

**DIAGNÓSTICO INMUNOHISTOQUÍMICO DE DERMATOSIS  
INMUNOMEDIADAS EN PERROS DOMÉSTICOS.**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

**MARIO ADÁN BEDOLLA ALVA**

ASESORES: **DR. FERNANDO CONSTANTINO CASAS**  
**MVZ MC GERARDO SALAS GARRIDO**

**MÉXICO, D.F. 2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIAS**

A mi mamá y a mi papá, Alicia Alva Vargas y Mario Bedolla Solares, por darme esta vida ¡que si vale la pena vivirla!, por haberme dado sus consejos, su apoyo incondicional y los valores para poder tomar mis decisiones. Este trabajo también es suyo y es producto del amor que siempre me han tenido y que me han sabido expresar. Los amo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis asesores, Dr. Fernando Constantino Casas y MVZ Gerardo Salas Garrido, gracias por su confianza, apoyo, consejos y sugerencias para la realización de esta tesis y durante mi estancia en el Departamento de Patología.

Al Dr. Alfonso López Mayagoitia, gracias por proporcionarme el testigo positivo de pénfigo foliáceo.

A los técnicos, Sr. Luis Antonio Morales Arreola y Sr. Eduardo Miranda López, por elaborar los cortes de los tejidos para su estudio histológico y de inmunohistoquímica.

Al fotógrafo, Sr. Jaime Eugenio Córdova López, por su ayuda en la obtención del material fotográfico.

A mis amigos y compañeros de esta Facultad y del Departamento de Patología, por las experiencias compartidas.

A mi Facultad, por darme los elementos para mi preparación como futuro profesionalista.

## CONTENIDO

Página

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
• PÉNFIGO .....	3
• Pénfigo vulgar .....	4
• Pénfigo vegetante .....	5
• Pénfigo foliáceo .....	5
• Pénfigo eritematoso .....	6
• Diagnóstico de pénfigo .....	7
• Pronóstico de pénfigo .....	8
• Tratamiento de pénfigo .....	8
• LUPUS ERITEMATOSO .....	9
• Lupus eritematoso sistémico .....	9
• Lupus eritematoso discoidal .....	11
• Diagnóstico de lupus eritematoso .....	12
• Pronóstico de lupus eritematoso .....	13
• Tratamiento de lupus eritematoso .....	13
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>HIPÓTESIS</b> .....	15
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	15
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	15
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	16
• EVALUACIÓN DE LESIONES MICROSCÓPICAS.....	16
• MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	16
• ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	20
• ESTUDIO RETROSPECTIVO .....	20
<b>RESULTADOS</b> .....	22
• ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO .....	22
• ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO .....	22

<b>DISCUSIÓN</b> .....	25
<b>CONCLUSIONES</b> .....	29
<b>REFERENCIAS</b> .....	30
<b>APÉNDICE</b> .....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

	<u>Página</u>
<b>FIGURAS</b> .....	35
<b>CUADROS</b> .....	39

## RESUMEN

BEDOLLA ALVA, MARIO ADÁN. Diagnóstico inmunohistoquímico de dermatosis inmunomediadas en perros domésticos (bajo la dirección de Dr. Fernando Constantino Casas y MVZ MC Gerardo Salas Garrido).

Se realizó un estudio retrospectivo de 28 casos (2001-2004) de perros, cuyas muestras de piel incluidas en parafina presentaban lesiones microscópicas y diagnóstico sugerentes a pénfigo o lupus eritematoso. Dichas muestras se revaluaron mediante inmunohistoquímica identificando un depósito intercelular de IgG canino. Se obtuvieron reacciones positivas en el 57.14% (16 casos) de las muestras procesadas. La distribución de los depósitos intercelulares de IgG en el espacio intercelular de la epidermis, así como de la membrana basal fue de ayuda para diferenciar entre pénfigo y lupus eritematoso y entre las diferentes presentaciones de pénfigo. De los casos positivos, el 50% (8 casos) fueron consistentes con pénfigo foliáceo, el 31.25% (5 casos) fueron diagnosticados como pénfigo vulgar, el 12.5% (2 casos) fueron consistentes con pénfigo eritematoso y el 6.25% (1 caso) correspondió a lupus eritematoso. La inmunohistoquímica es una herramienta diagnóstica de gran ayuda por lo que en el Departamento de Patología es imprescindible para confirmar el diagnóstico de pénfigo y lupus eritematoso.

## INTRODUCCIÓN

Las dermatosis inmunomediadas se caracterizan por la producción de autoanticuerpos contra componentes de la piel y por la formación de complejos antígeno-anticuerpo que se depositan en diferentes localizaciones de la piel.<sup>1</sup> Algunas de las enfermedades autoinmunes de piel más importantes en los perros son: pénfigo, lupus eritematoso, penfigoide bulloso, dermatosis lineal por IgA, epidermólisis flictenar adquirida, alopecia areata, enfermedad de las crioaglutininas, enfermedad trasplante *versus* hospedero y síndrome uveodermatológico.<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup> Se ha informado que ocupan aproximadamente el 1.4% de todas las dermatosis caninas examinadas por el servicio de dermatología de la Universidad de Cornell, Nueva York. Las más frecuentemente diagnosticadas son pénfigo y lupus eritematoso. El pénfigo se presenta aproximadamente en el 0.6% de todas las dermatosis caninas, mientras que el lupus eritematoso representa el 0.5%.<sup>4,5</sup>

## **PÉNFIGO**

Las enfermedades que constituyen el complejo pénfigo se asocian con la formación de autoanticuerpos contra proteínas de unión intercelular de queratinocitos (desmogleína 1 y 3).<sup>1,2,7</sup>

El estímulo que inicia la dermatopatía autoinmune es desconocido, aunque en humanos, drogas como penicilamina y fenilbutazona pueden asociarse a la presentación de la enfermedad. La exposición a luz ultravioleta exacerba las lesiones.<sup>7</sup> Otra condición relacionada con esta patología es la enfermedad cutánea crónica, en la que los perros cursan uno o más años con enfermedad alérgica o prurítica.<sup>1</sup>

La unión de los autoanticuerpos con antígenos intercelulares induce que los queratinocitos endociten el complejo antígeno-anticuerpo, lo que provoca que las células afectadas sinteticen y secreten el activador del plasminógeno (una proteasa extracelular). Esta enzima convierte el plasminógeno en plasmina la cual cataliza la hidrólisis de proteínas intercelulares (cadherinas), como la desmogleína y desmocolina, provocando la separación entre las células y llevando a la formación de acantolisis, vesículas y pústulas.<sup>1,2,6,7,9</sup>

El complejo pénfigo consta de cuatro enfermedades cutáneas que ocurren ocasionalmente en humanos, perros, gatos, caballos y cabras.<sup>2,4</sup>

## **Pénfigo vulgar**

Es la forma más grave y segunda más común del complejo pénfigo, se ha diagnosticado en perros y gatos principalmente, donde no hay informes de predisposición de raza, género ni edad.<sup>1,2,4,6,7,10,11,12</sup>

Las lesiones macroscópicas (en 90% de los casos) consisten en vesículas, erosiones y úlceras en cavidad oral. También se presentan alrededor de las uniones mucocutáneas (nariz, labios, párpados, prepucio, vulva y ano), piel de axila, grupa, cojinetes palmares y plantares, así como en la superficie interna de las orejas.<sup>1,2,4,6,7,12,13</sup> En esta enfermedad puede haber úlceras en la córnea y en el esófago, además puede observarse desprendimiento de las uñas (onicomadesis).<sup>1,6,11</sup> Las vesículas suelen ser frágiles y se rompen con facilidad, dejando erosiones que predisponen a infecciones secundarias.<sup>1,2,6</sup> La presión suave con el dedo sobre la piel de las regiones afectadas puede hacer que en la epidermis se formen vesículas o úlceras (signo de Nikolsky).<sup>1,2,6,7</sup>

El examen histológico de la piel muestra acantolisis, hendiduras y vesículas en la región suprabasal de la epidermis.<sup>1,2,4,7</sup> Las vesículas contienen queratinocitos acantolíticos y ninguna o pocas células inflamatorias; además dichas vesículas exhiben en su parte basal una hilera de células basales unidas a la membrana basal (células en hilera de lápidas).<sup>1,6,7</sup> Este proceso se puede extender a los folículos pilosos.<sup>6,7</sup> La dermis superficial suele tener inflamación perivascular a liquenoide compuesta por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos.<sup>1,4,7</sup> Además se puede observar incontinencia pigmentaria.<sup>6</sup>

El autoantígeno identificado en esta patología es la desmogleína 3 que se localiza en los queratinocitos basales.<sup>1,2,13</sup>

### **Pénfigo vegetante**

Es una forma leve y la más rara del pénfigo vulgar. Únicamente se ha descrito en perros.<sup>1,2,4,6,7,14</sup> Tampoco hay predisposición de edad, raza ni género.<sup>1,6</sup>

Las lesiones macroscópicas son vesículas, pústulas y vegetaciones verrucosas.<sup>1,4,6,7</sup>

La histopatología de la piel revela hiperplasia epidérmica irregular, papilomatosis y microabscesos que contienen numerosos eosinófilos, escasos neutrófilos y células acantolíticas; las pústulas pueden involucrar el epitelio del folículo piloso.<sup>1,2,4,6,7</sup> La inflamación en dermis superficial se compone de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.<sup>6</sup>

