

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Determinación de receptores para prolactina en células  
epiteliales de folículos pilosos primarios y secundarios  
de piel de alpaca (*Lama pacos*) mediante  
inmunohistoquímica**

TESIS

para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTORA

Cecilia Milagros Sosa Navarro

ASESORES

Alfonso Chavera

Alberto Manchego

Lima – Perú

2006

## I. INTRODUCCIÓN

El Perú es el principal productor de Camélidos Sudamericanos del mundo con más de 4.4 millones de cabezas entre alpacas, llamas, vicuñas y guanacos de los cuales 3' 192, 870 son alpacas (77% Huacaya y 14% Suri). La crianza de alpacas en el Perú está distribuida principalmente en los departamentos de Puno, Cusco, Arequipa y Huancavelica. La explotación de la fibra de alpaca esta bien difundida en la zona altoandina de nuestro país, convirtiéndose en la principal fuente de ingresos para la economía andina.

Desde hace varios años se ha buscado una mayor eficiencia en la producción de fibra de alpaca, de este modo se ha evaluado el aspecto nutricional, fisiológico y reproductivo, encontrándose relaciones directas entre estos y el crecimiento de la fibra. El crecimiento del pelo en ratones y humanos y de la lana en ovejas, está regulado por la presencia y concentración de hormonas endocrinas, entre ellas se tiene a la prolactina. En las ovejas se ha determinado la presencia de receptores hormonales en los folículos primarios y secundarios, sugiriéndose una participación directa de diferentes hormonas en el ciclo de crecimiento de la fibra (Stenn y Paus, 1999). En el ser humano, el pelo crece en ciclos no sincronizados; cada pelo inicia fases del ciclo de crecimiento en tiempos diferentes. Hay tres fases en el ciclo de crecimiento del pelo: anagen, catagen y telogen (Slobodan y Snezana, 1998). Los mecanismos moleculares que son los responsables de este proceso controlado con firmeza aún no están claros, pero en la última década, largo pero limitado número de factores de crecimiento, citoquinas, neuropéptidos, neurotransmisores y hormonas se ha demostrado que juegan papeles regulatorios importantes (Paus y Cotsarelis, 1999; Stenn y Paus, 2001).

La prolactina participa en la regulación de los ciclos de desarrollo del folículo piloso y puede modular directa o indirectamente los ciclos de su crecimiento, caída y muda en animales peludos. Los receptores de prolactina han sido localizados en queratinocitos epidermales y foliculares de rata por hibridación *in situ* (Ouhtit *et al.*, 1993) y en queratinocitos foliculares y fibroblásticos de la papila dermal de la oveja con un ensayo de unión radioligando (Choy *et al.*, 1995). Los lugares de unión de prolactina que exhiben gran afinidad por el ligando fueron identificados en preparaciones de la membrana de piel de visón, la más alta concentración de lugares de unión fue encontrado durante el ciclo de crecimiento del pelaje en invierno (Rose *et al.*, 1995). La actividad de unión del receptor de prolactina y la expresión del gen del receptor de prolactina en piel de ovinos han sido definidos recientemente (Choy *et al.*, 1997). La prolactina y la expresión del receptor de prolactina durante el ciclo piloso murino no estacional, el cual en contraste con la oveja en comparación con el cuero cabelludo del humano reportan que ambos, prolactina y receptor de prolactina son estrictamente restringidos al epitelio del folículo piloso y son fuertemente dependientes del ciclo del pelo (Foitzik *et al.*, 2003). En ovejas los folículos pilosos productores de lana pueden ser inducidos a su crecimiento cíclico manipulando los niveles de prolactina circulante, la cual altera los patrones de expresión de genes relacionados a queratinas de la lana y además, esta prolactina es generada localmente en el folículo piloso y actúa directamente en forma autocrina y paracrina en las ovejas (Pearson *et al.*, 1999).

