmunohistoquímico de las proteínas de gran relevancia en la uniones intercelulares de la epidermis de todos los tipos de piel estudiados a 400X. Tanto la Claudina-1 como la desmoplaquina 1-2 (DSPK1-2), mostraron una importante marcación en los estratos suprabasales de todos los tipos de piel, con mayor intensidad en el espinoso. La barra de magnificación mide 50µm.

La determinación de los marcadores de diferenciación epitelial involucrina y filagrina demostró que ambos marcadores fueron positivos en todas las muestras, aunque los patrones de expresión fueron diferentes. Primero, la involucrina fue positiva en las capas suprabasales, especialmente en el estrato granuloso y en las capas más apicales del estrato espinoso, sin señal en el estrato córneo, siendo la expresión de esta proteína ligeramente más intensa en piel fina que en piel palmoplantar. Para la filagrina, la expresión fue suprabasal, pero restringida al estrato granuloso, con ligera expresión en el estrato córneo. Para la involucrina y la filagrina, la señal que se encuentra en la piel delgada tiende a ser nítida y bien delimitada, mientras que en la piel palmoplantar muestra un patrón más difuso, distribuido a lo largo de un mayor número de capas de células epiteliales (Figura 43 y Tabla 3).

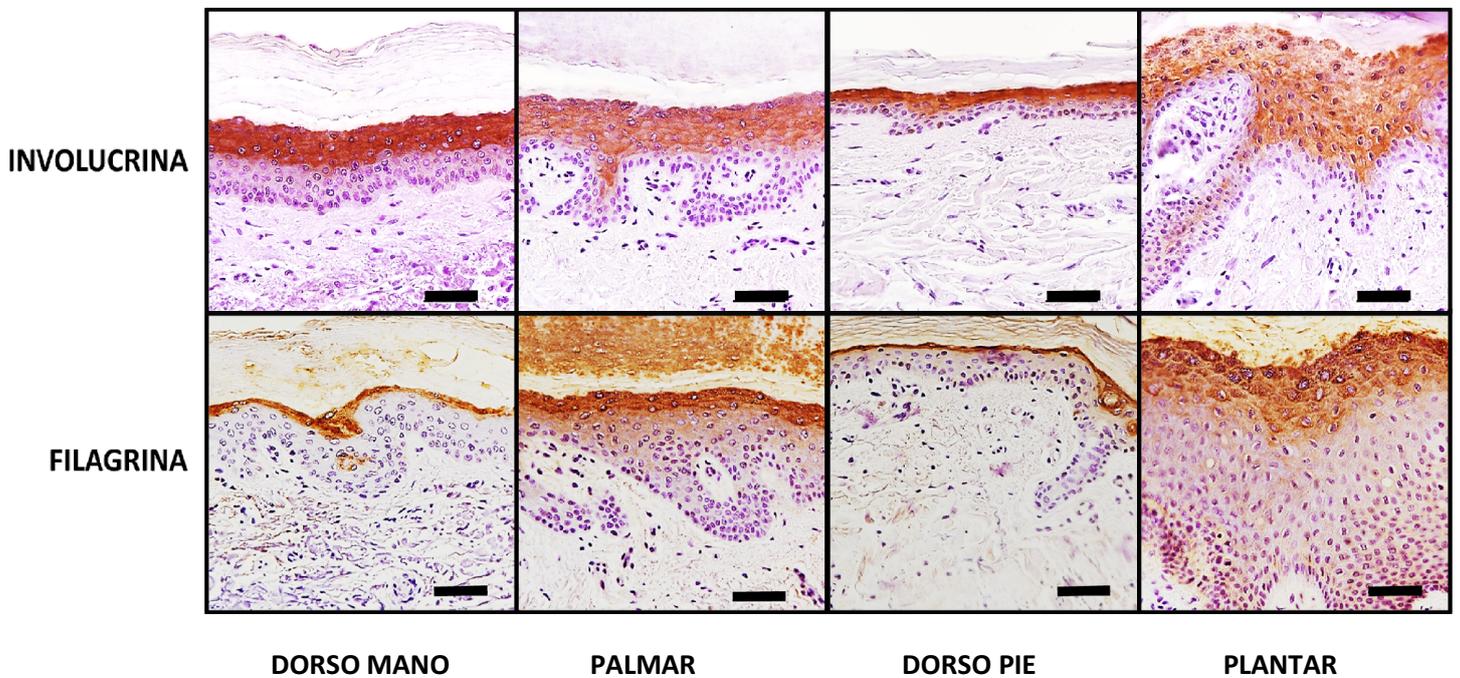


Figura 43. Análisis inmunohistoquímico de las proteínas de diferenciación terminal de la epidermis de todos los tipos de piel estudiado a 400X. La involucrina en la primera fila muestra una intensa marcación en las capas suprabasales en todas las muestras, siendo un poco más intenso en la piel fina de manos y pies. Respecto a la filagrina en la segunda fila, muestra una intensidad de marcación más moderada que la anterior en el estrato granuloso y ligeramente en el córneo, sin distinción entre tipos de piel. La barra de magnificación mide 50µm.

5.2. Caracterización de la membrana basal de la piel palmoplantar humana por inmunohistoquímica y microscopía electrónica.

El análisis de los principales componentes de la membrana basal en la piel mediante métodos inmunohistoquímicos mostró, una intensa expresión positiva de laminina, colágeno III y colágeno IV en la unión dermoepidérmica de todos los tipos de piel. Las diferencias entre las muestras fueron mínimas para el colágeno III y IV, aunque la expresión de laminina tendió a ser más intensa en la piel del pie (PDP y PPP) en comparación con la piel de la mano (PDM y PPM). Sin embargo, el colágeno IV fue muy positivo en la membrana basal de los cuatro tipos de piel, sin diferencias entre las muestras (Figura 44 y Tabla 3).

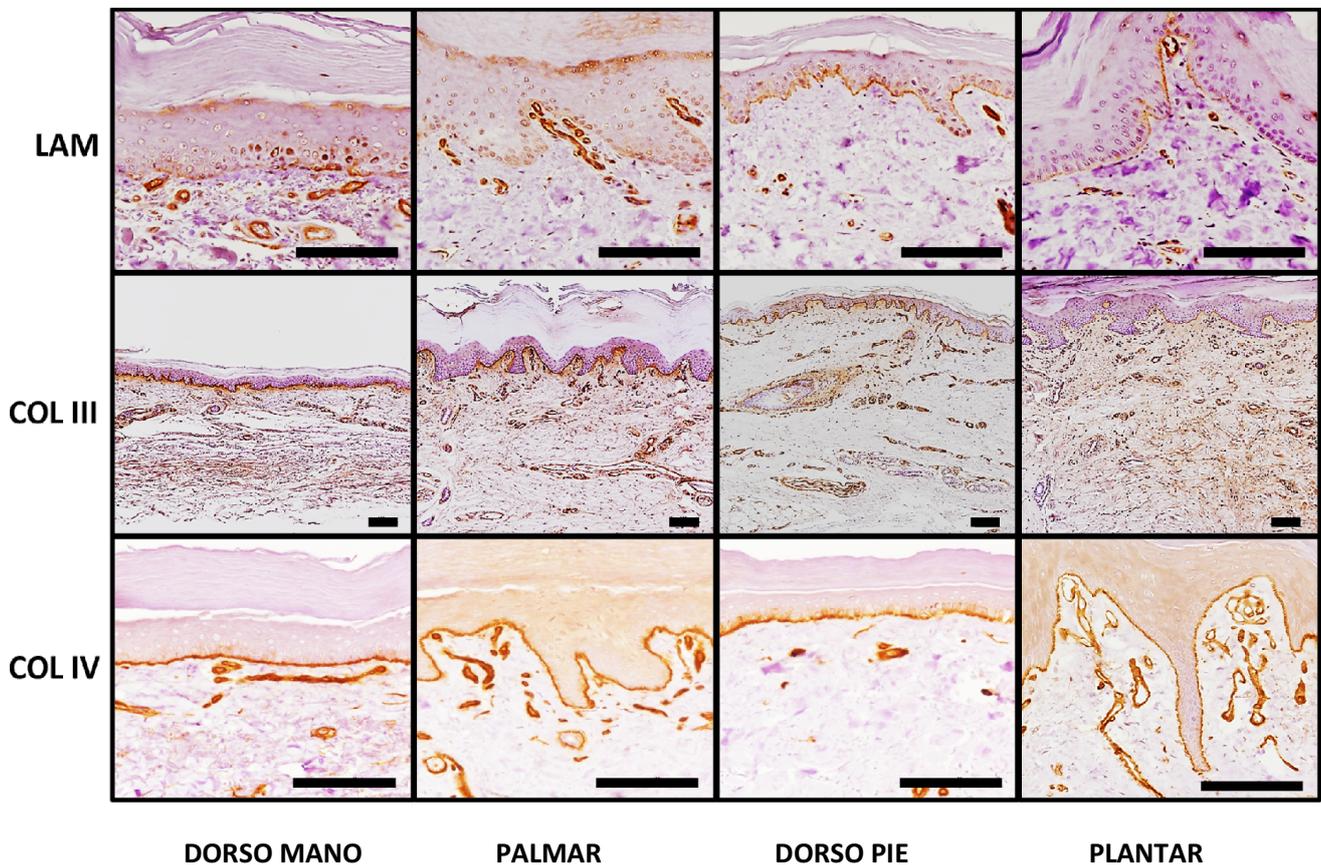


Figura 44. Análisis inmunohistoquímico de los componentes principales de la membrana basal en la unión dermoepidérmica de todos los tipos de piel estudiados. En la primera fila se marca la Laminina (LAM) a 400x donde se aprecia su localización principal en la membrana basal de la epidermis y vasos sanguíneos, siendo más intensa a nivel del pie, tanto en dorsal como en plantar. En la segunda fila se aprecia la marcación del Colágeno III (COL III) a 100X, donde se aprecia una marcación más difusa por la dermis y su señal se concentra a nivel de la unión dermoepidérmica sin diferencias entre las muestras. En la tercera fila, se aprecia la marcación del Colágeno IV (COL IV) a 400X, con una marcación muy intensa a nivel de la membrana basal de epidermis y de los vasos sanguíneos, sin diferencias entre los cuatro tipos de piel. La barra de magnificación mide 100 μ m.

El análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET) mostró una membrana basal bien estructurada en la unión dermoepidérmica de todos los tipos de piel, sin diferencias entre las muestras. En todos los casos, la membrana basal consistió en una lámina basal con dos componentes (lámina lúcida y lámina densa) y una lámina reticular (Figura 45).