### **Pénfigo foliáceo**

Es una variante más leve y más común que el pénfigo vulgar.<sup>1,2,4,15,16</sup> No hay predisposición de edad, ni género.<sup>1,4</sup> Se le ha observado en humanos, perros, gatos, cabras y caballos.<sup>2,4,6,7,15,16,17</sup> En perros existen casos de enfermedad familiar, las razas predispuestas a esta enfermedad son: Akita, Chow chow, Dachshund, Bearded collie, Newfoundland, Doberman pinscher y Shipperke.<sup>1,6,7,16,18</sup>

Las lesiones macroscópicas consisten en vesículas o pústulas, erosiones y costras en la cara (plano nasal y región periorbitaria), orejas, tronco y miembros torácicos y

pelvianos.<sup>1,2,4,6,7</sup> Estas lesiones tienden a manifestarse como una dermatitis exfoliativa,<sup>2,7</sup> donde hay diferentes grados de alopecia.<sup>6,7</sup> También se ha observado hiperqueratosis y costras en los cojinetes palmares y plantares, también puede haber desprendimiento de las uñas (onicomadesis).<sup>1,4,7,17</sup>

En la histopatología de la piel se aprecia acantolisis, hendiduras, vesículas y pústulas en la región subcorneal de la epidermis.<sup>2,4,6,7</sup> Las pústulas contienen numerosos neutrófilos o eosinófilos, así como queratinocitos acantolíticos.<sup>6,7</sup> Los folículos pilosos pueden estar involucrados.<sup>4,7</sup> Las vesículas y las pústulas son frágiles y es raro que persistan.<sup>2,6</sup> La dermis superficial muestra inflamación perivascular a liquenoide compuesta por numerosos neutrófilos y eosinófilos, y menor número de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas,<sup>4,6</sup> donde puede haber incontinencia pigmentaria.<sup>6</sup>

El autoantígeno identificado es la desmogleína 1.<sup>1,2</sup>

### **Pénfigo eritematoso**

Es la tercera forma más común del complejo pénfigo, informada en perros y gatos.<sup>2,4</sup> Puede representar una forma benigna de pénfigo foliáceo o una forma intermedia entre pénfigo y lupus eritematoso.<sup>1,2,4,6,7</sup> Algunos perros que presentan esta variedad de pénfigo tienen anticuerpos antinucleares en el suero.<sup>2,6,7</sup> No hay predisposición de edad ni género, sin embargo los perros Collie y Pastor alemán son los mayormente afectados.<sup>1,4,6,7</sup>

Las lesiones macroscópicas son pústulas, erosiones y costras en cara y orejas.<sup>1,2,4,6,7</sup> También se puede observar despigmentación, eritema, erosiones y úlceras en plano nasal.<sup>2,4,6,7</sup>

Microscópicamente la piel muestra acantolisis y pústulas de subcorneales a intragranulares, inclusive en folículos pilosos, asimismo hay acantosis.<sup>1,4,6,7</sup> En la dermis superficial se aprecia inflamación liquenoide compuesta por numerosos macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y escasos neutrófilos.<sup>1,4,6,7</sup>

## **Diagnóstico de pénfigo**

El diagnóstico de pénfigo se realiza por medio de diferentes métodos, para diferenciar los diferentes tipos de pénfigo es necesario conocer la historia clínica, realizar el examen físico y la histopatología de las lesiones, seguido de la inmunofluorescencia o inmunohistoquímica.<sup>1,10</sup>

La evaluación de frotis de las vesículas o pústulas intactas o erosiones recientes revela numerosos neutrófilos, eosinófilos y queratinocitos acantolíticos.<sup>1</sup>

La histopatología es útil en el diagnóstico temprano y se requiere tomar múltiples muestras de piel de las lesiones recientes.<sup>1,2</sup>

Las pruebas de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica resultan esenciales para confirmar que la enfermedad es parte del complejo pénfigo, en donde se observa el depósito de inmunoglobulinas, con o sin complemento, sobre la superficie de los queratinocitos.<sup>1,2,4,7</sup> En el pénfigo vulgar se observan depósitos intercelulares de IgG y ocasionalmente complemento en la parte basal de la epidermis.<sup>6</sup> En el pénfigo foliáceo se aprecian depósitos intercelular de IgG o IgM y

frecuentemente C<sub>3</sub> en la parte superficial de la epidermis.<sup>6</sup> En pénfigo eritematoso se observan depósitos de inmunoglobulinas en el espacio intercelular de epidermis y membrana basal.<sup>1,6,7</sup>

### **Pronóstico de pénfigo**

Es importante distinguir entre las dos formas principales de pénfigo (pénfigo foliáceo *versus* pénfigo vulgar) para establecer un pronóstico que depende de la forma y severidad de la enfermedad.<sup>1,2</sup> Debido a la gravedad de las lesiones en el pénfigo vulgar el tratamiento frecuentemente es insatisfactorio y las lesiones persisten.<sup>1,2</sup> En cambio el tratamiento en pénfigo foliáceo es más satisfactorio.<sup>1,2</sup> Asimismo, el pénfigo eritematoso y pénfigo vegetante son desórdenes usualmente benignos.<sup>1</sup>

### **Tratamiento de pénfigo**

Las enfermedades del complejo pénfigo se tratan con corticosteroides sistémicos y en caso de infección bacteriana secundaria son necesarios los antibióticos.<sup>2,4,6</sup> En casos difíciles se usan drogas como ciclofosfamida, azatioprina, clorambucilo, sales de oro y tetraciclinas junto con niacinamida.<sup>1,2,4,21</sup> Nuevos fármacos incluyen ciclosporina, tacrolimus, micofenolato y mofetil; aunado a otras alternativas terapéuticas como dapsona, sulfasalazina y terapia de inmunoglobulinas endovenosa.<sup>21</sup> También pueden utilizarse bloqueadores solares y en casos leves glucocorticoides tópicos.<sup>1</sup>

## **LUPUS ERITEMATOSO**

Ocurre en dos formas: lupus eritematoso sistémico (LES), que afecta múltiples órganos y tejidos, incluyendo la piel y el lupus eritematoso discoidal (LED), que afecta únicamente la piel.<sup>22</sup>

### **Lupus eritematoso sistémico (LES)**

Es un trastorno inmunitario generalizado que afecta humanos, primates, ratones, caballos, perros y gatos.<sup>1,23,24</sup> En perros no hay predisposición de edad ni género y suele presentarse en Collie, Pastor de Shetland, Beagle, Setter irlandés, Poodle, Afgano y Spitz.<sup>1,3,5,6,22</sup> Se ha estimado una incidencia de esta enfermedad en el 0.03% de la población canina en Estados Unidos.<sup>1,25</sup>

El LES es una enfermedad multisistémica caracterizada por hiperactividad de linfocitos B autorreactivos debido a una disminución en la actividad de las células T supresoras.<sup>1,3,5,26</sup> Aunque la causa de esta pérdida de control es incierta, se han descrito que factores genéticos, hormonales y ambientales juegan un papel importante en la etiología del LES.<sup>1,3,22</sup> La predisposición genética a esta enfermedades destaca pues se presenta en perros consanguíneos, además se ha demostrado que la progenie de perros con LES tienden a padecer la enfermedad. Otro factor genético asociado a esta condición es la deficiencia de componentes del complemento.<sup>3,5,6</sup> Las hormonas sexuales también juegan un papel en la modulación de la enfermedad, debido a que los estrógenos pueden inhibir la selección negativa de linfocitos B autorreactivos.<sup>1</sup> La exposición a factores ambientales como radiación ultravioleta e infecciones virales como la producida por

el retrovirus tipo C influyen también en la presentación de LES en humanos y perros.<sup>1,3</sup>

La pérdida de la autorregulación inmune resulta en la producción de anticuerpos dirigidos contra componentes celulares de múltiples órganos y tejidos normales, incluyendo la piel.<sup>3</sup>

Una característica del LES es el desarrollo de autoanticuerpos contra antígenos del núcleo celular, llamados anticuerpos antinucleares (ANA). En perros los antígenos nucleares son proteínas como histonas y ribonucleoproteínas.<sup>3,22</sup>

Para la producción de ANA, se requiere de la colaboración entre los linfocitos B autorreactivos y células T antígeno específico. Estas últimas reconocen los antígenos nucleares y se da una activación de estos linfocitos T, los cuales van a proliferar, producir y secretar citocinas para la activación y diferenciación de linfocitos B autorreactivos.<sup>27</sup>

En la histopatología de médula ósea se observan núcleos fagocitados, dando lugar a estructuras denominadas células de lupus eritematoso o células LE.<sup>3</sup>

Los signos clínicos más frecuentes son poliartritis (90% de los casos), anemia, trombocitopenia, estomatitis, glomerulonefritis y dermatitis (20-30% de los casos).<sup>3,6,22,23,24</sup>

En la patogenia de las lesiones cutáneas esta involucrada la radiación solar, la cual induce que los queratinocitos trasloquen y expresen en su superficie antígenos (ADN y/o proteínas) nucleares, de este modo anticuerpos específicos contra estos antígenos se unen a los queratinocitos induciendo necrosis de estos, por medio de citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Los queratinocitos dañados liberan

citocinas que promueven la infiltración de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos.<sup>1,22</sup>

