

# ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA PIEL NORMAL DE TORTUGAS Y DURANTE LA CICATRIZACIÓN EXPERIMENTAL



Negrini J<sup>1,4</sup>, Ginel PJ<sup>2</sup>, Escamilla A<sup>1</sup>, Guerra R<sup>3</sup>, Ruiz J<sup>3</sup>, Mozos E<sup>1</sup>

XXVII REUNIÓN SEAPV

<sup>1</sup>Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, <sup>2</sup>Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Universidad de Córdoba, <sup>3</sup>Parque Zoológico Municipal de Córdoba, <sup>4</sup>Universidad Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil.



Trabajo financiado por los Grupos de Investigación PAIDI AGR262 y BIO307. Junta de Andalucía. España  
Fundación CAPES – Ministerio de Educación, Brasil



## INTRODUCCIÓN

Las técnicas inmunohistoquímicas son ampliamente utilizadas para estudiar enfermedades neoplásicas y no neoplásicas en mamíferos. Conocer las características inmunohistoquímicas de los tejidos normales es esencial para la interpretación de inmunoreactividad en condiciones patológicas.

El objetivo de este estudio fue evaluar la utilidad de 15 anticuerpos comerciales dirigidos frente a diferentes filamentos intermedios y marcadores de células inflamatorias en la piel blanda normal y durante el proceso de cicatrización por segunda intención en tortugas de la especie *Trachemys scripta*.

## RESULTADOS

Los resultados muestran que el anticuerpo AE1/AE3 da una excelente inmunoreacción cruzada en la epidermis. Los anticuerpos frente a desmina y actina- $\alpha$  de fibra muscular lisa dan reacción cruzada con las células musculares y el último con fibroangioblastos del tejido de granulación; CD3 reacciona con los linfocitos y algunos fibroblastos y endotelios activos en el tejido de granulación; Factor VIII reacciona con las células endoteliales de piel normal, las yemas vasculares y fibroangioblastos del tejido de granulación; MAC 387 y lisozima muestran una excelente reacción con células macrofágicas, algunas de morfología fibroblástica, y con endotelios de yemas vasculares.

## CONCLUSIÓN

De los 15 anticuerpos ensayados, 7 son útiles para la caracterización de células en la piel normal de tortugas y durante el proceso de cicatrización. Estos anticuerpos permitirán una mejor interpretación de la cicatrización y de las enfermedades cutáneas en tortugas.

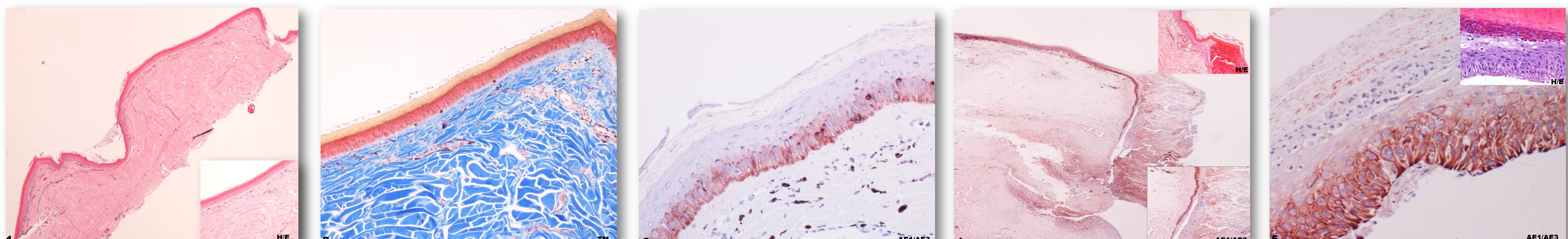
## MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio inmunohistoquímico se realizó en biopsias cutáneas fijadas en formaldehído al 10%, durante 24 horas y utilizando la técnica del complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC), los anticuerpos ensayados, las técnicas utilizadas y los resultados se resumen en la tabla 1. La intensidad de las reacciones cruzadas para cada anticuerpo fue evaluada subjetivamente como negativa, débil, moderada o fuerte por tres observadores.