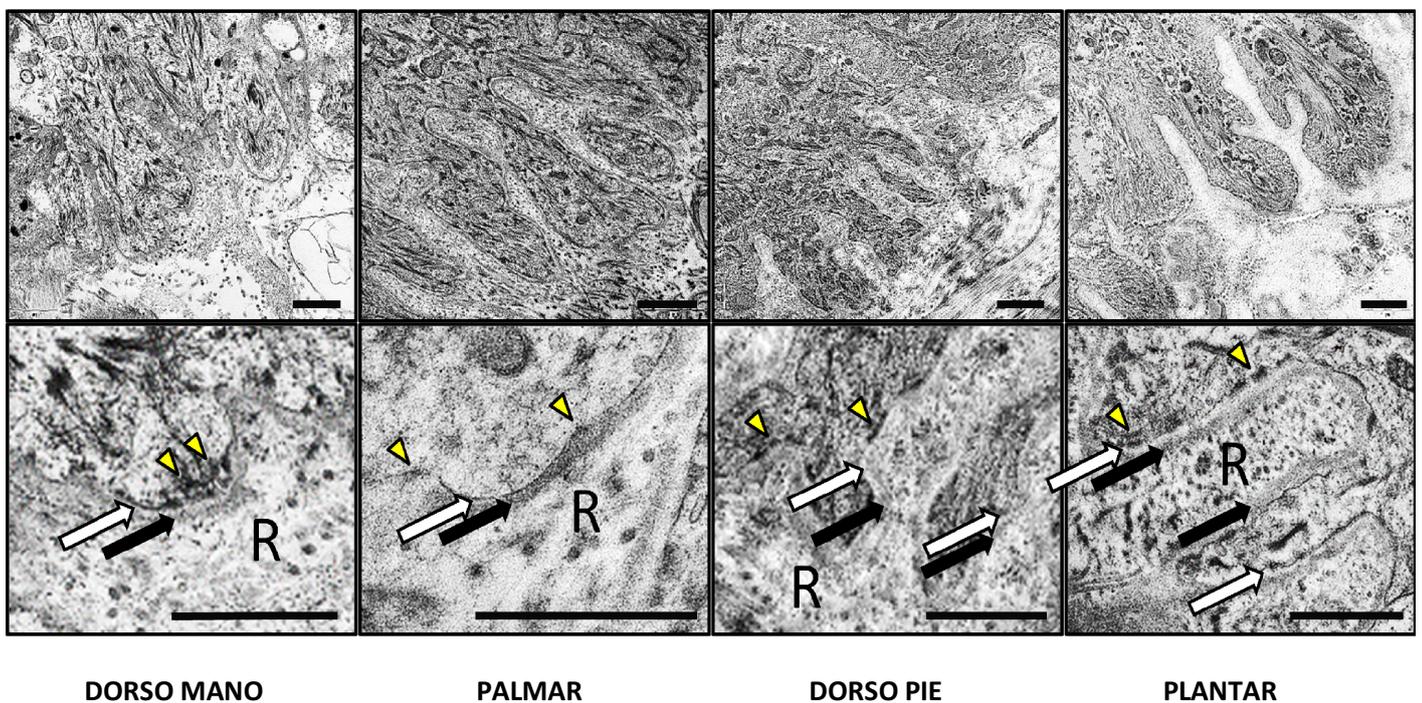


Figura 45. Análisis de la membrana basal de los cuatro tipos de piel estudiados en esta Tesis Doctoral mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Las imágenes corresponden a diferentes aumentos donde la unión dermoepidérmica donde se muestran los principales componentes de la membrana basal: La lámina basal compuesta por la lámina lúcida (flechas blancas) y la lámina densa (flecha negra), mientras que la lámina reticular (R) contiene fibras de anclaje. En la imagen se pueden observar los hemidesmosomas (flechas amarillas). La barra de magnificación mide 1 μ m.

5.3. Caracterización de la dermis de la piel palmoplantar humana.

5.3.1. Cuantificación histoquímica de los componentes de la dermis.

Los análisis histoquímicos cuantitativos realizados en la presente Tesis Doctoral permitieron cuantificar los principales componentes fibrilares y no fibrilares de la dermis de la piel humana (Tabla 4). En primer lugar, el método de FMP (Figura 46) mostró que aproximadamente entre un tercio y la mitad del área de la dermis estaba ocupada por colágeno, mostrando que a nivel plantar el porcentaje de área es significativamente mayor que a nivel palmar. Además, encontramos que la intensidad de tinción fue significativamente mayor en la piel del pie en comparación con la piel de la mano y en la piel palmoplantar en comparación con la piel fina ($p < 0.05$), siendo la piel plantar la que muestra una intensidad más alta de los cuatro tipos de piel (Figura 46 y Tabla 4).

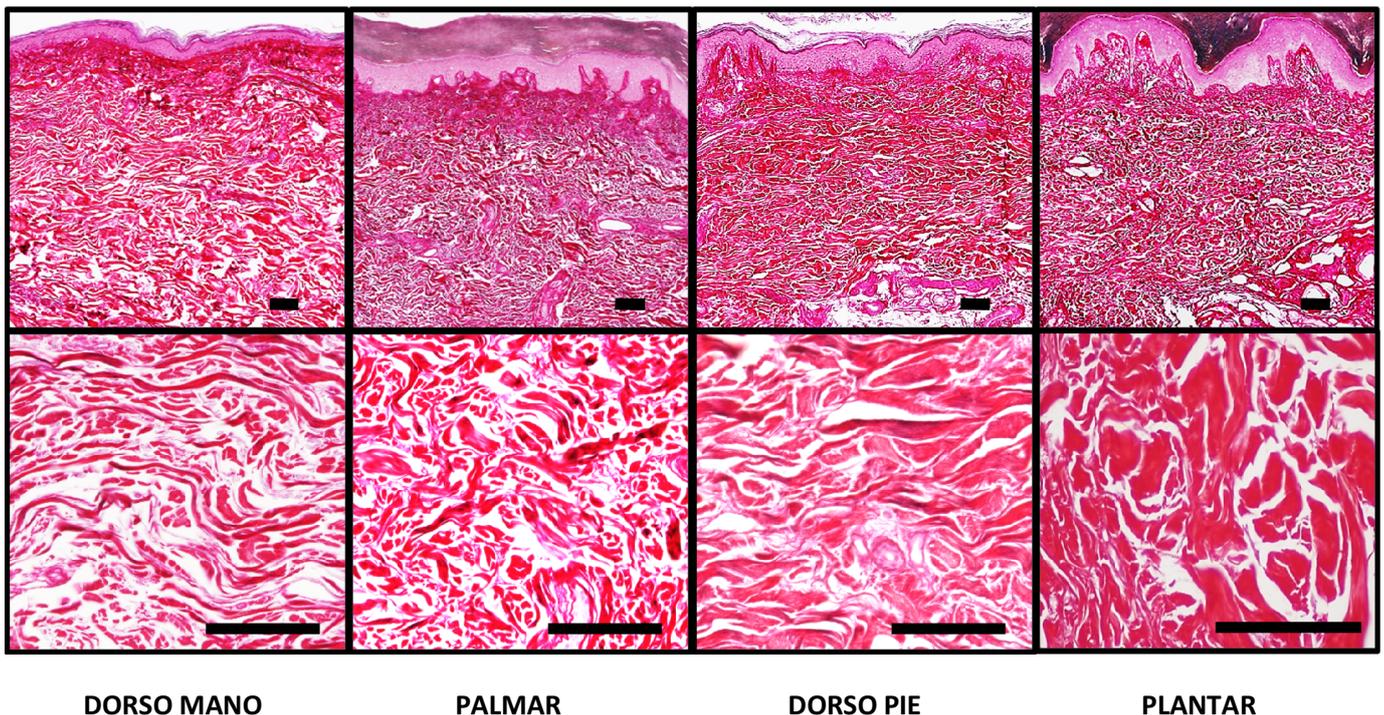


Figura 46. Análisis histoquímico del colágeno en la dermis de los cuatro tipos de piel estudiados en la presente Tesis Doctoral determinados con Fontana-Mason-Picosirius (FMP). Fotos realizadas en la primera fila a 100X y en la segunda fila a 400X. Todas las muestras muestran una reacción histoquímica (en rojo) positiva intensa. La segunda fila es una ampliación de la primera, donde se aprecia con mayor detalle las fibras de colágeno. La barra de magnificación mide 100 μ m.

En segundo lugar, la presencia de fibras elásticas en la dermis mediante el uso de técnica histoquímica de la Orceína, mostró que la piel del dorso de la mano tenía un mayor porcentaje de área ocupada por fibras elásticas que la piel palmar y la piel del dorso del pie, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la intensidad de las fibras elásticas (Figura 47, Tabla 4).

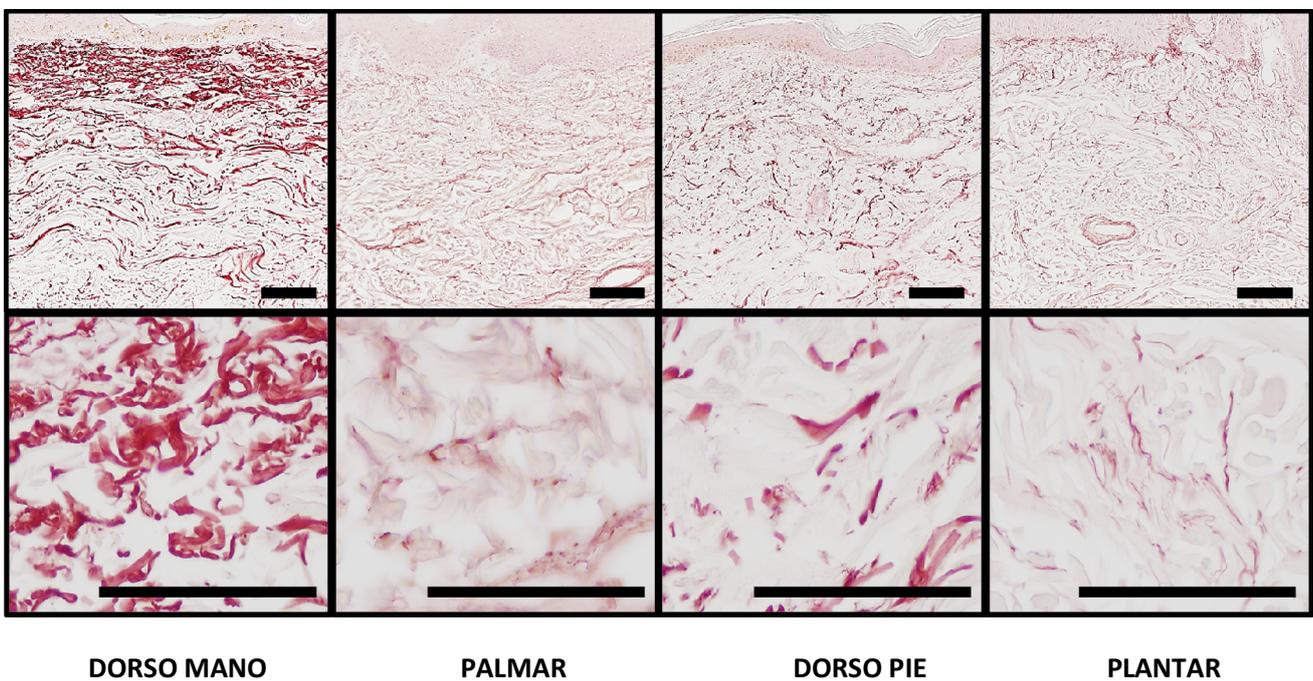


Figura 47. Análisis histoquímico de fibras elásticas con la técnica de la Orceína en los cuatro tipos de piel estudiados en la presente Tesis Doctoral. Fotos realizadas en la primera fila a 100X y en la segunda fila a 400X. Las fibras elásticas muestran color ocre. La segunda fila es una ampliación de la primera, donde se aprecia con mayor detalle las fibras elásticas. La barra de magnificación mide 100µm.

En tercer lugar, los resultados obtenidos usando la técnica de la reticulina de Gomori, mostraron que la dermis humana tenía una cantidad muy baja de fibras reticulares, sin diferencias estadísticamente significativas entre las muestras. Sin embargo, el contenido de fibras reticulares fue más abundante en las zonas subyacentes a la membrana basal de la piel palmoplantar y en las paredes de los vasos sanguíneos de todas las muestras de piel estudiadas (Figura 48, Tabla 4).

