

INMUNOMARCAJE DE LAS CÉLULAS DEL MESENCÉFALO DE LA BABA (*CAIMAN CROCODILUS CROCODILUS*) CON ANTICUERPOS ANTIHUMANOS. REPORTE DE UN CASO

Immunolabeling of the Mesencephalon's Nervous Tissue of the Spectacle Caiman (Caiman Crocodilus Crocodilus) with Antihuman Antibodies. A Case Report

Sonia Alvarado-Rico

Cátedra de Histología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Apartado 4563, Maracay 2101A, estado Aragua, Venezuela

Correo-E: alvaradorico8@gmail.com

Recibido: 15/10/21- Aprobado: 00/00/22

RESUMEN

El *Caiman crocodilus crocodilus*, conocido como baba y perteneciente al orden Crocodilia, fue utilizado en la presente investigación, como modelo experimental para estudios inmunohistoquímicos del tejido nervioso de la región mesencefálica. El procesamiento fue realizado en secciones de tejido nervioso, usando cuatro tipos de anticuerpos, a saber: dos anticuerpos monoclonales antihumanos producidos en ratones (AMAR), que corresponden a la enolasa neuronal específica (ENE) y la proteína del neurofilamento (PN) y dos anticuerpos policlonales antihumanos, producidos en conejos (APAC), que son el producto del gen proteico 9,5 (PGP 9,5) y la proteína ácida fibrilar glial (PAFG). Todos los anticuerpos fueron empleados contra el tejido nervioso de reptil, utilizando el método de En Vision™ Dual Link System-HRP de Dako. La astroglia de la baba mostró inmunorreacción intensa a la PAFG; mientras que la PN y la ENE mostraron marcajes moderados, y, finalmente, para el PGP 9.5, el marcaje fue mínimo. El presente estudio demostró que en el tejido nervioso de los reptiles existen estructuras celulares con características inmunohistoquímicas similares a las del tejido nervioso de mamíferos.

(Palabras clave: inmunohistoquímica, tejido nervioso, *Caiman Crocodilus Crocodilus*)

ABSTRACT

Caiman crocodilus crocodilus known as spectacle caiman and belonging to the order Crocodilia, was used in the present investigation as an experimental model for immunohistochemical studies of the nervous tissue of the mesencephalic region. Processing was performed on nerve tissue sections, using four types of antibodies, namely: two anti-human monoclonal antibodies produced in mice (AMAM), corresponding to neuron-specific enolase (NSE) and neurofilament protein (NP) and two anti-human polyclonal antibodies, produced in rabbits (APAR), which are protein gene product 9.5 (PGP 9.5) and glial fibrillary acidic protein (GFAP). All antibodies were used against reptile nervous tissue, using the Dako En Vision™ Dual Link System-HRP method. The spectacle caiman astroglia showed intense immunoreactivity to GFAP; while NP and NSE showed moderate labeling, and, finally, for PGP 9.5, the labeling was minimal. The present study demonstrated that cellular structures with immunohistochemical characteristics similar to those of mammalian nervous tissue exist in reptile nervous tissue.

(Key words: immunohistochemistry, nervous tissue, *Caiman Crocodilus Crocodilus*)

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de Inmunohistoquímica (IHQ) permiten la identificación de antígenos o marcadores celulares sobre muestras tisulares o citológicas. La utilización de anticuerpos monoclonales o policlonales permite la localización microanatómica de la expresión de los antígenos.