Las lesiones macroscópicas se presentan principalmente en el puente de la nariz y región periorbitaria, así como orejas y piel de miembros torácicos y pelvianos. Estos consisten en eritema, costras, despigmentación y alopecia, así como vesículas y úlceras.<sup>1.3.5.6</sup>

Las lesiones microscópicas de la piel son dermatitis de interfase, compuesta por histiocitos, linfocitos y células plasmáticas; hay degeneración hidrópica de los queratinocitos basales, incontinencia pigmentaria, formación de hendiduras o vesículas entre la dermis y epidermis, puede ser prominente la degeneración mucinosa; en las lesiones crónicas se observa engrosamiento de la membrana basal y pueden ocurrir depósitos fibrinoides alrededor de los vasos sanguíneos.<sup>1,3,5,6,22,28</sup> Otras lesiones son hiperqueratosis orto y paraqueratósica, acantosis, disqueratosis, atrofia de anexos cutáneos y fibrosis dérmica. A menudo están involucrados los folículos pilosos.<sup>22</sup>

## **Lupus eritematoso discoidal**

Es una variante leve y poco frecuente de LES.<sup>3</sup> Se ha descrito principalmente en los humanos, perros, caballos y gatos.<sup>3,22,29</sup> Constituye aproximadamente el 0.3% de las dermatosis caninas diagnosticadas en la Universidad de Cornell, Nueva York. No hay predisposición de edad ni género.<sup>5</sup> Sin embargo, hay una marcada predilección por Collie y sus cruza, Pastor alemán, Husky siberiano y Pastor de Shetland.<sup>1,3,5,6,30</sup>

Al igual que en el LES, la exposición a luz ultravioleta está involucrada en la patogenia de la enfermedad.<sup>1</sup>

Las lesiones macroscópicas se localizan en la piel de la cara (plano nasal) y consisten en despigmentación, eritema, erosión, úlceras, descamación y costras.<sup>1,3,5,6,30,31</sup> También se observa pododermatitis e hiperqueratosis nasodigital.<sup>5,22</sup>

Microscópicamente se observa degeneración hidrópica de células basales y dermatitis de interfase liquenoide compuesta por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, también puede haber incontinencia pigmentaria, degeneración mucinosa de la dermis y pústulas subcorneales.<sup>1,3,5,6,30,31</sup>

## **Diagnóstico de lupus eritematoso**

El diagnóstico definitivo de LE es complejo y requiere de la historia clínica, examen físico, prueba de ANA, prueba de células LE, histopatología e inmunofluorescencia o inmunohistoquímica.<sup>1</sup>

En la prueba de los ANA, los anticuerpos son detectados por inmunofluorescencia y se observan ANA en 97 al 100 % de los perros con LES, en contraste el LED es negativo a esta prueba.<sup>1,3,23,25</sup>

La histopatología de las lesiones cutáneas por LE son características de estas enfermedades.<sup>1,25</sup>

En LES además de las lesiones cutáneas se puede encontrar en la médula ósea y a veces en la capa leucocitaria de la sangre las denominadas células de LE, que son neutrófilos que fagocitaron núcleos de células muertas.<sup>1,3,23</sup>

Con la inmunofluorescencia o inmunohistoquímica es posible detectar IgG, IgA, IgM o C<sub>3</sub> a todo lo largo de la membrana basal de la piel, estos depósitos conforman lo que se denomina banda de lupus.<sup>1,3,5,6,25</sup>

### **Pronóstico de lupus eritematoso**

El pronóstico de LES es impredecible. Por ejemplo: Los perros con enfermedad articular, cutánea o muscular suelen responder a la medicación, mientras que los perros con anemia hemolítica severa o trombocitopenia pueden no responder satisfactoriamente al tratamiento (glucocorticoides) y requieren otras drogas inmunomoduladoras y/o esplenectomía.<sup>1</sup>

El pronóstico de LES es impredecible.<sup>1,30</sup>

### **Tratamiento de lupus eritematoso**

El tratamiento de LES debe ser individualizado, el agente inicial son los glucocorticoides sistémicos, en caso de que no respondan los pacientes es necesario utilizar azatioprina y clorambucilo. La esplenectomía es necesaria en pacientes con anemia o trombocitopenia.<sup>1,3</sup> En el tratamiento de LED se utilizan bloqueadores solares y glucocorticoides tópicos.<sup>1,30,31</sup>

## **JUSTIFICACIÓN**

El diagnóstico preciso de las enfermedades autoinmunes de piel, permite al clínico establecer un pronóstico y tratamiento específico para pénfigo o lupus eritematoso. Por lo que la inmunohistoquímica es un método diagnóstico necesario, sensible y específico, para identificar dermatopatías autoinmunes en perros domésticos, además de ser más estable y menos perecedera que la inmunofluorescencia directa.

## **HIPÓTESIS**

La inmunohistoquímica es un método diagnóstico que confirmará aquellos casos compatibles por histopatología con pénfigo y lupus eritematoso.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la utilidad de la inmunohistoquímica en el diagnóstico de pénfigo y lupus eritematoso en perros.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar las lesiones microscópicas de pénfigo y lupus eritematoso en muestras de piel remitidas al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.
2. Estandarizar y utilizar la técnica de inmunohistoquímica para establecer el diagnóstico de pénfigo y lupus eritematoso.
3. Determinar la frecuencia de lupus eritematoso y pénfigo en secciones de piel de perros remitidas al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.
4. Establecer la correlación entre casos diagnosticados como dermatopatía autoinmune en secciones procesadas por el método convencional de histología y por inmunohistoquímica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo corresponde a un estudio retrospectivo, observacional, descriptivo, comparativo y transversal. Se utilizaron casos pertenecientes al acervo del servicio de diagnóstico del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se seleccionaron 28 biopsias de piel de perro incluidas en parafina con lesiones microscópicas y diagnósticos sugerentes a pénfigo o lupus eritematoso, entre los años 2001 al 2004.

### **Evaluación de las lesiones microscópicas**

Las biopsias de piel de perro incluidas en parafina fueron cortadas a 5 µm de grosor en un microtomo<sup>1</sup>, realizando 2 cortes seriados, uno de los cuales fue teñido con la técnica de rutina de hematoxilina y eosina<sup>32</sup> para su observación microscópica y el otro corte se procesó por inmunohistoquímica (IHQ).

### **Método de inmunohistoquímica<sup>33</sup>**

#### **Anticuerpo primario**

Se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo **Anti-IgG canino<sup>2</sup>** a una dilución 1/250.

---

<sup>1</sup> Leica Instruments, Modelo 820, Catálogo 5991006 Nussloch, Germany

<sup>2</sup> Bidesign Internacional, Catálogo W991142 Industrial Park Road, Saco, Maine 04071 USA

### **Anticuerpo secundario**

Se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo de origen caprino<sup>3</sup> marcado con biotina, aplicando 50 µl sobre el tejido.

De las muestras de piel incluidas en parafina, se realizó un corte de 5 µm de grosor. Los cortes histológicos se montaron en portaobjetos tratados previamente con la solución adhesiva Poli-L-Lysina<sup>4</sup> al 1%. Las secciones se desparafinaron en una estufa<sup>5</sup> a 60 °C por 2 horas. Posteriormente, los tejidos se sumergieron inmediatamente en xilol, realizando dos lavados de 30 minutos cada uno y después acetona realizando dos lavados de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente (TA). Para la rehidratación de los tejidos, las laminillas se sumergieron de forma progresiva en alcohol etílico a diferentes concentraciones: (100, 96, 80 y 50%), realizando 3 lavados de 3 minutos cada uno, por cada concentración de alcohol etílico y finalmente se sumergieron en agua destilada, realizando 3 lavados de 5 minutos cada uno a TA.

Para inhibir la peroxidasa endógena de los tejidos, las secciones se trataron con peróxido de hidrógeno 30%<sup>6</sup> y metanol absoluto<sup>7</sup> en una relación 1:8 realizando dos incubaciones de 30 minutos cada uno a TA. Posteriormente se hicieron lavados con solución amortiguada de fosfatos (PBS) con pH de 7.2, realizando 3 lavados de 5 minutos cada uno a TA.

---

<sup>3</sup> Zymed Laboratories Inc. Catálogo 95-6143 San Francisco, CA 94080 USA

<sup>4</sup> Sigma-Aldrich Co. Catálogo P8920 St. Louis, MO 14508 USA

<sup>5</sup> Chicago Surgical and Electrical Co. Catálogo 200 No. serial 1065 Melrose Park, Illinois USA

<sup>6</sup> JT Baker, Catálogo 218601 Estado de México, México

<sup>7</sup> Técnica Química, Catálogo A1760 D.F. México

Para la recuperación de antígenos, se aplicó a los tejidos 50 µl de pronasa al 0.1% (0.05 g de Proteasa<sup>8</sup> + 50 mL Tris Buffer) incubados en cámara húmeda por 10 minutos a 37 °C en estufa<sup>9</sup>. Para detener esta reacción enzimática, las muestras se sumergieron en PBS realizando dos cambios de 5 minutos cada uno a TA.

Para bloquear la avidina y biotina endógenas de los tejidos, se utilizó un compuesto de tipo comercial con dos soluciones<sup>10</sup>. La primera solución estuvo dirigida para bloquear la avidina endógena y consistió en aplicar 50 µL de solución de avidina sobre los tejidos, incubando por 45 minutos en cámara húmeda a TA y después se realizaron 3 lavados con PBS de 3 minutos cada uno a TA. La segunda solución dirigida para bloquear la biotina endógena se aplicó 50 µl de solución de biotina incubando en cámara húmeda a TA y posteriormente se decantó la solución.