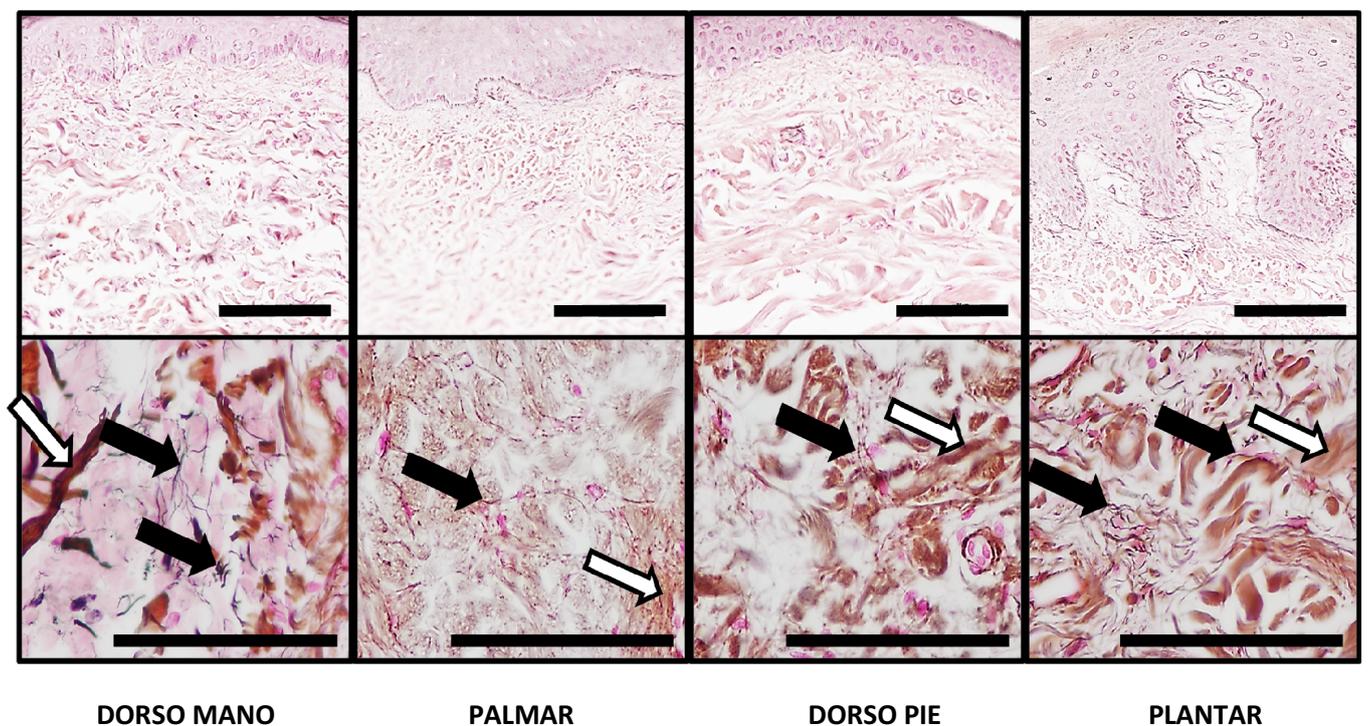


Figura 48. Análisis histoquímico de las fibras reticulares en la dermis de los cuatro tipos de piel estudiadas en la presente Tesis Doctoral mediante la técnica Reticulina de Gómori. Fotos realizadas en la primera fila a 400X y en la segunda fila es una magnificación a 800X. En la primera fila se aprecia mayor presencia de estas fibras a nivel de las papilas dérmicas. La segunda fila es una ampliación de la primera fila, donde se aprecian con más detalle las fibras reticulares como filamentos delgados y negros (flechas negras). Con esta técnica se tiñen las fibras de colágeno dérmico en marrón (flechas blancas). La barra de magnificación mide 100µm.

Finalmente, el análisis histoquímico cuantitativo de los proteoglicanos de la dermis no reveló diferencias estadísticas entre los grupos. El porcentaje del área ocupada por proteoglicanos en la dermis varió entre 26.7 ± 21.4 y 20.2 ± 13.9 (Figura 49, Tabla 4).

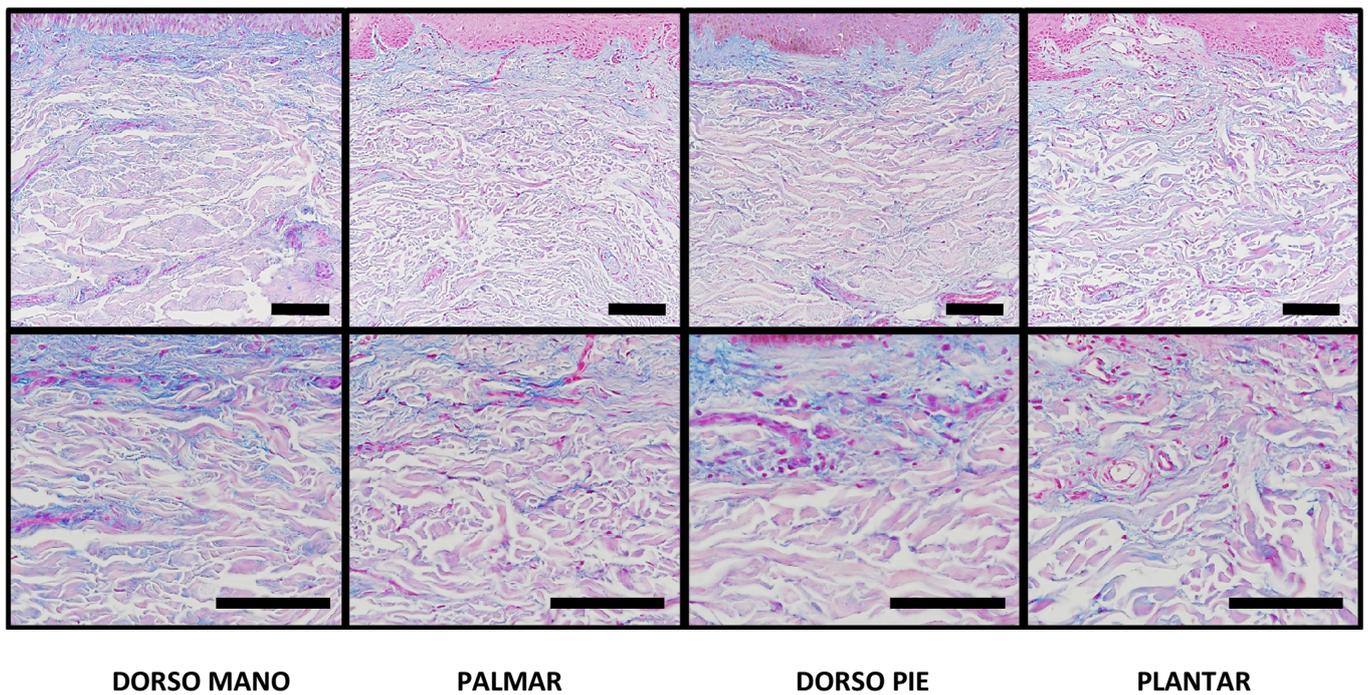


Figura 49. Análisis histoquímico de los proteoglicanos en la dermis de los cuatro tipos de piel estudiadas en la presente Tesis Doctoral mediante la técnica Azul Alciano. Fotos realizadas en la primera fila a 200X y en la segunda fila es una magnificación a 400X. La segunda fila es una ampliación de la primera, donde se aprecian con más detalle la dermis. Con esta técnica se tiñen los proteoglicanos de la dermis de color azul. La barra de magnificación mide 100 μ m.

| | PA FIBRAS DE COLÁGENO | INTENSIDAD DE COLÁGENO | PA FIBRAS ELÁSTICAS | INTENSIDAD DE FIBRAS ELÁSTICAS | PA FIBRAS DE RETICULINA | INTENSIDAD DE RETICULINA | PA DE PROTEOGLICANOS | INTENSIDAD DE PROTEOGLICANOS |
|---|-----------------------|------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|------------------------------|
| Piel Dorso Mano (PDM) | 37.0±21.0 | 125.0±4.7 | 14.9±14.0 | 199.5±2.0 | 1.9±0.5 | 18.0±12.1 | 26.3±26.8 | 187.2±5.3 |
| Piel Palma Mano (PPM) | 35.7±9.1 | 130.7±4.1 | 4.9±3.2 | 200.9±2.0 | 1.4±0.6 | 29.8±24.1 | 23.9±16.6 | 185.1±8.0 |
| Piel Dorso Pie (PDP) | 36.4±16.8 | 135.8±2.5 | 4.0±2.2 | 197.8±4.6 | 1.3±0.6 | 27.7±12.9 | 26.7±21.4 | 185.5±6.2 |
| Piel Planta Pie (PPP) | 48.5±11.6 | 140.3±5.2 | 4.9±3.6 | 199.8±4.0 | 2.0±0.8 | 30.2±34.7 | 20.2±13.9 | 188.3±5.5 |
| Piel de la Mano | 36.3±15.6 | 127.9±5.2 | 9.9±11.1 | 200.2±2.0 | 1.7±0.6 | 23.9±19.5 | 25.1±20.4 | 186.1±6.6 |
| Piel del Pie | 43.0±15.1 | 138.3±4.7 | 4.5±3.0 | 198.9±4.3 | 1.6±0.8 | 29.0±25.5 | 23.2±17.5 | 187.0±5.9 |
| Piel Fina | 36.7±18.2 | 131.0±6.6 | 8.9±10.7 | 198.6±3.7 | 1.6±0.6 | 22.9±13.1 | 26.6±23.2 | 186.3±5.7 |
| Piel Palmoplantar | 43.4±12.2 | 136.5±6.7 | 4.9±3.4 | 200.3±3.3 | 1.7±0.8 | 30.0±29.1 | 22,05±12.1 | 187.0±6.6 |
| Piel Mano vs Piel Pie valor p | 0.2368 | 0.0001 | 0.0759 | 0.5152 | 0.3569 | 0.4901 | 0.1557 | 0.5944 |
| Piel Fina vs Piel Palmoplantar valor p | 0.3802 | 0.0339 | 0.2664 | 0.1320 | 0.9568 | 0.7556 | 0.5011 | 0.5011 |
| PDM vs PPM valor p | 1.000 | 0.0346 | 0.0346 | 0.2049 | 0.3310 | 0.4051 | 1.000 | 0.3980 |
| PDP vs PPP valor p | 0.1135 | 0.0377 | 0.7920 | 0.3066 | 0.4850 | 0.6497 | 0.5529 | 0.0750 |
| PDM vs PDP valor p | 0.7217 | 0.0004 | 0.0206 | 0.7217 | 0.0991 | 0.0819 | 0.7217 | 0.7217 |
| PPM vs PPP valor p | 0.0204 | 0.0004 | 1.000 | 0.6429 | 0.2233 | 0.7051 | 0.1720 | 0.4397 |

Tabla 4. Cuantificación histoquímica en los cuatro tipos de piel de proteoglicanos y fibras de colágeno, elastina y reticulina. Para cada elemento se ha medido el porcentaje de área (PA) que ocupa cada elemento y la intensidad de la señal de marcación (INTENSIDAD), mostrando la media y su desviación estándar. Las últimas seis filas indican el valor de significación estadística del valor "p" al comparar dos tipos diferentes de piel. Piel Dorso Mano (PDM), Piel Palma Mano (PPM), Piel Dorso Pie (PDP), Piel Planta Pie (PPP).

5.3.2. Caracterización inmunohistoquímica de los componentes de la dermis.

El análisis inmunohistoquímico de colágeno tipo I (Figura 46 y Tabla 3) mostró que la dermis de los cuatro tipos de piel analizados, fueron altamente positivos para esta proteína, aunque la piel palmoplantar mostró la señal positiva más alta de todas las muestras. Por otra parte, el análisis de proteoglicanos específicos determinados por inmunohistoquímica, sugiere que la proteína decorina, tiene una distribución similar en la dermis de los cuatro tipos de piel, pero el biglicano fue más abundante en la piel del pie que en la piel de la mano. El proteoglicano versicano se expresó en niveles similares para todos los tipos de piel analizados, aunque mostró una expresión ligeramente menor en las muestras de la piel de la palma de la mano (Figura 50 y Tabla 3).