Según Honkoop [1] el uso de las técnicas IHQ ha ido progresivamente en aumento y se ha consolidado como una técnica esencial de rutina en el diagnóstico patológico en Patología Oncológica. La validez de la IHQ en el diagnóstico histopatológico depende de la calidad de las inmunotinciones. Además de la calidad de los anticuerpos y sistemas de detección, otros factores tienen un impacto importante en la inmunotinción: la fijación y procesamiento de los tejidos, el desenmascaramiento de los epítomos, y la sensibilidad del sistema de detección. [2]

Esta técnica permite evaluar el citoesqueleto, los productos de secreción, la localización de receptores de membrana plasmática y de membrana nuclear, además de caracterizar los procesos que tienen lugar en las células [3]

En los laboratorios de inmunohistoquímica se procesan diferentes tipos de muestras, las cuales pueden proceder de archivos de bloques de parafina, láminas citológicas y cortes de tejido fresco congelado [4]. En el caso de las muestras procedentes de bloques de parafina, estas son sometidas a la técnica de recuperación antigénica, ya que las proteínas estructurales de los tejidos al ser fijados en formalina e incluidos en parafina, se alteran en grado variable produciendo reacciones cruzadas con algunos antígenos tisulares, epítomos.

En la técnica de recuperación antigénica se utiliza el método de pretratamiento con calentamiento de los cortes histológicos en el que se desenmascaran las proteínas antigénicas, se provoca la ruptura de las uniones cruzadas y, se restaura la conformación del antígeno, epítomo, para poder ser reconocido por el anticuerpo específico [3].

En los últimos años, en Venezuela, se han realizado investigaciones para profundizar en el conocimiento de las características anatómicas y fisiológicas de la baba, por consiguiente, algunos autores han hecho estudios morfológicos e histoquímicos en diferentes órganos y sistemas de esta subespecie [5-13], demostrando su uso potencial como modelo

experimental para futuros estudios comparativos.

Por todo lo antes expuesto, esta investigación se centró en la realización de un estudio inmunohistoquímico del tejido del mesencéfalo de la baba, para evaluar la aplicabilidad de esta técnica y verificar si los anticuerpos comerciales elaborados en ratones y conejos, utilizados rutinariamente para reconocer antígenos en células de humanos, son capaces de reconocer antígenos en las células nerviosas de la baba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de este ensayo consistieron en el empleo de dos (02) bloques de parafina de la región mecesefálica de babas adultas, procedentes del archivo de bloques del Laboratorio de la Cátedra de Histología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela.

De los bloques de parafina seleccionados se realizaron cortes de 4μ de grosor, en el micrótopo marca JUNG de hoja móvil, los cuales se tiñeron empleando la coloración de rutina Hematoxilina y Eosina, descrita por Prophet *et al.* [14], con la finalidad de observar la estructura histológica de este segmento de tejido nervioso. Los cortes histológicos fueron observados a través del microscopio óptico y las áreas de interés se fotografiaron bajo un fotomicroscopio Nikon Eclipse E400 con cámara Nikon Coolpix 950 de 2,1 mega píxeles. Todo este procesamiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Histoquímica de la Cátedra de Histología de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

Para la técnica IHQ, se utilizaron cuatro anticuerpos que se mencionan a continuación: a. Dos anticuerpos monoclonales antihumanos producidos en ratones. Estos anticuerpos corresponden a la Enolasa Neuronal Específica (ENE) y la Proteína del Neurofilamento (PN) de Dako; b. Dos anticuerpos policlonales antihumanos producidos en conejos. Estos anticuerpos son: el Producto del Gen Proteico 9,5 (PGP 9,5) y la Proteína Ácida Fibrilar Glial (PAFG) de Dako (Cuadro 1). El estudio IHQ se realizó con el método de En Vision TM Dual Link System-HRP de Dako, que sigue una serie de pasos convencionales. El tejido control empleado fue el tejido nervioso humano (cerebelo).

Con relación a la técnica de inmunohistoquímica, esta fue realizada en el Instituto Anatomopatológico

Cuadro 1. Anticuerpos comerciales utilizados en el estudio inmunohistoquímico

Anticuerpo	Dilución	Control
Proteína ácida fibrilar glial (PAFG)	1:400	Cerebelo
Proteína del neurofilamento (PN)	1:100	Cerebelo
Producto del gen proteico 9,5 (PGP 9,5)	1:100	Tejido nervioso
Enolasa neuronal específica (ENE)	1:300	Páncreas

“José A. O Daly”, Sección de Inmunohistoquímica y Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.