Para bloquear la unión no específica del anticuerpo secundario a proteínas tisulares, se utilizó suero de cabra no inmune<sup>11</sup>, aplicando 50 µl sobre las muestras, e incubando por 1 hora en cámara húmeda a TA.

Posteriormente se aplicó 50 µl a cada tejido de anticuerpo primario, diluido en PBS + leche al 0.05% a una dilución de 1/250, homogenizado con vórtex<sup>12</sup>. Los tejidos se incubaron por una hora en cámara húmeda a 37 °C en estufa<sup>13</sup>. Para el primer testigo negativo se sustituyó el anticuerpo primario por PBS y para el segundo testigo negativo se aplicó el anticuerpo primario con la misma dilución, posterior a la incubación, los tejidos se retiraron de la estufa, se decantó el anticuerpo primario

---

<sup>8</sup> Sigma Chemical Co. Catálogo P-5147 St. Louis, MO 14508 USA

<sup>9</sup> Felisa, Modelo FE-291A No. serie \*0301077 Guadalajara, Jalisco México

<sup>10</sup> Endogenous Avidin/Biotin Kit. Zymed Laboratorios Inc. San Francisco, CA 94080 USA

<sup>11</sup> Zymed Laboratorios Inc. Catálogo 95-6543 San Francisco, CA 94080 USA

<sup>12</sup> Labnet Internacional, Inc. Modelo S0100, No. serie 30703064 Dubuque, Iowa 52001 USA

<sup>13</sup> Felisa, Modelo FE-291A No. serie \*0301077 Guadalajara, Jalisco México

y PBS (en caso del primer testigo negativo) y finalmente fueron sometidos a 3 lavados por 5 minutos cada uno a TA.

Se aplicó 50 µl a cada tejido del anticuerpo secundario de origen caprino anti-conejo marcado con biotina y se incubaron por 90 minutos en cámara húmeda a TA. Se eliminó el anticuerpo secundario por decantación y se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno a TA.

Se aplicaron 50 µL de la estreptoavidina<sup>14</sup> a cada tejido y se dejó incubar en cámara húmeda durante 30 minutos a TA. Posteriormente se decantó la estreptoavidina y se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno a TA.

Para la preparación del cromógeno se agregaron 50 µl de cada uno de las sustancias incluidas en el paquete de reactivos comerciales<sup>15</sup> [sustrato de amortiguador concentrado, el cromógeno AEC (aminoetilcarbazol) y 0.6% de peróxido de hidrógeno], a 1 mL de agua destilada y se homogenizó con vórtex. A cada laminilla se aplicaron 50 µL, revelando en 50 segundos a 1 minuto. Enseguida se realizó un lavado suave con agua destilada sobre cada laminilla y se sumergieron las laminillas nuevamente en agua destilada. Las secciones de contratiñeron con hematoxilina de Meyer<sup>16</sup>, aplicando 50 µl en cada muestra dejándola actuar por 4 minutos y después se les dio un lavado en agua destilada por 5 minutos.

Finalmente, se les aplicó a cada laminilla un cubreobjetos sellándolas con resina hidrosoluble<sup>17</sup>.

---

<sup>14</sup> Zymed Laboratories Inc. Catálogo 95-6543B San Francisco, CA 94080 USA

<sup>15</sup> Zymed Laboratories Inc. Catálogo 00-02007 San Francisco, CA 94080 USA

<sup>16</sup> Zymed Laboratories Inc. Catálogo 008001 San Francisco, CA 94080 USA

<sup>17</sup> Zymed Laboratories Inc. Catálogo 95-6543 San Francisco, CA 94080 USA

### **Tejidos utilizados como testigos**

- a) **Testigo positivo:** Se utilizó una sección de piel que fue positiva para pénfigo foliáceo a través de la técnica de inmunohistoquímica (Figuras 1 y 2). (Esta muestra fue donada por el Dr. Alfonso López Mayagoitia de la Universidad de la Isla del Príncipe Eduardo, Canadá.)
- b) **Testigos negativos:** se utilizaron dos testigos negativos, el primero corresponde a la sección de piel positiva a pénfigo foliáceo por IHQ, a la cual se le cambió el anticuerpo primario por PBS (Figura 3). Para el segundo, se utilizó una sección de piel sana, a la cual se le aplicó el anticuerpo primario (Figuras 4 y 5).

### **Análisis de resultados**

Para la evaluación de la inmunopositividad de cada caso se utilizó microscopio óptico<sup>18</sup>. Una reacción positiva se determinó al observar gránulos rojos en el espacio intercelular de la porción basal o superficial y/o en la membrana basal de la epidermis.

### **Estudio retrospectivo**

A partir de los 28 casos elegidos, se determinó cuantos casos fueron positivos por medio de inmunohistoquímica a pénfigo o lupus eritematoso; además, de los casos positivos a pénfigo, cuantos casos corresponden a cada variante, así como raza,

---

<sup>18</sup> Cambridge Instruments Inc. Modelo 1982 No. serial 10497-0 Buffalo, NY 14215 USA

género y edad de los perros positivos por esta técnica. Los resultados obtenidos se presentan en cuadros de frecuencias.

## **RESULTADOS**

Como producto del estudio retrospectivo que se realizó de los casos sospechosos a las dermatosis autoinmunes, se seleccionaron 28 casos con lesiones histomorfológicas sugerentes a pénfigo y lupus eritematoso que se sometieron a la técnica de inmunohistoquímica avidina-biotina-peroxidasa, encontrándose que el 57.14 % (16 casos) presentaron inmunopositividad.

### **Resultados histopatológicos**

En la evaluación de las lesiones histológicas de los 28 casos, las lesiones que fueron compatibles únicamente con pénfigo foliáceo fueron 7 casos (25%), aquellos que fueron sugerentes de pénfigo vulgar fueron 3 casos (10.71%), los casos cuyas lesiones fueron compatibles con lupus eritematoso fue de 10 casos (35.71%) y los que compartían lesiones compatibles con lupus y pénfigo fueron 8 casos (28.57%).

### **Inmunohistoquímica**

Los 16 casos (57.14%) positivos por esta técnica, presentaron una distribución de inmunoglobulinas diferente.

La reacción positiva se localizó en el espacio intercelular de la porción superficial de la epidermis en 8 casos (50%), los cuales fueron consistentes con pénfigo foliáceo (Figuras 6 y 7); en el espacio intercelular de la porción basal de la epidermis esta reacción se observó en 5 casos (31.25%), los cuales fueron consistentes con pénfigo vulgar (Figuras 8 y 9); en el espacio intercelular y

membrana basal de la epidermis se observó en 2 casos (12.5%), correspondiendo a pénfigo eritematoso (Figuras 10 y 11); en la membrana basal de la epidermis fue en 1 caso (6.25%), el cual fue consistente con lupus eritematoso (Figuras 12 y 13) (Cuadro 1).

De todos los casos positivos, 7 (43.75%) fueron hembras y 9 (56.25%) fueron machos (Cuadro 2). En cuanto a las razas afectadas están: Pastor alemán 6 casos (37.5%), Rottweiler 2 casos (12.5%), Chow chow 2 casos (12.5%), Bull terrier 1 caso (6.25%), Alaska 1 caso (6.25%), Schnauzer miniatura 1 caso (6.25%), Dogo argentino 1 caso (6.25%), Dachshund 1 caso (6.25%) y Doberman 1 caso (6.25%) (Cuadro 3). El rango de edad de los perros afectados oscila entre 1 y 9 años, observándose que en perros de 1 año hubo 1 caso (6.25%), perros de 2 años, 1 caso (6.25%), perros de 3 años, 5 casos (31.25%), perros de 4 años, 1 caso (6.25%), perros de 5 años, 4 casos (25%), perros de 6 años, 2 casos (12.5%), perros de 7 años, 1 caso (6.25%) y perros de 9 años 1 caso (6.25%) (Cuadro 4).

En relación al género de los 8 casos positivos a pénfigo foliáceo, 4 casos (50%) fueron hembras y 4 casos (50%) fueron machos (Cuadro 5). En cuanto a las razas afectadas fueron: Pastor alemán 3 casos (37.5%), Chow chow 2 casos (25%), Bull terrier 1 caso (12.5%), Schnauzer miniatura 1 caso (12.5%) y Dogo argentino 1 caso (12.5%) (Cuadro 6). El rango de edad de los perros afectados fue de 3 a 9 años mostrando de 3 años 4 casos (50%), 5 años 2 casos (25%), 6 años 1 caso (12.5%) y 9 años 1 caso (12.5%) (Cuadro 7).

En relación al género de los 5 casos positivos a pénfigo vulgar, 4 casos (80%) fueron machos y 1 caso (20%) fue hembra (Cuadro 8).

En cuanto a las razas hubo 3 casos (60%) en Pastor alemán, 1 caso (20%) en Dachshund y 1 caso (20%) en Rottweiler (Cuadro 9). El rango de edad mostrado fue de 3 a 7 años encontrándose 1 caso (20%) de 3 años, 1 caso (20%) de 4 años, 1 caso (20%) de 5 años, 1 caso (20%) de 6 años y 1 caso (20%) de 7 años (Cuadro 10).