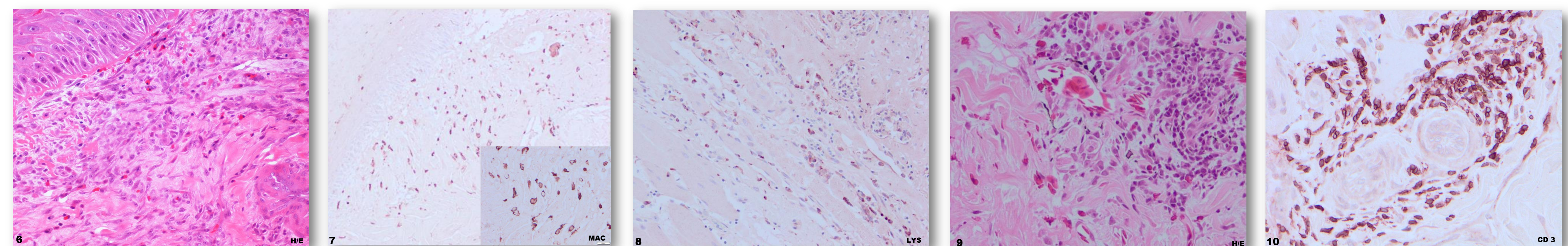
Tabla 1: Anticuerpos ensayados en la piel blanda de tortugas de la especie *Trachemys scripta*.

Anticuerpo (Clon)	Especificidad	Dilución	Pre-tratamiento/ Incubación	Resultados
Citoqueratinas * (AE1-AE3)	Epitelio simple y estratificado	1:100	Pronasa/ 18 horas a 4°C	Reacción citoplasmática moderada a intensa en queratinocitos del estrato basal y espinoso
CK 5/6 * (D5/16B4)	Citoqueratinas 5 y 6	1:50	Pronasa/ 18 horas a 4°C	No hay reacción cruzada
Anti-human cytokeratin * (MNF 116)	Células epiteliales	1:50	Citrato/ 18 horas a 4°C	No hay reacción cruzada
Desmina * (D33)	Células musculares lisas y estriadas	1:50 (1:50-1:100)	Citrato/ 18 horas a 4°C	Reacción débil en fibra muscular lisa
Vimentina * (Vim 3B4)	Células mesenquimales	1:100 (1:100-1:300)	Citrato/ 18 horas a 4°C	No hay reacción cruzada
NCL-MSA ** (HHF35)	Musculo liso	1:200 (1:200-1:800)	Pronasa/ 18 horas a 4°C	Inmunoreacción, preferentemente gránulos citoplasmáticos de fibroblastos y angioblastos
Factor VIII *	Células endoteliales	1:100 (1:200-1:400)	Citrato/ 3 horas a temperatura ambiente	Reacción citoplasmática granular moderada a fuerte en células endoteliales y fusiformes Reacción moderada en membrana de glóbulos rojos
Lisozima *	Lisozima	1:200 (1:200-1:400)	Pronasa/ 3 horas a temperatura ambiente	Reacción moderada a fuerte con patrón granular en endotelio vascular Reacción citoplasmática moderada en células de morfología fibroblástica
Myeloid/ Histiocyte Antigen (MAC 387)	Macrófagos/ histiocitos	1:100 (1:200-1:400)	Pronasa/ 3 horas a temperatura ambiente	Reacción citoplasmática moderada a fuerte en células endoteliales, fibroblásticas y macrófagos
$\alpha$ -1 antitripsina *	Leucocitos polimorfonucleares, monocitos	1:75 (1:800-1:1600)	Citrato/ 18 horas a 4°C	Reacción débil en células macrofágicas
CD3 ** (LN 10)	Linfocitos	1:200 (1:500)	Pronasa/ 3 horas a temperatura ambiente	Reacción moderada en linfocitos, fibroblastos y células endoteliales en tejido de granulación
CD 14 *** (CAM36A)	Macrófagos	1:50 (1:10-1:20)	Citrato/ 18 horas a 4°C	No hay reacción cruzada
CD 21 *** (GB25A)	Células dendríticas foliculares y células B maduras	1:50 (1:25-1:50)	Citrato/ 18 horas a 4°C	No hay reacción cruzada
CD 31 * (IC70A)	Células endoteliales/vasos sanguíneos	1:20 (1:20-1:40)	Citrato/ 18 horas a 4°C	Reacción débil en células fusiformes en tejido de granulación
CD 68 ** (S14H12)	Macrófagos	1:100 (1:100)	Citrato/ 18 horas a 4°C	Reacción débil en plasma y restos necróticos