Para iniciar la técnica IHQ, se realizaron cortes a los bloques de parafina de 2μ de grosor en un micrótopo REICHTER-JUNG de hoja móvil, el procesamiento de las muestras se llevó a cabo según el siguiente protocolo:

De cada bloque de parafina se efectuaron diez (10) cortes, para revelar distintos antígenos, sobre láminas tratadas con Poli L Lisina al 1% (v/v) preparada a una dilución 50/50. Los cortes se dejaron secar en la estufa a 60°C por 24 h, para asegurar la adhesión firme de los tejidos a las láminas.

Haciendo uso de una campana de extracción, se desparafinaron los cortes por incubación en una batería de cinco (05) baños de xilol, durante 2 a 3 min cada baño y se hidrataron en cuatro baños de alcohol isopropílico decreciente. Después del último alcohol, se lavó con agua corriente durante 5 min.

Luego, se procedió a la recuperación antigénica térmica, se utilizó una solución recuperadora de Buffer Citrato (0,1 M) pH 3-6, precalentada en una vaporera doméstica Oster a 80°C por 20 min. Cuando la temperatura del recuperador estuvo cercana a los 60°C se introdujeron las láminas en los correspondientes envases hasta alcanzar los 100°C por 30 min, se dejaron reposar hasta que alcanzó la temperatura ambiente y se dejaron incubar por 24 h.

Las cortes se sometieron a lavado con agua corriente y con Tris Buffer Salino en Tween 20 (TBST) de 2 a 3 veces por cinco min. Se realizó el Bloqueo de la peroxidasa endógena: se incubaron las secciones con $150\mu\text{L}$ de peróxido de hidrógeno al 3% en solución acuosa de metanol y agua, en una cámara húmeda durante 20 a 30 min y luego se lavó

con agua corriente para lavar el exceso de peróxido de hidrógeno y metanol.

Posteriormente, se lavó con TBST de 2 a 3 veces por 5 min. A continuación, se incubó con $180\text{-}200\mu\text{L}$ de la dilución apropiada del anticuerpo primario durante 1 h en cámara húmeda. Se hizo lavado con TBST de 2 a 3 veces por 5 min.

Se incubó con $150\text{-}200\mu\text{L}$ del anticuerpo secundario acoplado a polímero de peroxidasa (Envision TM + Dual Link System- HRP, Dako) por 30 min en cámara húmeda. Se lavó con TBST de 2 a 3 veces por 5 min.

Transcurrido el tiempo, se aplicó el sustrato cromogénico peróxido de hidrógeno-diaminobencidina (DAB) Thermo Scientific por 10 min en cámara húmeda. Se lavó en cubetas con agua corriente por 5 min. Se contrastaron los núcleos con Hematoxilina de Meyer. Se lavó con agua corriente por 5 min.

Los cortes se deshidrataron en una batería con alcoholes crecientes; posteriormente, se aclaró en xilol y se realizó el montaje permanente de los cortes con bálsamo *Entellan de Sigma-Aldrich* para su posterior observación en el microscopio óptico, análisis e interpretación de los resultados.

La positividad para los diferentes anticuerpos se evaluó según una escala de valoración cualitativa en función de la intensidad del marcaje de los tejidos. Se consideró como una reacción positiva, si el tejido adquiría un tono amarillo-marrón cuyo marcaje era igual al control. Dicha escala se estableció de la siguiente manera: una reacción intensa (+++), reacción moderada (++) , reacción débil (+), tonalidad marrón estaba ausente, reacción negativa (-), respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta investigación se evidenció una inmunorreactividad intensa para la PAFG (Figura 1), la cual marca filamentos gliales de astrocitos; estos filamentos se componen de proteína ácida fibrilar glial y confieren rigidez a la célula [15].