De los 2 casos positivos a pénfigo eritematoso, en relación al género los dos (100%) fueron hembras (Cuadro 11). Las razas afectadas fueron 1 Rottweiler (50%) y un Doberman (50%) (Cuadro 12). Las edades fueron de 1 caso (50%) de un año y 1 caso de 2 años (50%) (Cuadro 13).

En cuanto a la raza, género y edad del caso positivo a lupus eritematoso fue un Alaska, macho de 5 años (Cuadro 14).

## DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados del estudio inmunohistoquímico, el 57.14% de los casos fueron positivos a esta técnica, este porcentaje es menor a los estudios realizados por Haines *et al.*<sup>34</sup> sin embargo, Bradley *et al.*<sup>35</sup> obtuvieron un porcentaje similar (59%) al que se realizó en este estudio. En 1987, Haines *et al.* realizaron en el Departamento de Patología de la Universidad de Saskatchewan, Canadá un estudio en donde se incluyeron 47 casos de perros donde 28 de ellos tuvieron lesiones sugerentes a enfermedad autoinmune por histopatología. Se les realizó la técnica de inmunohistoquímica aplicando el método estreptoavidina-biotina-peroxidasa, utilizando un anticuerpo anti-IgG canino de origen de conejo; el 96.42% (27 casos) fueron positivos a esta técnica.<sup>34</sup>

Cabe mencionar también que Bradley *et al.* usaron un anticuerpo anti-IgM canina y observaron reacciones positivas en un solo caso (4.5%) lo que sugiere que en enfermedades autoinmunes es más conveniente usar anticuerpos contra IgG. Esto se debe a que la IgM es importante durante la respuesta inmune primaria y es mínima la cantidad de esta inmunoglobulina en el suero durante la respuesta inmune secundaria con respecto a la IgG que es la que predomina.<sup>36</sup> Asimismo, Pérez *et al.*<sup>37</sup> utilizaron un anticuerpo anti-IgM canino en 23 biopsias de piel de perro y obtuvo positividad en dos casos (8.6%).

Las muestras de piel tampoco fueron evaluadas para la detección de C<sub>3</sub> no obstante, la contribución de C<sub>3</sub> en las enfermedades cutáneas autoinmunes es mínima y ocurre sólo en áreas de acantolisis y esta siempre acompañada por la presencia de IgG o IgM.<sup>38</sup>

Pérez *et al.* en 2002 utilizaron 23 biopsias de piel de perro con lesiones sugerentes a dermatosis inmunomediada y los sometió a inmunohistoquímica por el método ABC; este autor además de usar anti-IgM canina, también utilizó anticuerpos monoclonales y policlonales (anti-IgG canino), el porcentaje de reactores positivos con la utilización de ambos anticuerpos fue mayor (85.7 a 100%).<sup>37</sup>

Un aspecto crítico en la técnica de inmunohistoquímica fue la recuperación antigénica, la cual se efectuó por medio de pronasa al 0.1%. El tratamiento de los tejidos con esta enzima es esencial para restablecer la antigenicidad de los depósitos de inmunoglobulina.<sup>36</sup> Otra enzima que puede utilizarse para este propósito es la tripsina al 0.25%.<sup>34,35</sup>

La distribución de las reacciones positivas en el espacio intercelular de la epidermis y/o membrana basal fue útil para diferenciar los diferentes tipos de pénfigo y entre pénfigo y lupus eritematoso.<sup>7,34,35,36</sup> La distribución en el espacio intercelular en la epidermis superficial es un patrón consistente con pénfigo foliáceo.<sup>7,16,34,35,36</sup> La distribución en el espacio intercelular en la epidermis profunda es consistente con pénfigo vulgar.<sup>22,34,35,36</sup> En el caso de pénfigo eritematoso la reacción positiva se localiza en el espacio intercelular y membrana basal.<sup>7,20,34,35,36</sup> En lupus eritematoso se localiza en la membrana basal.<sup>22,34,35,36</sup>

En cuanto a la frecuencia de las diferentes presentaciones de pénfigo, el pénfigo foliáceo es la más numerosa, seguida de pénfigo vulgar, en tercer lugar se encuentra el pénfigo eritematoso y por último esta el pénfigo vegetante.<sup>1,2,4,7,10,14,15,16,34,35,36</sup> Lo antes mencionado coincide con los resultados obtenidos en este trabajo, presentándose pénfigo foliáceo en el 50% de los casos

(8 casos), seguido de pénfigo vulgar con el 31.25% (5 casos), el 12.5% (2 casos) corresponde a pénfigo eritematoso.

El lupus eritematoso es la segunda enfermedad cutánea autoinmune más diagnosticada después del complejo pénfigo.<sup>5</sup> No obstante, el número de casos positivos en este estudio fue menor al referido por Haines *et al.*, Bradley *et al.* y Pérez *et al.*<sup>34,35,36</sup>

La literatura refiere que en pénfigo vulgar y pénfigo vegetante no hay predisposición de raza, edad o género.<sup>1,2,4,6,7,14</sup> En este trabajo se muestra que la raza afectada con más frecuencia por pénfigo vulgar fue el Pastor alemán en 60% de los casos, los machos eran más afectados (80%) que las hembras y no se observó predisposición por edad.

En el pénfigo foliáceo y el pénfigo eritematoso no hay predisposición por edad o género, sin embargo, hay predisposición por algunas razas.<sup>1,4,6,7,16,18</sup> En el presente estudio la raza Pastor alemán 37.5% (3 casos) fue más afectada con pénfigo foliáceo, raza que cita la literatura es más afectada por pénfigo eritematoso.<sup>1,4,6,7</sup> Además, en pénfigo foliáceo se detectó mayor incidencia en perros de 4 años y no hubo predisposición por género. En cuanto a pénfigo eritematoso no se observó evidencia de predilección por raza, y la edad de presentación fue de 1 y 2 años.

En el lupus eritematoso no hay predisposición por género, edad, pero si hay algunas razas afectadas, principalmente Collie, Pastor de Shetland y Pastor alemán.<sup>1,3,5,6,22,30</sup> El único caso de lupus eritematoso fue un Alaska, macho de 5 años; cabe mencionar que no hay informes de esta enfermedad en la raza mencionada.

Referente a los casos negativos, algunos mostraron depósitos de inmunoglobulina sin embargo, no se observaban en el espacio intercelular de la epidermis y/o en membrana basal en un patrón característico descrito para el complejo pénfigo o LE.<sup>35</sup> Los factores que pueden estar involucrados en los casos negativos están: selección inapropiada del sitio anatómico para tomar la muestra, la toma de biopsias de piel ulcerada o con infecciones bacterianas secundarias, remitir biopsias de piel de pacientes con antecedentes de terapia inmunosupresora, tiempo de fijación de las muestras con formalina y las lesiones histopatológicas tienen diagnósticos diferenciales con enfermedades que no son de tipo autoinmune.<sup>35,39</sup>

Es importante establecer que se debe realizar una evaluación histopatológica de las muestras, antes de someterlos a inmunohistoquímica, para verificar que el tipo de lesiones son sugerentes a una dermatosis inmunomediada.<sup>34,35,39</sup> Sin embargo, hay casos cuyas lesiones histológicas cutáneas coinciden con enfermedades que no son de tipo autoinmune y por lo cual el diagnóstico inmunohistoquímico representa una herramienta indispensable para el diagnóstico de las dermatopatías autoinmunes.<sup>4,5,7,22</sup>

Para el clínico, el diagnóstico certero de pénfigo y lupus eritematoso es necesario, debido a que podrá establecer un tratamiento específico contra la dermatopatía autoinmune identificada, además podrá sugerir un pronóstico clínico entre los diferentes tipos de pénfigo o entre pénfigo y lupus eritematoso, ya que estas varían con la forma y severidad de la enfermedad.<sup>1,4,5,21</sup>

## CONCLUSIONES

1. Fue posible detectar autoanticuerpos (IgG) por la técnica de inmunohistoquímica en los casos sospechosos diagnosticados por histopatología.
2. La distribución de la inmunopositividad en la epidermis y/o membrana basal aunado a las lesiones histopatológicas fue de utilidad para diferenciar las presentaciones de pénfigo o entre pénfigo y lupus eritematoso.
3. La enfermedad autoinmune que más se presentó fue el pénfigo foliáceo, lo cual coincide con la literatura.
4. La raza más afectada por dermatosis inmunomediadas detectada en este estudio fue el Pastor Alemán y no hubo predilección aparente en género y edad.
5. La técnica de inmunohistoquímica es una herramienta necesaria para realizar un diagnóstico adecuado de pénfigo y lupus eritematoso, esto permite al clínico establecer un tratamiento específico para las dermatosis autoinmunes.