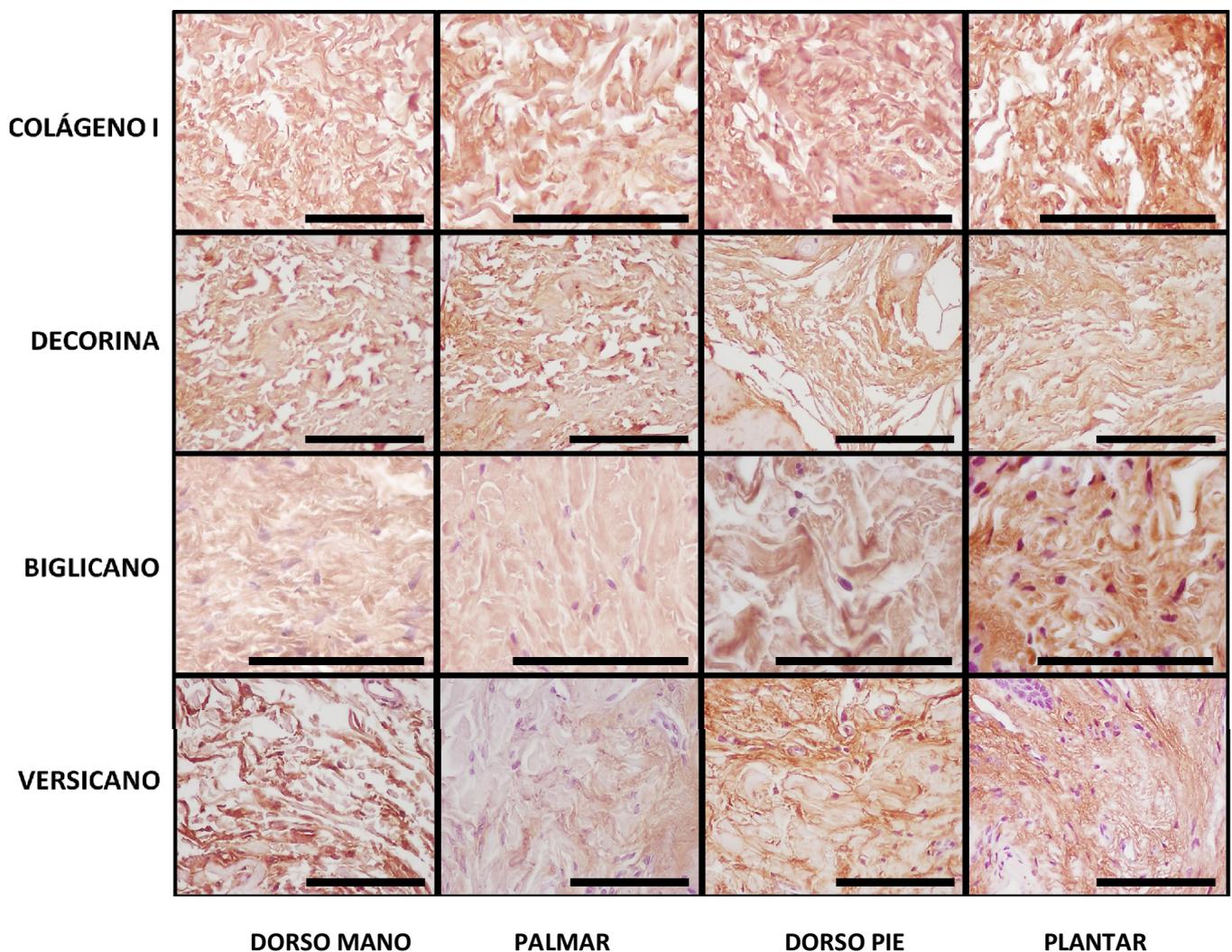


Figura 50. Análisis inmunohistoquímico de colágeno I, decorina, biglicano y versicano de la dermis de los cuatro tipos de piel estudiados en la presente Tesis Doctoral. La señal de marcación específica positiva es en marrón. Para el colágeno I y decorina, todas las muestras expresan una marcación media, menos para la piel plantar donde el colágeno I muestra una marcación fuerte. El biglicano muestran una señal leve en la mano, mientras que en el dorso del pie es media y para la plantar la marcación es fuerte. La marcación para el versicano es media para todas las muestras, con excepción de la piel palmar donde es leve. La barra de magnificación mide 100µm.

5.3.3. Análisis de vasos sanguíneos y linfáticos de los componentes de la dermis.

Para identificar los vasos sanguíneos en la dermis de cada muestra de piel, se utilizaron métodos inmunohistoquímicos para la detección de esmotelina, SMA-ACT y CD-31. Los resultados mostraron que en la dermis tiene abundantes vasos sanguíneos sin diferencias entre los tipos de piel y que estas estructuras tenían mayor diámetro en la dermis reticular que en la dermis papilar. Curiosamente, los vasos delgados mostraron una señal positiva para SMA-ACT y CD-31, mientras que los vasos gruesos asignados en el plexo de la dermis profunda fueron positivos para la esmotelina (Figura 51). El análisis de los vasos linfáticos utilizando inmunohistoquímica D2-40 confirmó la presencia de estos vasos en la dermis de todos los tipos de piel, sin diferencias entre las muestras. Sin embargo, los vasos tendieron a mostrar la luz interna abierta en la piel delgada (DHS y DFS), mientras que en la piel palmoplantar (PHS y PFS) se mostraban colapsados (Figura 51).

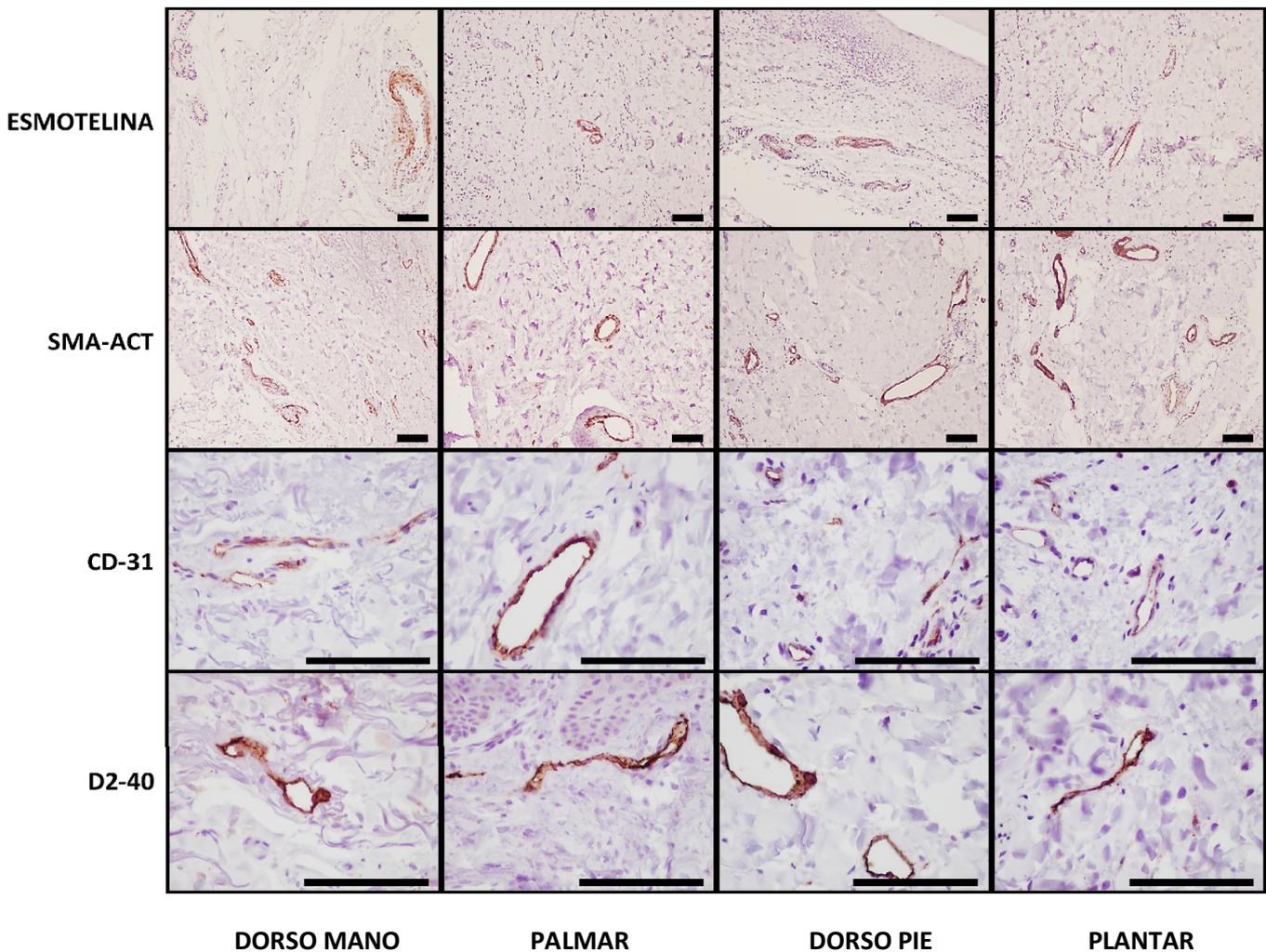
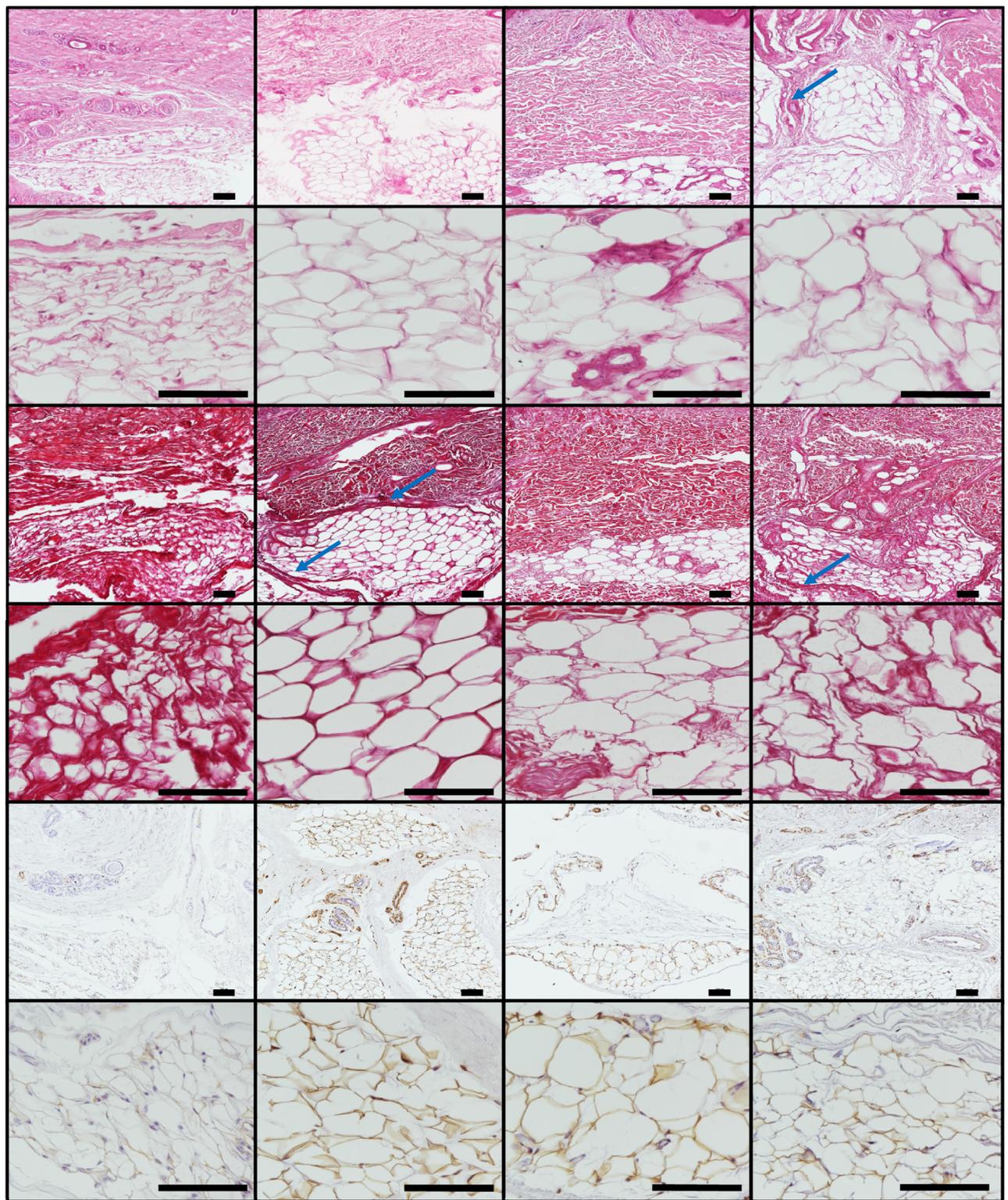