Los resultados de este estudio coinciden con investigaciones realizadas por Kalman y Pritz [16] en *Caiman crocodilus*, quienes emplearon una metodología convencional con un complejo Avidina-Biotina y anticuerpo monoclonal PAFG contra porcino, resultando que la astroglia de *Caiman* exhibió una fuerte inmunorreactividad a los

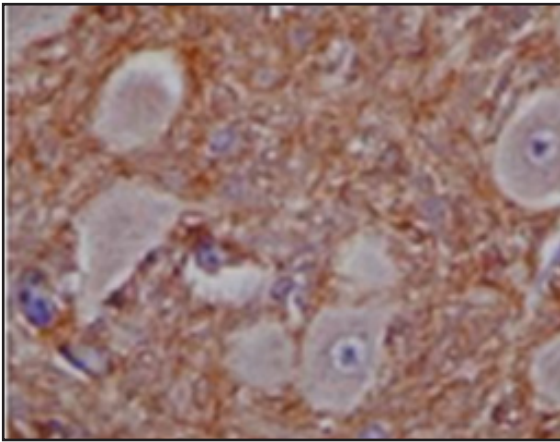


Figura 1. Inmunorreacción intensa para la PAFG en tejido nervioso de la baba.

anticuerpos producidos contra PAFG de mamíferos.

En concordancia además con un estudio en el que se investigaron los elementos inmunopositivos PAFG en el tejido nervioso de cinco especies de lagartos y tres especies de serpientes, en el que utilizaron un anticuerpo monoclonal anti PAFG de ratón, se obtuvieron desde intensas a débiles inmunorreacciones positivas para PAFG en el mesencéfalo de esta variedad de especies a estudiar [17].

Con respecto a los resultados de las inmunorreacciones para la PN y la ENE mostraron marcaje moderado. Estos anticuerpos fueron capaces de localizar neurofilamentos de las neuronas, especialmente del axón y el citoplasma de las células neuronales, respectivamente. En el caso del anticuerpo PGP 9,5, el cual marca células secretoras, el marcaje resultó mínimo (Cuadro 2), lo que coincide con la inmunorreacción de 22 muestras de células no β de tumores endocrinos pancreáticos cuyas reacciones también fueron negativas o débilmente positivas [18], permitiéndole a estos investigadores concluir que la inmunorreacción negativa al PGP 9,5 pueden ser usadas como marcador de malignidad potencial de mal pronóstico para las células no β de tumores endocrinos pancreáticos .

CONCLUSIÓN

Los resultados preliminares obtenidos en esta investigación demostraron que utilizando el protocolo inmunohistoquímico de los anticuerpos comerciales dirigidos contra antígenos de mamíferos, pueden emplearse sobre los tejidos de reptiles, ya que al

Cuadro 2. Resultados de la inmunorreacción realizada en el tejido nervioso de baba (*Caiman crocodilus crocodilus*).

Anticuerpos	Ponderación	Estructuras inmunolocalizadas
Proteína ácida fibrilar glial (PAFG)	(+++)	Filamentos intermedios de células gliales
Proteína del neurofilamento (PN)	(++)	Neuronas especialmente axón
Enolasa neuronal específica (ENE)	(++)	Neuronas especialmente citoplasma
Producto del gen proteico 9,5 (PGP 9,5)	(+)	Células secretoras

mostrar inmunorreacción positiva particularmente con el anticuerpo PAFG indica que existen epítopes antigénicos con cierto grado de conservación del tejido nervioso en la baba, que pueden ser reconocidos por los anticuerpos específicos.

Respecto a estos resultados, se podrían realizar en el futuro interesantes investigaciones utilizando al tejido nervioso de la baba como modelo experimental, con el fin de continuar con el estudio de las estructuras productos de secreción y caracterizar muchos procesos que tienen lugar en las células de estos tejidos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los Doctores Marcello Rossi y Ghislaine Céspedes del Instituto Anatomopatológico “José A. O Daly”, Sección de Inmunohistoquímica y Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela. Especialmente al Dr. Jesús Rojas Urbina por la revisión de este manuscrito y a El Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV (CDCH, UCV), por el apoyo económico (PG-11-8159-2011-1).