Por lo tanto, el lugar o lugares de acción de la prolactina en la regulación del crecimiento estacional de la fibra permanecen como una pregunta abierta. Es posible que los efectos diferentes de la prolactina sobre los folículos telógenos y anágenos puedan ser ejercidos por medio de diferentes células blanco (Choy *et al.*, 1997). Todos estos estudios nos indican que existe una regulación en el crecimiento del pelo o lana de tipo endocrino hormonal, y que también debe existir este control en el crecimiento de la fibra de la alpaca.

El presente trabajo tiene entonces por objetivo determinar mediante la técnica Inmunohistoquímica la presencia de receptores para prolactina (PRLRs) en células epiteliales de folículos pilosos primarios y secundarios de piel de alpaca (*Lama pacos*).

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA PIEL**

Las funciones de la piel son múltiples, principalmente sirve como una barrera protectora entre el cuerpo y el medio externo. Es un órgano importante para la homeostasis debido a que previene la pérdida excesiva de agua, así como la invasión de microorganismos patógenos al organismo (Fowler, 1989; Leeson *et al.*, 1990).

La piel está formada por dos capas: una capa externa, de origen ectodérmico, conformado por tejido epitelial de revestimiento pavimentoso estratificado y queratinizado, denominado epidermis y una capa interna más densa, constituido por tejido conjuntivo, denominado dermis o corión que tiene su origen en el mesodermo. El revestimiento epitelial y sus derivados, los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas y sebáceas se originan del ectodermo (Dellmann y Brown, 1980; Banks, 1998).

### **2.2. ESTRUCTURA DE LA PIEL DE ALPACA**

La estructura de la piel de la alpaca, es similar a la de los otros mamíferos (Gaitan, 1967; Tapia, 1969), está compuesta por dos capas principales bien definidas: una

externa, llamada epidermis y otra interna, mucho más gruesa conocida como dermis (Chambilla, 1983; Bustinza, 2001).

a. Epidermis:

La epidermis estructuralmente está formado por un epitelio estratificado plano queratinizado que consiste de cuatro sub- estratos: germinativo o basal, espinoso, granuloso y córneo. No se observa el estrato lúcido (Fowler, 1989; Atlee *et al.*, 1997; Bustinza, 2001).

- ✓ *Estrato germinativo*, es el más profundo de la epidermis, está en contacto con el tejido conectivo subyacente que forma la dermis, las células que lo conforman son cúbicas en algunas zonas y en otras de aspecto cilíndrico (Fowler, 1989; Atlee *et al.*, 1997; Bustinza, 2001; Alzola, 2002), se llama germinativo porque es el plantel del cual se originan por mitosis todas las células de los demás estratos (Cormack, 1988).
- ✓ *Estrato espinoso*, conformado por células poliédricas caracterizadas por presentar dos capas, presentado núcleos ligeramente picnóticos. Las células superficiales son aplanadas, mientras que las profundas son poliédricas, con núcleo ovoide o esférico y cromatina laxa (Bustinza, 2001).
- ✓ *Estrato granuloso*, consistentemente presente en piel peluda. En la mayor parte de localizaciones esta compuesto de una capa simple de células aplanadas y delgadas con núcleo comprimido y pequeños gránulos basófilos queratohialinos, posiblemente dichos gránulos participan en la formación de la queratina blanda (Atlee *et al.*, 1997).
- ✓ *Estrato córneo*, es el más superficial, es delgado y está formado por unas escamas córneas estrechamente unidas entre sí, cuyas células aparecen llenas de una sustancia córnea llamada queratina. Estas células son escasas con tendencia a desprenderse (Bustinza, 2001; Alzola, 2002).

b. Dermis:

Se denomina dermis a la capa conjuntiva que está inmediatamente por debajo de la epidermis. Se dispone en forma laminar, es más gruesa y resistente que la epidermis (Alzola, 2002), se encuentra compuesta principalmente de tejido conectivo, conteniendo fibras de colágeno; en su lecho se encuentran los folículos pilosos, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas y músculo erector del pelo, se subdivide en dos estratos: dermis superficial y dermis profunda.

- ✓ *Dermis superficial*, es delgada, caracterizada por la presencia de tejido conectivo laxo, con un número considerable de células conjuntivas o fibrocitos por lo que toma el nombre de "lámina propia", la misma que se hace progresivamente densa hacia la parte profunda, formando líneas y tabiques que separan los "nidios foliculares" (Bustinza, 2001).
  