## REFERENCIAS

1. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Immunologic skin disease en: Muller and Kirk's small animal dermatology. 5<sup>th</sup> edition. Philadelphia; WB Saunders Company, 1995. pp. 556-588.
2. Tizard IR. Organ specific autoimmune diseases en: Veterinary immunology. An introduction. 6<sup>th</sup> edition. Philadelphia; WB Saunders Company, 2000. pp. 375-377.
3. Tizard IR. The systemic immunological diseases en: Veterinary immunology. An introduction. 6<sup>th</sup> edition. Philadelphia; WB Saunders Company, 2000. pp. 386-390.
4. Scott DW, Walton DK, Slater MR, Smith CA, Lewis RM. Immune-mediated dermatosis in domestic animals: Ten years after-Part I. Comp Cont Educ 1987; 9:424-435.
5. Scott DW, Walton DK, Slater MR, Smith CA, Lewis RM. Immune-mediated dermatosis in domestic animals: Ten years after-Part II. Comp Cont Educ 1987; 9:539-551.
6. Yager JA, Scott DW. The skin appendages en: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N (eds). Pathology of domestic animals, vol. I. 4<sup>th</sup> edition. New York; Academic Press, 1993. pp. 617-623.
7. Lee GT. Superficial pustular diseases of the epidermis en Veterinary dermatopathology St. Louis; Mosby, 1992. pp. 16-20.
8. Wilkinson JE *et al.* Role of plasminogen activator in pemphigus vulgaris. Am J Pathol 1989; 134:561-569.

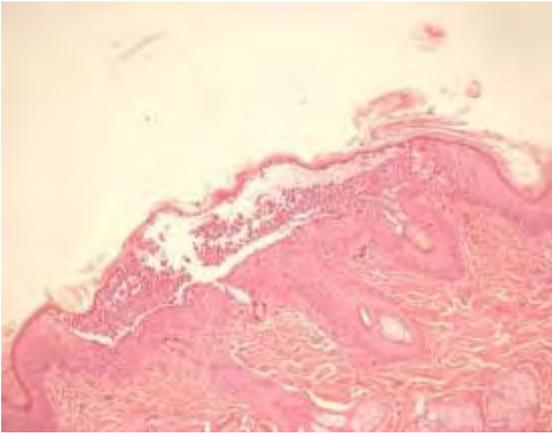
9. Stannard AA, Gribblw DH, Baker BB. A mucocutaneous disease in the dog, resembling pemphigus vulgaris in man. *JAVMA* 1975; 166:575-584.
10. Hurvitz AI, Feldman E. A disease in dogs resembling human pemphigus vulgaris: case reports. *JAVMA* 1975; 166:585-590.
11. Scott DW, Manning TO, Smith CA, Lewis RM. Pemphigus vulgaris without mucosal or mucocutaneous involvement in two dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 1982; 18:401-404.
12. Olivry T, Ihrke PJ, Atlee BA. Pemphigus vulgaris lacking mucosal involvement in a german sheperd dog: possible response to heparin therapy. *Vet Dermatol* 1992; 3:79-84.
13. Suter MM, Wilkinson JE, Dougherty AA, Lewis RM. Ultrastructural localization of pemphigus vulgaris antigen on canine keratinocytes in vivo and in vitro. *Am J Vet Res* 1990; 51:507-511.
14. Scott DW. Pemphigus vegetans in a dog. *Cornell Vet* 1977; 67:374-384.
15. Halliwell EW, Goldschmidt MH. Pemphigus foliaceus in the canine: a case report and discussion. *J Am Anim Hosp Assoc* 1977; 13:431-436.
16. Ihrke PJ, Stannard AA, Ardans AA, Griffin CE. Pemphigus foliaceus in dogs: a review of 37 cases. *JAVMA* 1985; 186:59-66.
17. Ihrke PJ, Stannard AA, Ardans AA, Griffin CE, Kallet AJ. Pemphigus foliaceus of the footpads in three dogs. *JAVMA* 1985; 186:67-69.
18. Noxon JO, Myers RK. Pemphigus foliaceus in two Shetland Sheepdog littermates. *JAVMA* 1989; 194:545-546.

19. Bennett D, Kelly DF, Kirkham D, Edgars A. Two cases of pemphigus erythematosus (the Senear-Usher syndrome) in the dog. *J Small Anim Pract* 1985; 26:219-227.
20. Scott DW, Miller WH, Lewis RM, Manning TO, Smith CA. Pemphigus erythematosus in the dog and cat. *J Am Anim Hosp Assoc* 1980; 16:815-823.
21. Rosenkrantz WS. Pemphigus: current therapy. *Vet Dermatol* 2004; 15:90-98.
22. Lee GT. Bullous and vesicular diseases of the epidermis and dermal-epidermal junction en: *Veterinary dermatopathology*. St. Louis; Mosby, 1992. pp. 22-33.
23. Grindem CB, Johnson KH. Systemic lupus erythematosus: literature review and report of 42 new canine cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 1983; 19:489-503.
24. Jones DRE. Canine systemic lupus erythematosus: new insights and their implications. *J Comp Path* 1993; 108:215-228.
25. Scott DW, Walton DK, Manning TO, Smith CA, Lewis RM. Canine lupus erythematosus. I. Systemic lupus erythematosus. *J Am Anim Hosp Assoc* 1983; 19:461-479.
26. Hubert B, Teichner M, Fournel C, Monier JC. Spontaneous familial systemic lupus erythematosus in a canine breeding colony. *J Comp Path* 1988; 98:81-89.

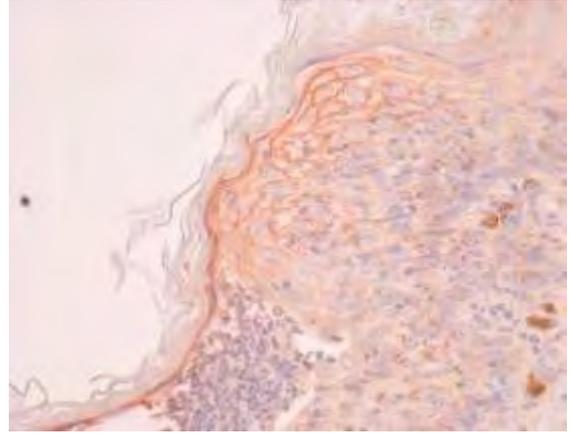
27. Kawamoto M, Harigai M, Hara M, Kawaguchi Y, Tezuka K, Tanaka M, Sugiura T, Katsumata Y, Fukasawa C, Ichida H, Higami S, Kamatani N. Expression and function of inducible co-stimulator in patients with systemic lupus erythematosus: possible involvement in excessive interferon-gamma and anti-double-stranded DNA antibody production. *Arthritis Res Ther* 2006; 8:R62.
28. Rosenkrantz WS, Griffin CE, Barr RJ, Walder EJ. Histopathological evaluation of acid mucopolysaccharide (mucin) in canine discoid lupus erythematosus. *J Am Anim Hosp Assoc* 1986; 22:577-584.
29. Griffin CE, Stannard AA, Ihrke PJ, Ardans AA, Cello RM, Bjorling DR. Canine discoid lupus erythematosus. *Vet Immunol Immunopathol* 1979 ; 1 :79-87.
30. Scott DW, Walton DK, Manning TO, Smith CA, Lewis RM. Canine lupus erythematosus. II. Discoid lupus erythematosus. *J Am Anim Hosp Assoc* 1983; 19:481-488.
31. Scott DW, Walton DK, Smith CA, Lewis RM. Unusual findings in canine pemphigus erythematosus and discoid lupus erythematosus. *J Am Anim Hosp Assoc* 1984; 20:579-584.
32. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Métodos histotecnológicos. Registro de patología de los Estados Unidos de América. Washington, D. C. 1993.
33. Haines DM, Chelack BJ. Technical considerations for developing enzyme immunochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-

- embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Diagn Invest* 1991; 3:101-112.
34. Haines DM, Cooke EM, Clark EG. Avidin-Biotin-Peroxidase complex immunohistochemistry to detect immunoglobulin in formalin fixed skin biopsies in canine autoimmune skin disease. *Can J Vet Res* 1987; 51:104-109.
35. Bradley GA, Calderwood MB. Immunoperoxidase staining for the detection of autoantibodies in canine autoimmune skin disease; comparison to immunofluorescence results. *Vet Immunol Immunopathol* 1990; 26:105-113.
36. Tizard IR. Antibodies: soluble forms of BCR en: *Veterinary immunology. An introduction*. 6<sup>th</sup> edition. Philadelphia; WB Saunders Company, 2000. pp. 139-148.
37. Pérez J, Arce C, Moreno A, Mozos E, Rodríguez F, Llanes D. Comparison of three monoclonal and three policlonal antibodies in the immunohistochemical diagnosis of canine autoimmune skin diseases. *Vet Dermatol* 2002; 13:231-236.
38. Scott DW, Manning TO, Smith CA, Lewis RM. Observations on the immunopathology and therapy of canine pemphigus and pemphigoid. *JAVMA* 1982; 180:48-52.
39. Day MJ, Hanlon L, Powell LM. Immune-mediated skin disease in the dog and cat. *J Comp Path* 1993; 109:395-407.