REFERENCIAS

- Honkoop A, Van Diest P, De Song J. Prognostic role of clinical, pathological and biological characteristic in patients with locally advanced breast cancer. Br J Cancer. 1998; 77(4): 621.

2. Riera J.R. Técnicas de inmunohistoquímica. Estandarización y control de calidad en inmunohistoquímica (1ª parte). Problemas de fijación y procesamiento de los tejidos: la recuperación antigénica como solución. Rev. Esp. Patol. 1999; 32(4):573-581.
3. García, J. Técnicas de inmunomarcaje a nivel ultraestructural. Trabajo de fin de grado. Departamento de Morfología y Biología Celular, Universidad de Oviedo Facultad de Biología. 2015. 30 p
4. Chong A, Arteaga E, Iglesias N, Chávez B. Laboratorio de Inmunohistoquímica. Manual de Prácticas Médicas. H.C.Q. "Hermanos Ameijeiras" IV Edición. 2012.
5. Britton A. Crocodilian species *Caiman crocodilus* (Spectacled Caiman). [Documento en línea] 1999 [Consultado 16 de julio de 2008]. Disponible en: <http://www.flmn.ufl.edu/natsci/herpetology/brittoncrocs/csp-ccro.htm>
6. Rossini M. Características Macroscópicas Histológicas e Histoquímicas del Sistema Digestivo de la Baba [Trabajo de Grado para optar al Título de Magíster Scientiarum]. Venezuela: FCV, UCV. Postgrado en Medicina Veterinaria; 2003. 119 p.
7. Cabrera F. Descripción Anatómica e Histoquímica del Aparato Genital Masculino de la Baba [Trabajo de Grado para optar al Título de Magíster Scientiarum]. Venezuela: FCV, UCV. Postgrado en Medicina Veterinaria; 2003. 69 p.
8. González M. Descripción Morfológica del Aparato Respiratorio de la Baba. [Trabajo de Grado para optar al Título de Magíster Scientiarum]. Venezuela: FCV, UCV. Postgrado en Medicina Veterinaria; 2004. 72 p.
9. Duque M. Descripción Morfológica del Sistema Cardiovascular de la Baba. [Trabajo de Grado para optar al Título de Magíster Scientiarum]. Venezuela: FCV, UCV. Postgrado en Medicina Veterinaria; 2005. 74 p.
10. Cabrera F, García G. Mucinas del Aparato Genital Masculino de la Baba. Rev Fac Cs Vet. UCV. 2007; 48: 77-84.
11. Rossini M, García G. Descripción Morfológica de las Células Sanguíneas de la Baba en Vida Salvaje. Rev Fac Cs Vet. UCV. 2010; 51(2): 63-70.
12. González-Torrealba J, García G, Alvarado-Rico S, Marcano de Díaz E; Rodríguez A. Caracterización Morfológica de los órganos del Sistema Endocrino de la Baba (*Caiman crocodilus crocodilus*). Aspectos Histológicos. Rev. Fac Cs Vet UCV.2017; 58(1):39.
13. Alvarado-Rico S, García G, Céspedes R, Casañas M, Rodríguez A. Caracterización Morfológica e histoquímica de la baba (*Caiman crocodilus crocodilus*). Rev. Fac Cs Vet UCV.2012; 53(1): 13-19.
14. Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L., editores. Métodos Histotecnológicos. Washington: Instituto de Patología de la Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP); 1995. 278 p.
15. Geneser, F. 2001. Histología sobre las bases moleculares. 3a Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 813p.
16. Kálmán M, Pritz M. Glial fibrillary acidic protein-immunopositive structures in the brain of a *Crocodilian*, *Caiman crocodilus*, and its bearing on the evolution of astroglia. J Comp Neurol. 2001; 431(4):460-80.
17. Lorincz D., Kálmán M. Distribution of GFAP in Squamata: Extended Immunonegative areas, astrocytes, high diversity, and their bearing on evolution. Front. Neuroanat.2020. 14:1-22
18. Tomita T. PGP 9.5 Immunocytochemical staining for pancreatic endocrine tumors. Islets. 2013; 5 (3):122-128.