- ✓ *Dermis profunda*, es mucho más gruesa y más densa que la capa superficial y contiene grandes haces de fibras colágenas dispuestas paralelamente a la superficie de la piel y es en esta zona, en donde se presentan los bulbos pilosos (Dellmann y Brown, 1980; Bustinza, 2001).

La diferencia más notoria con la dermis de otras especies es la forma como se distribuyen los capilares sanguíneos, ya que estos forman paquetes tortuosos alrededor de los grupos foliculares. Estos están presentes tanto en la parte superficial como en la parte profunda de la dermis (Bustinza, 2001).

La hipodermis o subcutis, se encuentra formado por tejido conectivo laxo, cuya función es fijar la dermis a los huesos o músculos (Dellmann y Brown, 1980; Coormack, 1988; Banks, 1998). En camélidos se considera a la hipodermis como una capa más de la piel, su característica principal es que posee muchas células adiposas (Atlee *et al.*, 1997; Bustinza, 2001).

### 2.3. FOLÍCULOS PILOSOS EN LA ALPACA

La fibra en formación se halla rodeada por una estructura tubular denominada folículo piloso. Estos folículos cubren casi todo el espesor de la dermis y presenta en su base un ensanchamiento que constituye el bulbo piloso, los cuales presentan una papila de tejido conectivo con varios capilares. Esta papila invagina profundamente el bulbo formando un área bastante notoria. En los Camélidos, los folículos pilosos son de dos clases: folículos simples, los cuales contienen un pelo grueso único y los folículos compuestos, los cuales contienen pelos finos y múltiples.

- a. **Folículos pilosos simples**, contienen una sola fibra, con diámetro bastante grueso, cuya médula es infalible y están acompañados de una glándula sudorípara, que en algunos casos puede desembocar al folículo o emerger libremente. Estos han sido definidos como folículos primarios solitarios que surgen individualmente, cada uno teniendo una abertura separada. Los folículos pilosos simples varían grandemente en tamaño y estructura, dependiendo de la localización sobre el cuerpo y función especializada (Fowler, 1989; Atlee *et al.*, 1997; Bustinza, 2001).
  
- b. **Los folículos pilosos compuestos**, se describen como manojos de uno a varios grandes folículos primarios rodeados por múltiples folículos secundarios pequeños, todos compartiendo un infundíbulo folicular y abertura común única sobre la superficie de la piel (Atlee *et al.*, 1997), están formados por varios folículos de diferentes tipos y grosores, rodeados por tejido conectivo denso. Este folículo compuesto toma el nombre de nido folicular con un folículo primario y varios secundarios (Bustinza, 2001).

Los folículos pilosos se distinguen a su vez en dos tipos: folículos pilosos primarios y secundarios.

- ✓ *Folículos pilosos primarios*, son los primeros en aparecer. Se hallan completamente diferenciados por su mayor tamaño y asociación con ciertas

estructuras accesorias, tales como glándulas sudoríparas, músculo erector del pelo y glándula sebácea (Gaitan, 1967; Tapia, 1969). No está rodeado completamente por folículos secundarios sino que se localiza a un lado de ellos (Bustinza, 2001).

- ✓ *Folículos pilosos secundarios*, se identifican por un menor tamaño y por estar situados alrededor del folículo piloso primario, presentan ocasionalmente como estructura accesoria una glándula sebácea (Tapia, 1969).

La relación de folículos secundarios y primarios (S/P) tiene un promedio general de 7, cuya variación es relativamente grande que va por cada folículo piloso primario, desde 2 hasta 17 folículos pilosos secundarios (Bustinza, 2001).

## **2.4. ESTRUCTURA FÍSICA DE LA FIBRA**

La fibra es una formación delgada, cilindroide, de longitud variable constituida por células completamente queratinizadas cuyo origen es la porción epitelial del folículo piloso (Alzola, 2002). La estructura física de la fibra se puede hacer mediante observación microscópica de gran aumento, la fibra de alpaca presenta 3 partes, similar a la fibra de otros animales: cutícula, corteza y médula (Fowler, 1989; Bustinza, 2001).