Figura 51. Análisis inmunohistoquímico de los vasos sanguíneos y linfáticos de la dermis de los cuatro tipos de piel estudiada en la presente Tesis Doctoral. Fotos realizadas en la primera y segunda fila a 100X y en la tercera y cuarta fila están a 400X. Las tres primeras filas están marcadas con anticuerpos específicos de vasos sanguíneos como son la esmotelina, SMA-ACT y CD-31. La última fila marca los vasos linfáticos por medio del anticuerpo específico para D2-40. La barra de magnificación mide 100µm.

5.4. Caracterización de la hipodermis de la piel palmoplantar humana.

La caracterización de la hipodermis de la piel palmoplantar realizada en la presente Tesis Doctoral mediante la técnica de tinción rutinaria de H&E reveló la presencia de glándulas sudoríparas ecrinas rodeadas de adipocitos con un tamaño celular similar en todos los tipos de piel analizados, excepto para la piel del dorso de la mano, donde se apreció un menor tamaño celular. Por otra parte, los resultados obtenidos mediante la tinción de Fontana Masson Picrosirius (FMP) permitieron valorar el componente fibrilar de colágeno en la hipodermis. En este sentido, se observó la presencia de tabiques grueso de tejido conjuntivo rodeando los lóbulos de adipocitos. En concreto, en las muestras de piel palmoplantar dichos tabiques mostraron mayor grosor con respecto a las muestras de piel fina analizadas (figura 52). El análisis inmunohistoquímico para la detección de vimentina en la hipodermis de piel palmoplantar no mostró diferencias significativas en los cuatro grupos de estudio (PDM, PPM, PDD, PPP tabla 3).



DORSO MANO

PALMAR

DORSO PIE

PLANTAR

Figura 52. Análisis histológico de la hipodermis en las diferentes muestras de piel. Tinción hematoxilina y eosina (H&E) en la primera y segunda fila y detección de fibras de colágeno con la tinción de Fontana Mason Picosirius (FMP) en la tercera y cuarta. Detección de la presencia de vimentina células de origen mesenquimal en la quinta y sexta fila. La flechas azules muestran los tabiques gruesos de colágeno. La barra de magnificación mide 100µm.

6. DISCUSIÓN.

Un conocimiento adecuado de la estructura histológica de la piel palmoplantar es un primer paso para una mejor comprensión de las patologías propias de esta área anatómica. En la presente Tesis Doctoral, se ha llevado a cabo uno de los primeros estudios que comparan la piel fina y palmoplantar de un mismo individuo (con varios casos) usando una variedad de métodos histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos, demostrando así, varias diferencias entre la piel fina y palmoplantar, tanto en la epidermis, dermis, como hipodermis. El hecho de que las muestras correspondieran a los mismos donantes contribuyó a controlar variables de confusión como la edad, el sexo o la raza que pueden influir en los resultados.

Primero, el análisis confirmó que la piel palmoplantar tiene una epidermis significativamente más gruesa que la piel delgada. Estos resultados concuerdan con resultados anteriores que sugieren que el espesor de la piel palmoplantar humana de manos y pies es de unas 400-600 μm , mientras que en la piel fina está entre 75-150 μm (Murphree 2017). Curiosamente, el análisis detallado por estratos, mostró que la mayoría de las capas del epitelio eran más gruesas en la piel palmoplantar que en la delgada, con la única excepción del estrato basal, que consistía en una sola capa celular con un tamaño y número de células similar en todos los tipos de piel. Sin embargo, los resultados revelaron que las diferencias en el grosor de los estratos se deben a un mayor tamaño y número de los queratinocitos en la piel palmoplantar, no solo al mayor número de células. Este fenómeno no se ha descrito anteriormente, ya que algunos autores afirman que el único parámetro que afecta al grosor de la epidermis es el número de capas de células epiteliales (Geneser 2006). Estos resultados hacen suponer que la mayor presión soportada por los queratinocitos de piel palmoplantar podría inducir un proceso de hipertrofia celular que podría favorecer la resistencia de estas células. Este hallazgo, concuerda con los estudios que sugieren que el epitelio de la piel fina transferido a la dermis de la piel palmoplantar podría experimentar una serie de cambios estructurales, adoptando características similares al epitelio de la piel palmoplantar (Yamaguchi et al. 2001). Por otro lado, el análisis inmunohistoquímico de células no queratinocíticas de la epidermis, mostró que la piel palmoplantar posee menos cantidad de melanocitos, como se sugirió anteriormente (Uemura et al. 2016), un mayor número de células de Merkel como lo demuestra (Lacour et al. 1991) y menos cantidad de células de Langerhans. Este último hallazgo no se ha encontrado descrito previamente. Desde un punto de vista biológico, una posible explicación podría ser que la piel palmoplantar está expuesta a bajas dosis de radiación ultravioleta, lo que haría innecesaria la presencia de grandes poblaciones melanocíticas. De hecho, se ha demostrado que los melanocitos tienden a bloquear su migración hacia la piel palmoplantar durante el desarrollo embrionario (Yamaguchi et al. 2004). Diferentes autores sugieren que la influencia de los fibroblastos dérmicos subyacentes es un factor crucial que determina el número y la actividad funcional de

los melanocitos en la epidermis de la piel palmoplantar por interacción dermoepidérmica (Yamaguchi et al. 1999; Biedermann et al. 2015; Hasegawa et al. 2008; Yamaguchi et al. 2004). Además, la barrera epitelial más gruesa encontrada en la piel palmoplantar no requeriría la presencia de muchas células inmunitarias como las células de Langerhans, ya que los antígenos externos no llegarían fácilmente a los estratos epidérmicos basales y espinosos, donde tienden a localizarse estas células. En cuanto a las células de Merkel, su función como mecanorreceptores de la piel, hace que estas células sean más necesarias en la piel palmoplantar, que está sujeta a fuerzas y estímulos externos continuos en comparación con la piel delgada (Munde et al. 2013). Los estudios futuros deberían confirmar estas hipótesis.

Como se ha descrito en apartados anteriores de la presente Tesis Doctoral, las citoqueratinas son componentes muy importantes del citoesqueleto de las células epiteliales y en este sentido, encontramos que todos los tipos de piel analizados en esta Tesis Doctoral tenían una expresión similar de CK5/6 en el estrato basal, apreciándose cierta expresión en las capas suprabasales de la piel palmoplantar. Esto podría implicar que el número de células con potencial de proliferación podría ser mayor en la piel palmoplantar, ya que la capacidad de proliferación no solo se daría en el estrato basal, sino que además se daría en las células suprabasales de la piel palmoplantar que tienen capacidad de división (Rook and Fonseca Capdevila 1988). Por otra parte, todas las muestras de estudio fueron negativas para la expresión de CK7, un marcador típico de epitelios simples y que no debería estar presente en la epidermis normal de la piel (Lee and Ro 2015). Por el contrario, los resultados revelaron que el patrón de expresión de CK9 era muy diferente entre la piel fina y la palmoplantar, sin diferencias entre la piel de las manos y la piel de los pies. En este sentido, se ha descrito que la CK9 es específica de la epidermis palmoplantar gruesa, expresándose exclusivamente en capas suprabasales de ésta (Uemura et al. 2016; Yamaguchi et al. 1999), aunque por otro lado, se han identificado pequeños grupos de células epidérmicas que expresan CK9 en otras ubicaciones del cuerpo humano (Knapp et al. 1986) como en el acrosiringio de cuello y abdomen, epidermis interfolicular de la nariz o prepucio (Moll et al. 1987). En contraste con estos estudios previos, en la presente Tesis Doctoral se encontró que la CK9 se expresaba tanto en la piel palmoplantar como en la piel fina, aunque con un patrón diferente en cada tipo de piel. La diferencia del perfil de expresión de la CK9 respecto a previos estudios podría estar relacionada con el protocolo de fijación que se ha utilizado en la presente Tesis Doctoral. El protocolo de fijación utilizado se ha basado en el uso de methacarn, un fijador de uso poco convencional para la caracterización de la piel humana. En este contexto, la revisión de la literatura ha revelado el uso exclusivo del formol como principal fijador haciendo de este estudio, un estudio pionero en el uso de methacarn como agente de fijación para la caracterización de piel fina y palmoplantar. El methacarn es un fijador de solvente orgánico coagulante (Mitchell et al. 1985) que permite la preservación de alta calidad de la morfología y estructura de los tejidos

incluidos en parafina (Akane et al. 2013). Se demostró que el methacarn proporciona resultados inmunohistoquímicos superiores a los fijadores de entrecruzamiento basados en aldehído por mantener una mejor antigenicidad (Akane et al. 2013; Mitchell et al. 1985; Giachini et al. 2008). Por esta razón, hipotetizamos que la CK9, un polipéptido de citoqueratina ácido (tipo I) de Mr 64,000, con ciertas diferencias bioquímicas en comparación con otras citoqueratinas humanas (Knapp et al. 1986), podría ser muy lábil a la fijación clásica de formaldehído en tejidos que muestran baja expresión de CK9 como la epidermis de la piel fina humana, pero detectables por medio de la fijación con methacarn. El hecho de que los patrones de expresión fueran completamente diferentes en piel fina y palmoplantar, sugiere que la CK9 podría utilizarse para diferenciar la epidermis palmoplantar de otros tipos de piel, como se sugirió anteriormente (Knapp et al. 1986; Uemura et al. 2016; Yamaguchi et al. 1999). Respecto a la presencia de CK10, un marcador de queratinización terminal, se expresó en capas suprabasales de todos los tipos de piel, sin encontrar diferencias de queratinización entre la piel fina y palmoplantar.