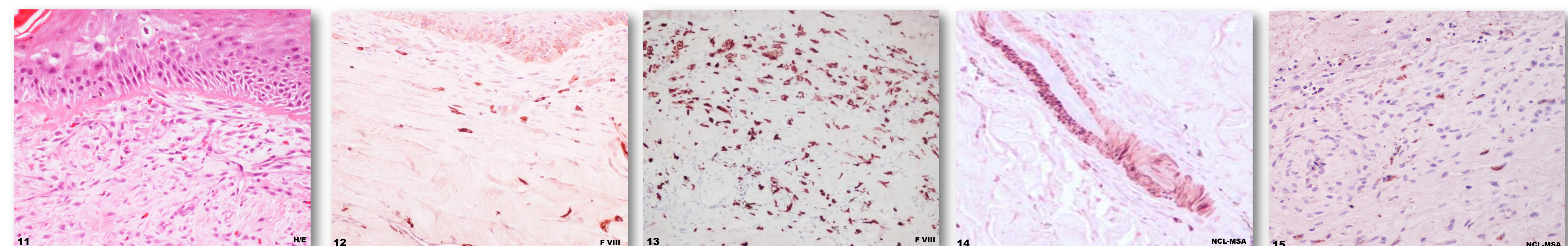
Notas: \* Dako Denmark A/S; \*\* Leika Biosystems/UK; \*\*\* Monoclonal Antibody Center/USA; ( ) Referencia de dilución del fabricante para secciones de tejido humano incluidas en parafina



1. Microfotografía de la piel normal. Las hendiduras dermo-epidérmicas producen el efecto macroscópico de escama. Insertado: epitelio estratificado queratinizado (HE). 2. Epidermis con un estrato córneo bien desarrollado y la dermis con abundantes fibras de colágeno maduras, la red vascular es poco evidente al estar formada por vasos pequeños (TM). 3. Piel normal con la inmunoreacción del Ac AE1/AE3 en las células basales y en los primeros queratinocitos del estrato espinoso. 4. A los 7 días de cicatrización se observa la inmunoreacción del Ac AE1/AE3 en el nuevo epitelio al borde de la herida. 5. La inmunoreacción con el Ac AE1/AE es muy intensa en las células proliferadas y permite identificar más fácilmente el nuevo epitelio del fondo de la herida a los 42 días de cicatrización. Insertado: Mismo periodo de cicatrización observado con HE.



6. Microfotografía del tejido de granulación a los 21 días. 7. Inmunoreacción del MAC con patrón granular difuso en células fibroblásticas a los 21 días de cicatrización. Insertado: en mayores aumentos observamos células con patrón macrofágico. 8. Patrón de inmunoreacción frente a la lisozima, preferentemente, granular. Zona de lecho de la herida a los 21 días de cicatrización donde se observa numerosas células endoteliales con patrón granular. 9. Microfotografía a los 21 días de cicatrización donde se observa el infiltrado perivascular. 10. Inmunoreacción citoplasmática del CD3 en linfocitos y reacción cruzada con endotelio a los 21 días de cicatrización.



11. La epitelización es completa a los 28 días y descansa en un lecho de tejido de granulación con abundantes fibroblastos, colágeno joven y yemas vasculares pequeñas. 12. Inmunoreacción frente a factor VIII, citoplasmática granular en células endoteliales y fusiformes en tejido de granulación a los 28 días de cicatrización. 13. El anticuerpo reacciona de forma cruzada con la proteína equivalente a el factor von Willebrand en los tejidos incluidos en parafina de estos animales. 14. Inmunoreacción del NCL-MSA en musculatura lisa de un vaso sanguíneo. 15. Inmunoreacción del NCL-MSA tipo granular citoplasmática en fibra muscular lisa y fibroangioblastos del tejido de granulación a los 28 días de cicatrización ..

## REFERENCIAS

Labelle P et al: Immunohistochemical Characteristics of Normal Canine Eyes. *Veterinary Pathology*, 2012; 49(5):860-869.  
Fuertes L et al: Inmunohistoquímica en dermatopatología: revisión de los anticuerpos utilizados con mayor frecuencia. *Actas Dermosifiliogr*. 2013;104(2):99-127.