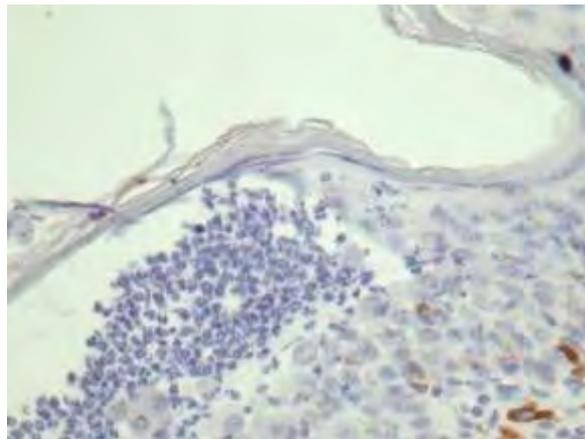
## FIGURAS



**Figura 1.** Testigo positivo: sección histológica de piel con lesiones sugerentes a dermatosis autoinmune. HE. (10X)



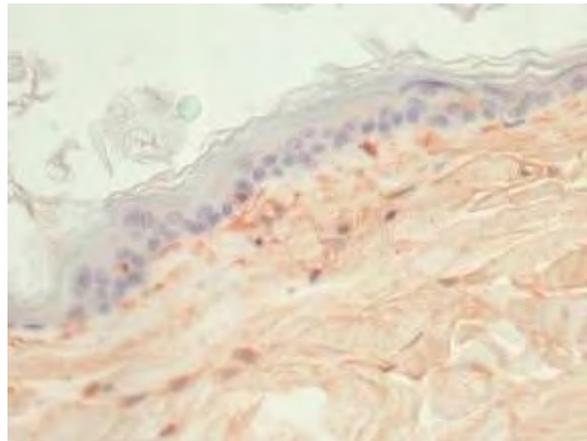
**Figura 2.** Testigo positivo: sección histológica de piel con inmunopositividad en el espacio intercelular de la porción superficial de epidermis. Técnica de inmunohistoquímica (ABC). (40X)



**Figura 3.** Testigo negativo: sección histológica de piel con lesiones sugerentes a dermatosis autoinmune, sin utilizar el anticuerpo primario. Técnica de inmunohistoquímica (ABC). (40X)

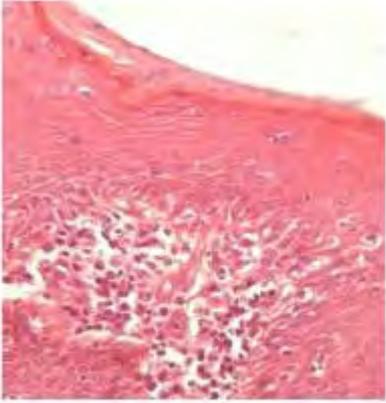


**Figura 4.** Testigo negativo: sección histológica de piel sin lesiones. HE. (40X)

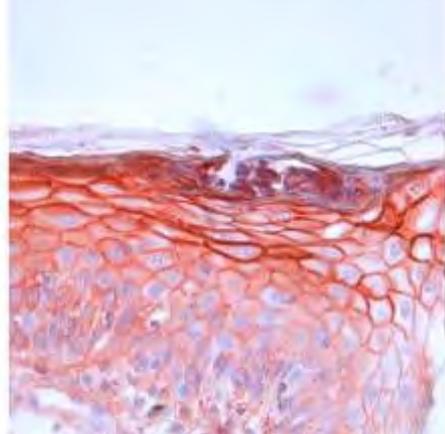


**Figura 5.** Testigo negativo: sección histológica de piel sin lesiones, utilizando el anticuerpo primario. Técnica de inmunohistoquímica (ABC). (40X)

## PÉNFIGO FOLIÁCEO

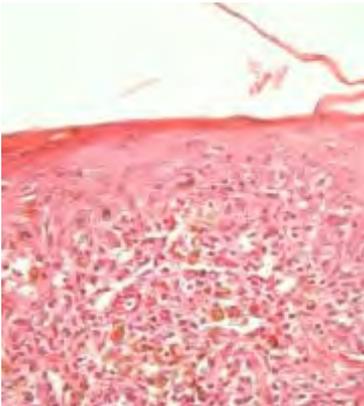


**Figura 6.** Sección histológica de piel con lesiones sugerentes a dermatosis autoinmune. HE. (40x)

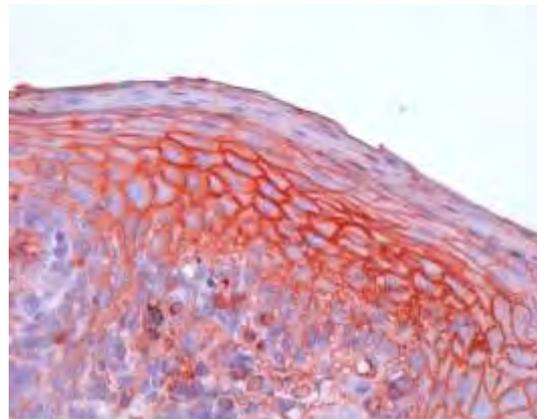


**Figura 7.** Sección histológica de piel que muestra inmunopositividad en el espacio intercelular de la porción superficial de epidermis. Técnica de inmunohistoquímica (ABC). (40x)

## PÉNFIGO VULGAR

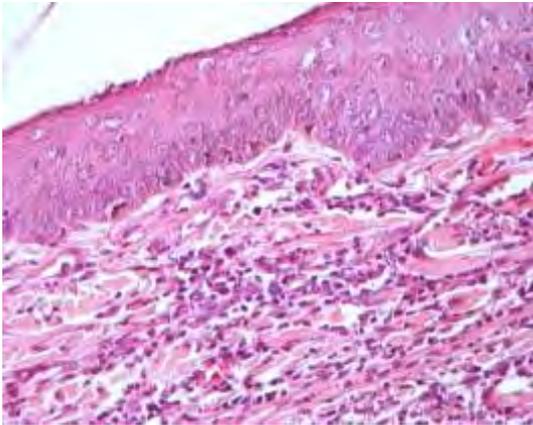


**Figura 8.** Sección histológica de piel con lesiones sugerentes a dermatosis autoinmune. HE. (40x)

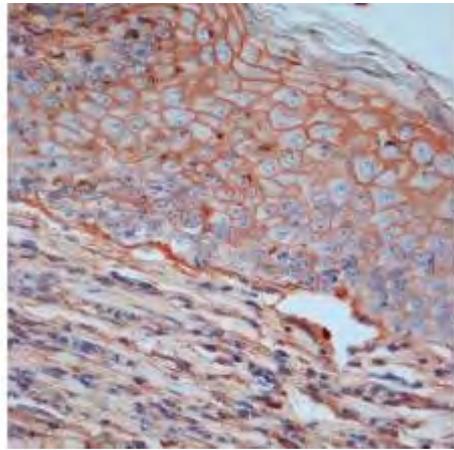


**Figura 9.** Sección histológica de piel que muestra inmunopositividad en la parte basal de la epidermis. Técnica de inmunohistoquímica (ABC). (40x)

## PÉNFIGO ERITEMATOSO

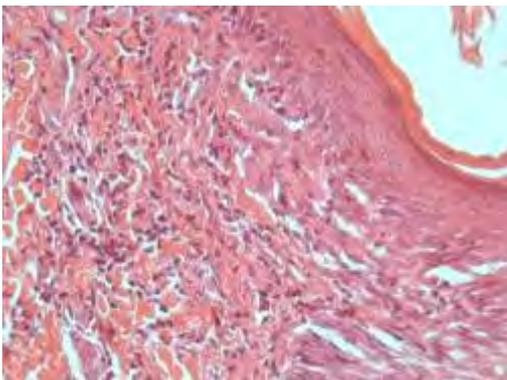


**Figura 10.** Sección histológica de piel con lesiones sugerentes a dermatosis inmunomediada. HE. (40x)

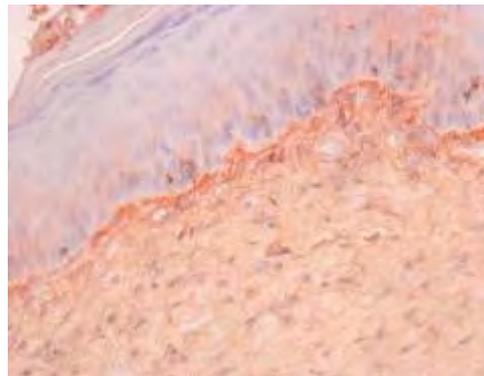


**Figura 11.** Sección histológica de piel que exhibe inmunopositividad en espacio intercelular de epidermis y membrana basal. Técnica de inmunohistoquímica (ABC). (40x)

## LUPUS ERITEMATOSO



**Figura 12.** Sección histológica de piel con lesiones sugerentes a dermatosis autoinmune. HE. (40x)



**Figura 13.** Sección histológica de piel que exhibe inmunopositividad en la membrana basal. Técnica de inmunohistoquímica (ABC). (40x)

## CUADROS

**Cuadro 1. Número de casos y porcentaje de los diferentes tipos de pénfigo y lupus eritematoso diagnosticados por IHQ.**

<b>ENFERMEDAD</b>	<b>CASOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>PÉNFIGO FOLIÁCEO</b>	<b>8</b>	<b>50</b>
<b>PÉNFIGO VULGAR</b>	<b>5</b>	<b>31.25</b>
<b>PÉNFIGO ERITEMATOSO</b>	<b>2</b>	<b>12.5</b>
<b>LUPUS ERITEMATOSO</b>	<b>1</b>	<b>6.25</b>

**Cuadro 2. Número de casos y porcentaje respecto al género de los casos diagnosticados como péufigo por IHQ.**

<b>GÉNERO</b>	<b>CASOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>HEMBRAS</b>	<b>7</b>	<b>43.75</b>
<b>MACHOS</b>	<b>9</b>	<b>56.25</b>