El análisis inmunohistoquímico de las proteínas de unión intercelular, reveló que todas las muestras analizadas en la presente Tesis Doctoral tenían niveles de expresión similares para claudina-1 y desmoplaquina 1/2, aunque este último tendía a localizarse en las células más apicales del estrato espinoso. Estos resultados muestran que tanto la piel fina y como la palmoplantar se comportan como una barrera eficiente, sin diferencias entre los diversos tipos de piel y que los desmosomas maduros asociados a las proteínas desmoplaquinas 1/2 se localizan en las células espinosas más diferenciadas (Lechler and Fuchs 2007). Así mismo, se encontró un fenómeno similar para los dos marcadores de diferenciación terminal de epitelios estratificados queratinizados como la filagrina y la involucrina. Ambas proteínas de diferenciación terminal se expresaron con mayor intensidad en las capas epiteliales más apicales, conformando así, el estado de diferenciación terminal propio de este epitelio. El hecho de que la piel palmoplantar tenga un mayor número de capas celulares y un área celular mayor puede estar relacionado con que se aprecie una señal más difusa en la epidermis de la piel palmoplantar y que la señal sea ligeramente más intensa en la epidermis de la piel fina.

En segundo lugar, se analizó la membrana basal de las diferentes muestras de piel. La zona de membrana basal cutánea es una estructura funcional formada por varias capas y proteínas altamente especializada, que proporciona a la piel adhesión estructural y resistencia a las fuerzas de cizallamiento (Bruckner-Tuderman and Has 2014). En general, la ultraestructura (lámina basal y lámina reticular), la distribución de proteínas (laminina y colágeno tipo IV) de la membrana basal y la presencia de hemidesmosomas fue muy similar en todas las muestras analizadas en el presente trabajo, lo que sugiere que esta estructura es necesaria para la piel para ejercer sus funciones, independientemente del tipo de piel. Estos hallazgos coinciden con previos estudios de

Tidman y Eady que afirman que no existen diferencias en el número de hemidesmosomas con respecto a los diferentes tipos de piel (Tidman and Eady 1984). Sin embargo, el presente análisis sugiere que la laminina fue más abundante en la piel del pie en comparación con la piel de la mano. Aunque estos resultados deberían ser confirmados por futuros estudios, podemos suponer que las intensas fuerzas de tensión a las que está sometida la piel del pie podrían inducir la síntesis de laminina sin alterar el grosor y la ultraestructura de la lámina basal en estas áreas.

En tercer lugar, el estudio de la capa dérmica de la piel fina y palmoplantar humana, reveló algunas diferencias entre los cuatro tipos de piel analizados. Uno de los componentes dérmicos más importantes que desempeña un papel fundamental en la fisiología de la piel y de sus propiedades biomecánicas, es el componente fibrilar, que consiste en una red de diferentes tipos de colágeno, fibras elásticas y reticulares (Hussain et al. 2013; Kanitakis 2002). El colágeno es el principal componente estructural de la dermis de la piel y lo encontramos abundantemente en todos los tipos de piel analizados en la presente Tesis Doctoral, presentando una gran cantidad de colágeno tipo I maduro según las determinaciones histoquímicas e inmunohistoquímicas. Sin embargo, la cuantificación nos permitió encontrar un mayor contenido de colágeno en la dermis palmoplantar que en la dermis de la piel fina y en la piel del pie con respecto a la piel de la mano. Esto podría estar relacionado con la función específica llevada a cabo por cada tipo de piel, ya que las fibras de colágeno pueden transmitir y disipar energía durante la deformación mecánica (Shah et al. 2017), proporcionando resistencia mecánica a los tejidos ricos en colágeno. Por lo tanto, es razonable que la piel palmoplantar tenga un mayor contenido de colágeno que la piel fina y la piel del pie tenga un mayor contenido de colágeno con respecto a la piel de la mano. Otro componente fibrilar a destacar en la dermis humana son las fibras elásticas, que juega un papel crucial en la elasticidad de la piel. Estos componentes se caracterizan por la extensibilidad elástica, que proporciona a la piel la capacidad para volver a su forma original cuando cede la fuerza que la estira (Hussain et al. 2013). En la presente Tesis Doctoral, se observó que el tipo de piel con mayor contenido de elastina es la piel del dorso de la mano (PDM), la cual podría tener mayores niveles de deformación biomecánica que los otros tipos de piel debido a su ubicación. Además, se observó que la piel humana tiene cantidades muy bajas de fibras reticulares. Sin embargo, se confirmó la presencia de fibras reticulares localizadas principalmente a nivel de los vasos sanguíneos y de la membrana basal. Las fibras reticulares están principalmente compuestas por colágeno tipo III asociado a otros tipos de colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos, están principalmente localizadas en la membrana basal, en la superficie de los adipocitos, miocitos, células de Schawann, sinusoides hepáticos y en el retículo fibroso del tejido linfático (Ushiki 2002). Previos estudios han demostrado la baja cantidad de fibras reticulares en la matriz extracelular de la piel humana normal y se ha afirmado que su abundancia podría estar relacionada con diversas condiciones patológicas (Antunes et al. 1999). Es

importante poner de relieve que en el presente estudio se encontró mayor abundancia de fibras reticulares en la dermis papilar; estas fibras podrían corresponder a fibras reticulares de la lámina fibroreticular de la membrana basal.

Por otro lado, los proteoglicanos son componentes no fibrilares de la dermis humana que interactúan con otras proteínas de la matriz extracelular, como la red de colágeno y dan como resultado la formación de estructuras supramoleculares capaces de aumentar la rigidez del tejido (Lee et al. 2016), además de regular funciones celulares tan importantes como son la proliferación, migración, síntesis o degradación de proteínas (Maquart and Monboisse 2014). En general, encontramos que todos los tipos de piel tenían cantidades similares de proteoglicanos según lo determinado mediante técnicas histoquímicas, pero el análisis de moléculas específicas reveló algunas diferencias interesantes para el biglicano, que se expresó más abundantemente en la piel del pie. El biglicano es un pequeño proteoglicano de dermatán sulfato rico en leucina que desempeña un papel importante en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de los tejidos conectivos al regular el colágeno y controlar la resistencia a la tracción (Mizumoto et al. 2017; Godoy-Guzman et al. 2018). Por lo tanto, la abundancia de este componente en la matriz extracelular de la piel del pie podría contribuir a aumentar sus propiedades biomecánicas, lo que permite que este tipo de piel soporte mayores fuerzas de estrés que otros tipos de piel (Swensson et al. 1998).

En cuarto lugar, El estudio de la hipodermis del dorso de la mano (PDM) reveló un tamaño celular de los adipocitos inferior al observado en el resto de las muestras estudiadas (PPM, PDD y PPP). Esto podría relacionarse con la menor fricción y roce a la que se ve sometida el área dorsal de la mano, junto con la mayor presencia de fibras elásticas que facilita la movilidad. Por otra parte, el estudio histoquímico reveló la existencia de tabiques o septos de colágeno de mayor grosor en la dermis palmoplantar con respecto a la dermis de la piel fina. Este hecho podría permitir el empaquetamiento de los adipocitos en un área de mayor definición para soportar las mayores presiones a las que se ve sometida la piel palmoplantar (Kelikian et al. 2011; Oh et al. 2011).

En resumen, los resultados de la presente Tesis Doctoral sugieren que la piel fina y palmoplantar que se encuentra en las manos y pies humanos comparte muchas similitudes estructurales y moleculares. Sin embargo, en el presente trabajo se demuestra que existen varias diferencias en los niveles epitelial, de membrana basal, dérmica e hipodérmica, dichas desigualdades deben estar relacionadas con las diferentes fuerzas biomecánicas asociadas a cada tipo de piel. Estos hallazgos podrían contribuir a un mejor conocimiento de la histología de la piel humana y podrían ser útiles para el mejor entendimiento de la patología palmoplantar y para la futura

generación de sustitutos bioartificiales de cada tipo de piel humana mediante técnicas de ingeniería tisular.

7. CONCLUSIONES.

1. La caracterización histológica de la epidermis palmoplantar humana pone de relieve que dicha piel es significativamente más gruesa que la piel dorsal de mano y pie. El grosor está relacionado con la hiperplasia e hipertrofia queratinocítica y el incremento de las células de Merkel, especialmente en la planta del pie, en comparación con el patrón epidérmico de la piel fina caracterizado por un incremento de melanocitos y células de Langerhans así como una menor área celular queratinocítica. Respecto a la presencia de citoqueratinas, la CK5/6, presentó mayor expresión suprabasal en piel palmoplantar, y CK9, fue intensamente positiva en estratos basales de piel fina e intensamente positiva en estratos suprabasales de piel palmoplantar. No se encontraron diferencias significativas para CK7 y CK10 y filagrina ni para las proteínas de cohesión claudina-1 y desmoplakina 1/2 en ambos tipos de piel, observándose una expresión algo más intensa en piel fina que en piel palmoplantar para involucrina. Las diferencias descritas demuestran la existencia de dos patrones histológicos e histoquímicos distintos para la piel fina y para la piel palmoplantar directamente relacionados con la actividad funcional que desarrollan ambos tipos de piel en las localizaciones previamente indicadas.

2. La utilización de técnicas de microscopía óptica y electrónica de transmisión, así como de técnicas inmunohistoquímicas permitió la caracterización histológica de la membrana basal de la piel palmoplantar humana. Los resultados demuestran una mayor expresión de laminina en piel fina y gruesa del pie con respecto a la mano. No se encontraron diferencias a nivel ultraestructural, lo cual sugiere que la doble estructura de la membrana basal (lámina basal y lámina reticular) es fundamental para un adecuado anclaje del epitelio al estroma subyacente con independencia del tipo de piel y su localización.

3. El estudio histológico de la dermis de la piel palmoplantar humana pone de relieve una mayor presencia de fibras de colágeno en la piel gruesa, especialmente en la planta del pie y de fibras elásticas en la piel fina, especialmente en el dorso de la mano. No existen diferencias para las fibras reticulares. Respecto a los componentes no fibrilares de la dermis, los resultados demuestran diferencias para los proteoglicanos biglicano (que fue más abundante en la planta del pie) y versicano (que fue menos abundante en la palma de la mano). El estudio pone asimismo de relieve, un patrón vascular –sanguíneo y linfático- muy desarrollado en ambos tipos de piel y localización.

4. El estudio histológico de la hipodermis de la piel palmoplantar humana pone de relieve la existencia de un menor tamaño celular en la piel del dorso de la mano y un mayor grosor de tabiques de colágeno en la piel palmoplantar, lo que revela diferencias en el papel funcional para cada tipo de piel y localización.

5. La identificación de diferencias histológicas entre los distintos tipos de piel analizados en esta Tesis Doctoral revela la necesidad de establecer criterios de

selección para la utilización clínica de injertos de piel humana. En general, la reparación de zonas de la piel no sometidas a importante estrés mecánico debería llevarse a cabo utilizando injertos de piel fina mientras que las zonas sometidas a mayor estrés mecánico deberían tratarse utilizando piel gruesa, con independencia de la capacidad de remodelación y adaptación que presenta la piel humana de cualquier localización. Así mismo, el tratamiento de patologías que requieran el implante de piel artificial humana generada mediante Ingeniería Tisular debería tener en cuenta los resultados identificados en la presente investigación y generar piel que cumpla los criterios específicos de cada zona receptora.

8. BIBLIOGRAFÍA.

- Akane H, Saito F, Yamanaka H, Shiraki A, Imatanaka N, Akahori Y, Morita R, Mitsumori K, Shibutani M (2013) Methacarn as a whole brain fixative for gene and protein expression analyses of specific brain regions in rats. *The Journal of toxicological sciences* 38 (3):431-443
- Antunes SL, Gallo ME, de Almeida SM, Mota E, Pelajo M, Lenzi HL (1999) Dermal extracellular matrix in cutaneous leprosy lesions. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association* 67 (1):24-35
- Atherton DD, Facer P, Roberts KM, Misra VP, Chizh BA, Bountra C, Anand P (2007) Use of the novel Contact Heat Evoked Potential Stimulator (CHEPS) for the assessment of small fibre neuropathy: correlations with skin flare responses and intra-epidermal nerve fibre counts. *BMC neurology* 7:21. doi:10.1186/1471-2377-7-21
- Biedermann T, Bottcher-Haberzeth S, Klar AS, Widmer DS, Pontiggia L, Weber AD, Weber DM, Schiestl C, Meuli M, Reichmann E (2015) The influence of stromal cells on the pigmentation of tissue-engineered dermo-epidermal skin grafts. *Tissue engineering Part A* 21 (5-6):960-969. doi:10.1089/ten.TEA.2014.0327
- Biedermann T, Pontiggia L, Bottcher-Haberzeth S, Tharakan S, Braziulis E, Schiestl C, Meuli M, Reichmann E (2010) Human eccrine sweat gland cells can reconstitute a stratified epidermis. *The Journal of investigative dermatology* 130 (8):1996-2009. doi:10.1038/jid.2010.83
- Brousseau-Foley M, Cantin V (2015) Use of hyaluronic acid gel filler versus sterile water in the treatment of intractable plantar keratomas: a pilot study. *Journal of the American Podiatric Medical Association* 105 (1):22-26. doi:10.7547/8750-7315-105.1.22
- Bruckner-Tuderman L, Has C (2014) Disorders of the cutaneous basement membrane zone--the paradigm of epidermolysis bullosa. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 33:29-34. doi:10.1016/j.matbio.2013.07.007
- Buard B, Mahe G, Chapeau-Blondeau F, Rousseau D, Abraham P, Humeau A (2010) Generalized fractal dimensions of laser Doppler flowmetry signals recorded from glabrous and nonglabrous skin. *Medical physics* 37 (6):2827-2836. doi:10.1118/1.3395577
- Carriel V, Garrido-Gomez J, Hernandez-Cortes P, Garzon I, Garcia-Garcia S, Saez-Moreno JA, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, Campos A, Alaminos M (2013) Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *Journal of neural engineering* 10 (2):026022. doi:10.1088/1741-2560/10/2/026022
- Carriel V, Garzon I, Campos A, Cornelissen M, Alaminos M (2017) Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial conduits. *J Tissue Eng Regen Med* 11 (2):553-563. doi:10.1002/term.1949
- Carriel VS, Aneiros-Fernandez J, Arias-Santiago S, Garzon IJ, Alaminos M, Campos A (2011) A novel histochemical method for a simultaneous staining of melanin and collagen fibers. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 59 (3):270-277. doi:10.1369/0022155410398001
- Compton CC, Nadire KB, Regauer S, Simon M, Warland G, O'Connor NE, Gallico GG, Landry DB (1998) Cultured human sole-derived keratinocyte grafts re-express site-specific differentiation after transplantation. *Differentiation; research in biological diversity* 64 (1):45-53. doi:10.1046/j.1432-0436.1998.6410045.x
- Compton CC, Regauer S, Seiler GR, Landry DB (1990) Human Merkel cell regeneration in skin derived from cultured keratinocyte grafts. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 63 (2):233-241
- Dillon YK, Haynes J, Henneberg M (2001) The relationship of the number of Meissner's corpuscles to dermatoglyphic characters and finger size. *J Anat* 199 (Pt 5):577-584

- Ebersole GC, Anderson PM, Powell HM (2010) Epidermal differentiation governs engineered skin biomechanics. *Journal of biomechanics* 43 (16):3183-3190.
doi:10.1016/j.jbiomech.2010.07.026
- Fawcett DW, Bloom W, Raviola E (1994) *A textbook of histology*. 12th edn. Chapman & Hall, New York
- Fontanella CG, Carniel EL, Forestiero A, Natali AN (2014) Investigation of the mechanical behaviour of the foot skin. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin* 20 (4):445-452.
doi:10.1111/srt.12139
- Frahm KS, Andersen OK, Arendt-Nielsen L, Morch CD (2010) Spatial temperature distribution in human hairy and glabrous skin after infrared CO2 laser radiation. *Biomedical engineering online* 9:69. doi:10.1186/1475-925X-9-69
- Fu DJ, Thomson C, Lunny DP, Dopping-Hepenstal PJ, McGrath JA, Smith FJD, Irwin McLean WH, Leslie Pedrioli DM (2014) Keratin 9 is required for the structural integrity and terminal differentiation of the palmoplantar epidermis. *The Journal of investigative dermatology* 134 (3):754-763. doi:10.1038/jid.2013.356
- Garcia-Martinez L, Campos F, Godoy-Guzman C, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, Garzon I, Alaminos M, Campos A, Carriel V (2017) Encapsulation of human elastic cartilage-derived chondrocytes in nanostructured fibrin-agarose hydrogels. *Histochemistry and cell biology* 147 (1):83-95. doi:10.1007/s00418-016-1485-9
- Garcia Carmona FJ, Pascual Huerta J, Hernandez Toledo J (2009) Plantar epidermoid inclusion cyst as a possible cause of intractable plantar keratosis lesions. *Journal of the American Podiatric Medical Association* 99 (2):148-152
- Geneser F (2006) *Histología : sobre bases biomoleculares*. 3a. edn. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, etc.
- Giachini FR, Carriel V, Capelo LP, Tostes RC, Carvalho MH, Fortes ZB, Zorn TM, San Martin S (2008) Maternal diabetes affects specific extracellular matrix components during placentation. *J Anat* 212 (1):31-41. doi:10.1111/j.1469-7580.2007.00839.x
- Godoy-Guzman C, Nunez C, Orihuela P, Campos A, Carriel V (2018) Distribution of extracellular matrix molecules in human uterine tubes during the menstrual cycle: a histological and immunohistochemical analysis. *J Anat*. doi:10.1111/joa.12814
- Hagforsen E, Michaelsson G, Stridsberg M (2010) Normal and PPP-affected palmoplantar sweat gland express neuroendocrine markers chromogranins and synaptophysin differently. *Archives of dermatological research* 302 (9):685-693. doi:10.1007/s00403-010-1070-3
- Halata Z, Munger BL (1981) Identification of the Ruffini corpuscle in human hairy skin. *Cell and tissue research* 219 (2):437-440
- Hall JE, Guyton AC (2016) *Guyton & Hall: Tratado de fisiología*. 13ª edn. Elsevier, © Amsterdam ; Madrid
- Hasegawa J, Goto Y, Murata H, Takata M, Saida T, Imokawa G (2008) Downregulated melanogenic paracrine cytokine linkages in hypopigmented palmoplantar skin. *Pigment cell & melanoma research* 21 (6):687-699
- Hilliges M, Wang L, Johansson O (1995) Ultrastructural evidence for nerve fibers within all vital layers of the human epidermis. *The Journal of investigative dermatology* 104 (1):134-137
- Hussain SH, Limthongkul B, Humphreys TR (2013) The biomechanical properties of the skin. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]* 39 (2):193-203. doi:10.1111/dsu.12095
- Ishida-Yamamoto A, Igawa S (2014) Genetic skin diseases related to desmosomes and corneodesmosomes. *Journal of dermatological science* 74 (2):99-105.
doi:10.1016/j.jdermsci.2014.02.005
- Kanitakis J (2002) *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin*. *European journal of dermatology : EJD* 12 (4):390-399; quiz 400-391

- Kasiya MM, Mang'anda GD, Heyes S, Kachapila R, Kaduya L, Chilamba J, Goodson P, Chalulu K, Allain TJ (2017) The challenge of diabetic foot care: Review of the literature and experience at Queen Elizabeth Central Hospital in Blantyre, Malawi. *Malawi medical journal : the journal of Medical Association of Malawi* 29 (2):218-223
- Kawabe TT, MacCallum DK, Lillie JH (1985) Variation in basement membrane topography in human thick skin. *The Anatomical record* 211 (2):142-148. doi:10.1002/ar.1092110205
- Kelikian AS, Sarrafian SK, Sarrafian SK (2011) Sarrafian's anatomy of the foot and ankle : descriptive, topographical, functional. Third Edition. edn. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- Kennedy PM, Inglis JT (2002) Distribution and behaviour of glabrous cutaneous receptors in the human foot sole. *The Journal of physiology* 538 (Pt 3):995-1002
- Kiernan JA (1999) *Histological and histochemical methods : theory and practice*. 3rd edn. Butterworth Heinemann, Oxford ; Boston
- Kierszenbaum AL, Tres L (2012) *Histología y biología celular: Introducción a la anatomía patológica*. Elsevier Health Sciences Spain,
- Knapp AC, Franke WW, Heid H, Hatzfeld M, Jorcano JL, Moll R (1986) Cytokeratin No. 9, an epidermal type I keratin characteristic of a special program of keratinocyte differentiation displaying body site specificity. *J Cell Biol* 103 (2):657-667
- Lacour JP, Dubois D, Pisani A, Ortonne JP (1991) Anatomical mapping of Merkel cells in normal human adult epidermis. *The British journal of dermatology* 125 (6):535-542
- Landsman A, Taft D, Riemer K (2009) The role of collagen bioscaffolds, foamed collagen, and living skin equivalents in wound healing. *Clinics in podiatric medicine and surgery* 26 (4):525-533. doi:10.1016/j.cpm.2009.08.012
- Lechler T, Fuchs E (2007) Desmoplakin: an unexpected regulator of microtubule organization in the epidermis. *J Cell Biol* 176 (2):147-154. doi:10.1083/jcb.200609109
- Ledoux WR, Blevins JJ (2007) The compressive material properties of the plantar soft tissue. *Journal of biomechanics* 40 (13):2975-2981. doi:10.1016/j.jbiomech.2007.02.009
- Lee DH, Oh JH, Chung JH (2016) Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. *Journal of dermatological science* 83 (3):174-181. doi:10.1016/j.jdermsci.2016.05.016
- Lee H, Ro JY (2015) Differential expression of GSK3beta and pS9GSK3beta in normal human tissues: can pS9GSK3beta be an epithelial marker? *International journal of clinical and experimental pathology* 8 (4):4064-4073
- Liu L, Zhou Y, Cao X, Cao X, Cai J (2014) Heel reconstruction with free instep flap: a case report. *Journal of medical case reports* 8:319. doi:10.1186/1752-1947-8-319
- Lu DQ, Sueki H, Iijima M (2002) Number and distribution of interstitial cells lining the epidermis of normal human skin from different anatomical locations. *European journal of dermatology : EJD* 12 (2):149-153
- Macefield VG (2005) Physiological characteristics of low-threshold mechanoreceptors in joints, muscle and skin in human subjects. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 32 (1-2):135-144. doi:10.1111/j.1440-1681.2005.04143.x
- Maker AV, Iteld L (2015) Closure of Melanoma Defects on the Sole of the Foot Using Glabrous Skin: The End of the Flap? *Annals of surgical oncology* 22 (12):4081-4082. doi:10.1245/s10434-015-4449-8
- Maquart FX, Monboisse JC (2014) Extracellular matrix and wound healing. *Pathologie-biologie* 62 (2):91-95. doi:10.1016/j.patbio.2014.02.007
- McGlone F, Olausson H, Boyle JA, Jones-Gotman M, Dancer C, Guest S, Essick G (2012) Touching and feeling: differences in pleasant touch processing between glabrous and hairy skin in humans. *The European journal of neuroscience* 35 (11):1782-1788. doi:10.1111/j.1460-9568.2012.08092.x
- Metzler-Wilson K, Kellie LA, Tomc C, Simpson C, Sammons D, Wilson TE (2012) Differential vasodilatory responses to local heating in facial, glabrous and hairy skin. *Clinical*