**Cuadro 3. Número de casos y porcentaje de las razas afectadas de los casos diagnosticados por IHQ.**

<b>RAZA</b>	<b>CASOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>PASTOR ALEMÁN</b>	<b>6</b>	<b>37.5</b>
<b>ROTTWEILER</b>	<b>2</b>	<b>12.5</b>
<b>CHOW CHOW</b>	<b>2</b>	<b>12.5</b>
<b>BULL TERRIER</b>	<b>1</b>	<b>6.25</b>
<b>ALASKA</b>	<b>1</b>	<b>6.25</b>
<b>SCHNAUZER MIN.</b>	<b>1</b>	<b>6.25</b>
<b>DOGO ARGENTINO</b>	<b>1</b>	<b>6.25</b>
<b>DACHSHUND</b>	<b>1</b>	<b>6.25</b>
<b>DOBERMAN</b>	<b>1</b>	<b>6.25</b>

**Cuadro 4. Número de casos y porcentaje de las edades afectadas de los casos diagnosticados como pénfigo por IHQ.**

<b>EDAD</b>	<b>CASOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>1 AÑO</b>	<b>1</b>	<b>6.25</b>
<b>2 AÑOS</b>	<b>1</b>	<b>6.25</b>
<b>3 AÑOS</b>	<b>5</b>	<b>31.25</b>
<b>4 AÑOS</b>	<b>1</b>	<b>6.25</b>
<b>5 AÑOS</b>	<b>4</b>	<b>25</b>
<b>6 AÑOS</b>	<b>2</b>	<b>12.5</b>
<b>7 AÑOS</b>	<b>1</b>	<b>6.25</b>
<b>9 AÑOS</b>	<b>1</b>	<b>6.25</b>

**Cuadro 5. Número de casos y porcentaje del género afectado de los casos inmunopositivos a pénéfigo foliáceo.**

<b>GÉNERO</b>	<b>CASOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>HEMBRAS</b>	<b>4</b>	<b>50</b>
<b>MACHOS</b>	<b>4</b>	<b>50</b>

**Cuadro 6. Número de casos y porcentaje de las razas afectadas de los casos inmunopositivos a pénéfigo foliáceo.**

<b>RAZA</b>	<b>CASOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>PASTOR ALEMÁN</b>	<b>3</b>	<b>37.5</b>
<b>CHOW CHOW</b>	<b>2</b>	<b>25</b>
<b>BULL TERRIER</b>	<b>1</b>	<b>12.5</b>
<b>SCHNAUZER MIN.</b>	<b>1</b>	<b>12.5</b>
<b>DOGO ARGENTINO</b>	<b>1</b>	<b>12.5</b>

**Cuadro 7. Número de casos y porcentaje de las edades afectadas de los casos inmunopositivos a pénéfigo foliáceo.**

<b>EDAD</b>	<b>CASOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>3 AÑOS</b>	<b>4</b>	<b>50</b>
<b>5 AÑOS</b>	<b>2</b>	<b>25</b>
<b>6 AÑOS</b>	<b>1</b>	<b>12.5</b>
<b>9 AÑOS</b>	<b>1</b>	<b>12.5</b>

**Cuadro 8. Número de casos y porcentaje del género afectado de los casos inmunopositivos a pénfigo vulgar.**

<b>GÉNERO</b>	<b>CASOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>HEMBRAS</b>	<b>1</b>	<b>20</b>
<b>MACHOS</b>	<b>4</b>	<b>80</b>

**Cuadro 9. Número de casos y porcentaje de razas afectadas de los casos inmunopositivos a pénfigo vulgar.**

<b>RAZA</b>	<b>CASOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>PASTOR ALEMÁN</b>	<b>3</b>	<b>60</b>
<b>DACHSHUND</b>	<b>1</b>	<b>20</b>
<b>ROTTWEILER</b>	<b>1</b>	<b>20</b>

**Cuadro 10. Número de casos y porcentaje de edades afectadas de los casos inmunopositivos a pénfigo vulgar.**

<b>EDAD</b>	<b>CASOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>3 AÑOS</b>	<b>1</b>	<b>20</b>
<b>4 AÑOS</b>	<b>1</b>	<b>20</b>
<b>5 AÑOS</b>	<b>1</b>	<b>20</b>
<b>6 AÑOS</b>	<b>1</b>	<b>20</b>
<b>7 AÑOS</b>	<b>1</b>	<b>20</b>

**Cuadro 11. Número de casos y porcentaje de género afectado de los casos inmunopositivos a pénfigo eritematoso.**

<b>GÉNERO</b>	<b>CASOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>HEMBRAS</b>	<b>2</b>	<b>100</b>
<b>MACHOS</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**Cuadro 12. Número de casos y porcentaje de razas afectadas de los casos inmunopositivos a pénfigo eritematoso.**

<b>RAZA</b>	<b>CASOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>ROTTWEILER</b>	<b>1</b>	<b>50</b>
<b>DOBERMAN</b>	<b>1</b>	<b>50</b>

**Cuadro 13. Número de casos y porcentaje de las edades afectadas de los casos inmunopositivos a pénfigo eritematoso.**

<b>EDAD</b>	<b>CASOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>1 AÑO</b>	<b>1</b>	<b>50</b>
<b>2 AÑOS</b>	<b>1</b>	<b>50</b>

**Cuadro 14. Raza, género y edad del perro afectado por lupus eritematoso.**

<b>RAZA</b>	<b>GÉNERO</b>	<b>EDAD</b>
<b>ALASKA</b>	<b>MACHO</b>	<b>5 AÑOS</b>

## APÉNDICE

### 1. Fórmula para la realización de PBS 5x

A) Fosfato de sodio dibásico <sup>α</sup> .....	5.11 g
B) Fosfato de sodio monobásico <sup>β</sup> .....	1.93 g
C) Cloruro de sodio <sup>γ</sup> .....	37 g

Se colocan las cantidades de las sustancias correspondientes en un matraz, se vierte 1 L de agua destilada, posteriormente se mezcla en un agitador<sup>δ</sup> con ayuda de una mosca y finalmente se ajusta a pH 7.2.

---

<sup>α</sup> Técnica química, S.A. Catálogo F1330, México

<sup>β</sup> J.T. Baker, S.A. de C.V. Catálogo 3818-32, Xalostoc, México

<sup>γ</sup> Merck-México, S.A. Catálogo 7005921578, Naucalpan de Juárez, México

<sup>δ</sup> Thermolyne Modelo SPA1025B, Dubuque, Iowa 52001 USA

## 2. Fórmula para la realización de solución TRIS

A) Tris hidrocloreuro <sup>♦</sup> .....	6.06 g
B) Tris base <sup>*</sup> .....	1.38 g

Se colocan las cantidades de las sustancias correspondientes en un matraz, se vierte 1 L de agua destilada, posteriormente se mezcla en un agitador<sup>δ</sup> con ayuda de una mosca y finalmente se ajusta a pH 7.2.

---

<sup>♦</sup> ICN Biomedicals, Inc. Catálogo 103130 South Chillicothe Road Aurora, Ohio 44202 USA

<sup>\*</sup> Sigma-Aldrich Co. Catálogo T-1503 St. Louis, MO 63178 USA

<sup>δ</sup> Thermolyne Modelo SPA1025B, Dubuque, Iowa 52001 USA

### **3. Fórmulas para la realización de las soluciones amortiguadoras**

A) Hidróxido de sodio 1 M

2 g de NaOH + c.b.p. 50 mL de agua destilada

B) Ácido clorhídrico 1M

2 g de HCl + c.b.p. 50 mL de agua destilada

#### **4. Ajuste del pH de PBS y solución TRIS**

- 1) Para ajustar el pH de PBS y solución TRIS se utiliza potenciómetro<sup>ξ</sup>.
- 2) Verificar que el electrodo contenga la solución de llenado del electrodo.
- 3) Se quita el tapón negro que esta en la parte superior del electrodo y el capuchón que cubre la punta del electrodo, la punta se enjuaga con agua destilada y se seca procurando no tocarla.
- 4) Seleccionar “calibrate”, colocar el electrodo en el amortiguador de pH 7, cuando suene una alarma que indica que el potenciómetro leyó y se calibró a ese pH, se retira el electrodo, se enjuaga y se seca.
- 5) Seleccionar nuevamente “calibrate” para calibrar a pH 4, se coloca el electrodo en el amortiguador de pH 4, cuando suene la alarma, se retira el electrodo, se enjuaga y se seca.
- 6) Seleccionar “calibrate” para calibrar a pH 10, se coloca el electrodo en el amortiguador de pH 10, cuando suene la alarma, se retira el electrodo, se enjuaga y se seca.
- 7) Seleccionar “read”, se coloca el electrodo dentro del PBS o TRIS, cuando suene la alarma, el potenciómetro dará la lectura del pH de la sustancia. Mediante las sustancias amortiguadoras se va regulando el pH hasta llegar a la medida deseada.

---

<sup>ξ</sup> Corning Incorporated Catálogo 476436, No. serial 301660 Corning, NY 14831 USA

8) Se retira el electrodo del PBS o TRIS, se enjuaga y se seca, se coloca el capuchón para cubrir la punta y el tapón negro en la parte superior del electrodo.

### 1. Fórmula para la realización de la pronasa al 0.1%

A) Proteasa<sup>1</sup> .....0.05 g

B) Solución TRIS .....50 mL

---

<sup>1</sup> Sigma Chemical Co. Catálogo P-5147 St. Louis, MO 14508 USA