- physiology and functional imaging 32 (5):361-366. doi:10.1111/j.1475-097X.2012.01137.x
- Mitchell D, Ibrahim S, Gusterson BA (1985) Improved immunohistochemical localization of tissue antigens using modified methacarn fixation. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 33 (5):491-495. doi:10.1177/33.5.3921605
- Mizumoto S, Kosho T, Yamada S, Sugahara K (2017) Pathophysiological Significance of Dermatan Sulfate Proteoglycans Revealed by Human Genetic Disorders. *Pharmaceuticals* 10 (2). doi:10.3390/ph10020034
- Moll I, Heid H, Franke WW, Moll R (1987) Distribution of a special subset of keratinocytes characterized by the expression of cytokeratin 9 in adult and fetal human epidermis of various body sites. *Differentiation; research in biological diversity* 33 (3):254-265
- Moll I, Kuhn C, Moll R (1995) Cytokeratin 20 is a general marker of cutaneous Merkel cells while certain neuronal proteins are absent. *The Journal of investigative dermatology* 104 (6):910-915
- Moll I, Lane AT, Franke WW, Moll R (1990) Intraepidermal formation of Merkel cells in xenografts of human fetal skin. *The Journal of investigative dermatology* 94 (3):359-364
- Moll R, Divo M, Langbein L (2008) The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and cell biology* 129 (6):705-733. doi:10.1007/s00418-008-0435-6
- Moore JC, Jolly GP (2000) Soft tissue considerations in partial foot amputations. *Clinics in podiatric medicine and surgery* 17 (4):631-648
- Munde PB, Khandekar SP, Dive AM, Sharma A (2013) Pathophysiology of merkel cell. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP* 17 (3):408-412. doi:10.4103/0973-029X.125208
- Murphree RW (2017) Impairments in Skin Integrity. *Nurs Clin North Am* 52 (3):405-417. doi:10.1016/j.cnur.2017.04.008
- Nagata T, Fujiwara M, Matsushita Y, Fukamizu H (2013) Reading man flap: application to plantar defects. *The Journal of foot and ankle surgery : official publication of the American College of Foot and Ankle Surgeons* 52 (4):498-500. doi:10.1053/j.jfas.2013.03.023
- Niehrs C (2006) Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 25 (57):7469-7481. doi:10.1038/sj.onc.1210054
- Nishizawa A (2016) Dyshidrotic Eczema and Its Relationship to Metal Allergy. *Current problems in dermatology* 51:80-85. doi:10.1159/000446785
- Oh SJ, Moon M, Cha J, Koh SH, Chung CH (2011) Weight-bearing plantar reconstruction using versatile medial plantar sensate flap. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS* 64 (2):248-254. doi:10.1016/j.bjps.2010.04.013
- Oliveira AC, Garzon I, Ionescu AM, Carriel V, Cardona Jde L, Gonzalez-Andrades M, Perez Mdel M, Alaminos M, Campos A (2013) Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering. *PloS one* 8 (6):e66538. doi:10.1371/journal.pone.0066538
- Omagari N, Ogawa K (1990) Three dimensional arrangement of fibrocytes in the dermal papilla of the human sole skin. *Okajimas folia anatomica Japonica* 67 (2-3):195-202
- Palleschi GM, Cipollini EM, Torchia D, Torre E, Urso C (2006) Fibrillar pattern of a plantar acquired melanocytic naevus: correspondence between epiluminescence microscopy and transverse section histology. *Clinical and experimental dermatology* 31 (3):449-451. doi:10.1111/j.1365-2230.2006.02060.x
- Pare M, Behets C, Cornu O (2003) Paucity of presumptive ruffini corpuscles in the index finger pad of humans. *The Journal of comparative neurology* 456 (3):260-266. doi:10.1002/cne.10519

- Parker J, Scharfbillig R, Jones S (2017) Moisturisers for the treatment of foot xerosis: a systematic review. *Journal of foot and ankle research* 10:9. doi:10.1186/s13047-017-0190-9
- Pavelka M, Roth Jr (2005) *Functional ultrastructure : an atlas of tissue biology and pathology*. 1st edn. Springer Verlag Wien, New York
- Poirier J, Massot BL (2002) *Histología*. Masson,
- Quindlen JC, Stolarski HK, Johnson MD, Barocas VH (2016) A multiphysics model of the Pacinian corpuscle. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 8 (11):1111-1125. doi:10.1039/c6ib00157b
- Rocchio TM (2009) Augmentation of atrophic plantar soft tissue with an acellular dermal allograft: a series review. *Clinics in podiatric medicine and surgery* 26 (4):545-557. doi:10.1016/j.cpm.2009.07.001
- Rook A, Fonseca Capdevila E (1988) *Tratado de dermatología*. 4a. edn. Doyma, Barcelona
- Ross MH, Pawlina W (2016) *Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology*. Seventh edition. edn. Wolters Kluwer Health, Philadelphia
- Sakiyama T, Kubo A (2016) Hereditary palmoplantar keratoderma "clinical and genetic differential diagnosis". *The Journal of dermatology* 43 (3):264-274. doi:10.1111/1346-8138.13219
- Sangiorgi S, Manelli A, Protasoni M, Ronga M, Raspanti M (2005) The collagenic structure of human digital skin seen by scanning electron microscopy after Ohtani maceration technique. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 187 (1):13-22. doi:10.1016/j.aanat.2004.06.001
- Schlee G, Sterzing T, Milani TL (2009) Foot sole skin temperature affects plantar foot sensitivity. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 120 (8):1548-1551. doi:10.1016/j.clinph.2009.06.010
- Shah RG, Pierce MC, Silver FH (2017) Morphomechanics of dermis-A method for non-destructive testing of collagenous tissues. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin* 23 (3):399-406. doi:10.1111/srt.12349
- Simman R (2004) Medial plantar arch pinch grafts are an effective technique to resurface palmar and plantar wounds. *Annals of plastic surgery* 53 (3):256-260
- SwenSSon O, Eady RA (1996) Morphology of the keratin filament network in palm and sole skin: evidence for site-dependent features based on stereological analysis. *Archives of dermatological research* 288 (2):55-62
- SwenSSon O, Langbein L, McMillan JR, Stevens HP, Leigh IM, McLean WH, Lane EB, Eady RA (1998) Specialized keratin expression pattern in human ridged skin as an adaptation to high physical stress. *The British journal of dermatology* 139 (5):767-775
- Tagami H (2008) Location-related differences in structure and function of the stratum corneum with special emphasis on those of the facial skin. *International journal of cosmetic science* 30 (6):413-434. doi:10.1111/j.1468-2494.2008.00459.x
- Thoolen M, Ryan TJ, Bristow I (2000) A study of the skin of the sole of the foot using high-frequency ultrasonography and histology. *Foot* 10 (1):14-17. doi:10.1054/foot.1999.0568
- Tilling T, Wladykowski E, Failla AV, Houdek P, Brandner JM, Moll I (2014) Immunohistochemical analyses point to epidermal origin of human Merkel cells. *Histochemistry and cell biology* 141 (4):407-421. doi:10.1007/s00418-013-1168-8
- Tollafeld DR (2017) Clinical photographic observation of plantar corns and callus associated with a nominal scale classification and inter- observer reliability study in a student population. *Journal of foot and ankle research* 10:45. doi:10.1186/s13047-017-0225-2
- Treede RD, Meyer RA, Raja SN, Campbell JN (1995) Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. *The Journal of physiology* 483 (Pt 3):747-758

- Tweedle CD (1978) Ultrastructure of Merkel cell development in aneurogenic and control amphibian larvae (*Ambystoma*). *Neuroscience* 3 (4-5):481-486
- Uehara K, Sone R, Yamazaki F (2010) Cigarette smoking following a prolonged mental task exaggerates vasoconstriction in glabrous skin in habitual smokers. *Journal of UOEH* 32 (4):303-316
- Uemura N, Okazaki M, Mori H (2016) Anatomical and histological study to determine the border of sole skin. *Surgical and radiologic anatomy : SRA* 38 (7):767-773. doi:10.1007/s00276-015-1609-2
- Ushiki T (2002) Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Archives of histology and cytology* 65 (2):109-126
- Van Steensel MA (2010) Recessive palmoplantar keratodermas: a tale of wings, hands, hair and cancer. *Giornale italiano di dermatologia e venereologia : organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia* 145 (6):763-770
- Vega JA, Garcia-Suarez O, Montano JA, Pardo B, Cobo JM (2009) The Meissner and Pacinian sensory corpuscles revisited new data from the last decade. *Microscopy research and technique* 72 (4):299-309. doi:10.1002/jemt.20651
- Vega JA, Lopez-Muniz A, Calavia MG, Garcia-Suarez O, Cobo J, Otero J, Arias-Carrion O, Perez-Pinera P, Menendez-Gonzalez M (2012) Clinical implication of Meissner's corpuscles. *CNS & neurological disorders drug targets* 11 (7):856-868
- Wang Q, Hayward V (2007) In vivo biomechanics of the fingerpad skin under local tangential traction. *Journal of biomechanics* 40 (4):851-860. doi:10.1016/j.jbiomech.2006.03.004
- Welsch U, Sobotta J (2008) *Histología. 2ª edn.* Editorial Médica Panamericana, Madrid
- Wilson TE, Zhang R, Levine BD, Crandall CG (2005) Dynamic autoregulation of cutaneous circulation: differential control in glabrous versus nonglabrous skin. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 289 (1):H385-391. doi:10.1152/ajpheart.00622.2004
- Yamaguchi Y, Itami S, Tarutani M, Hosokawa K, Miura H, Yoshikawa K (1999) Regulation of keratin 9 in nonpalmoplantar keratinocytes by palmoplantar fibroblasts through epithelial-mesenchymal interactions. *The Journal of investigative dermatology* 112 (4):483-488. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00544.x
- Yamaguchi Y, Itami S, Watabe H, Yasumoto K, Abdel-Malek ZA, Kubo T, Rouzaud F, Tanemura A, Yoshikawa K, Hearing VJ (2004) Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. *J Cell Biol* 165 (2):275-285. doi:10.1083/jcb.200311122
- Yamaguchi Y, Kubo T, Tarutani M, Sano S, Asada H, Kakibuchi M, Hosokawa K, Itami S, Yoshikawa K (2001) Epithelial-mesenchymal interactions in wounds: treatment of palmoplantar wounds by nonpalmoplantar pure epidermal sheet grafts. *Archives of dermatology* 137 (5):621-628
- Yamaguchi Y, Morita A, Maeda A, Hearing VJ (2009) Regulation of skin pigmentation and thickness by Dickkopf 1 (DKK1). *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings* 14 (1):73-75. doi:10.1038/jidsymp.2009.4
- Yamaguchi Y, Passeron T, Hoashi T, Watabe H, Rouzaud F, Yasumoto K, Hara T, Tohyama C, Katayama I, Miki T, Hearing VJ (2008) Dickkopf 1 (DKK1) regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/beta-catenin signaling in keratinocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (4):1009-1020. doi:10.1096/fj.07-9475com
- Yamazaki F, Sone R (2006) Different vascular responses in glabrous and nonglabrous skin with increasing core temperature during exercise. *European journal of applied physiology* 97 (5):582-590. doi:10.1007/s00421-006-0219-4
- Yano H, Sone R, Yamazaki F (2009) Vascular responses in glabrous and nonglabrous skin during acute mental stress in physically trained humans. *Journal of UOEH* 31 (4):325-337

- Zhang GL, Ge BF, Hu YX, Wu HG, Yin Y (2009) Reconstruction of degloved thumb with prefabricated flap. Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi 12 (3):184-186
- Zimmerman A, Bai L, Ginty DD (2014) The gentle touch receptors of mammalian skin. Science 346 (6212):950-954. doi:10.1126/science.1254229
- Zirra AM (1976) The functional significance of the skin's stratum lucidum. Morphologie et embryologie 22 (1):9-12

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.