### **1. Cutícula:**

La cutícula es la capa más superficial de la fibra y esta formada por una sola capa de células delgadas de forma poligonales superpuestas unas a otras, a manera de escamas de un pez o como las tejas de un tejado (Leeson *et al.*, 1990; Slobodan y Snezana, 1998; Bustinza, 2001).

### **2. Corteza:**

La corteza forma la mayor parte de la fibra y consiste en varias células aplanadas que poseen queratina; en la alpaca la corteza es muy variable, y



aumenta su proporción relativa a medida que la finura también aumenta. Así, hay fibras que sólo presentan cutícula y corteza; en éstas, las células corticales forman más del 90% de la masa de la fibra, similar al caso de las fibras de lanas finas. En el otro extremo, existen fibras gruesas en las cuales se distinguen claramente la cutícula, corteza y médula; en éstas la corteza puede comprender menos del 50% de toda la masa de la fibra (Bustinza, 2001).

### 3. Médula:

La médula, formada por unas pocas hileras de células incompletamente queratinizadas, se encuentra en el centro del tallo piloso (Slobodan y Snezana, 1998). La medulación de la fibra de alpaca, a la observación longitudinal presenta las siguientes características: en las fibras más finas hay ausencia de médula; en las fibras de grosor intermedio es interrumpida o delgada y en las fibras más gruesas es de tipo látice. En la sección transversal la médula aparece como una demarcación central oscura de formas variadas.

La fibra no medulada es a su vez la más circular y corresponde a las fibras más finas. La medulación fragmentada presenta una sección circular y corresponde a fibras finas. A medida que la fibra se engruesa, la médula se torna continua a lo largo de su longitud; siendo también más amplia y sólida y su sección transversal es ovoide arriñonada e irregular. Las fibras gruesas tienen médula sólida y de gran tamaño que presentan una sección transversal de forma arriñonada, triangular y en algunos la médula toma la forma de S o T. Las fibras más gruesas (cerdas) poseen médula continua y muy amplia, similar al tipo látice y la sección transversal se torna en doble T o X con extremos expandidos en forma irregular (Bustinza, 2001).

## **2.5. ESTRUCTURA DEL FOLÍCULO PILOSO**

El folículo piloso es una vaina compuesta que consiste de una:

- ✓ *Vaina de la raíz interna*; formada por tres capas: capa de Henle, capa de Huxley y la capa cuticular
  - a. Capa de Henle, es la capa más externa de la vaina interna de la raíz y está compuesta de una sola capa de células queratinizadas; sus células forman un solo estrato, son planas ó cúbicas muy bajas (Dellmann y Brown, 1980; Banks, 1998; Slobodan y Snezana, 1998; Alzola, 2002).
  - b. Capa de Huxley, capa media formada por una a tres capas de células cúbicas.
  - c. Capa cuticular, es la capa más interna y consta de un solo estrato de células casi planas.
  
- ✓ *Vaina de la raíz externa*, formada por varias capas de células similares a las del estrato espinoso de la epidermis, con el que se continúa en la parte superior del folículo.
  
- ✓ *Vaina de tejido conectivo*, es un entramado de fibras colágenas y elásticas circulares y longitudinales, abundantemente surcados por vasos sanguíneos y nervios (Dellmann y Brown, 1980).

## **2.6. CICLO DE CRECIMIENTO DEL PELO**

El crecimiento de pelo normal y la caída del mismo se presentan en ciclos influenciados por el fotoperiodo (Banks, 1998). El pelo tiene un periodo definido de crecimiento que varía de una región corporal a otra, y que muestra 3 fases: anágena (fase de crecimiento); catágena (fase de transición) y telógena (fase de reposo) (Leeson *et al.*, 1990; Atlee *et al.*, 1997; Slobodan y Snezana, 1998; Paus y Cotsarelis, 1999; Stenn y Paus, 2001).

### **Fase anágena**

En la etapa anágena, el germen secundario crece más profundamente y forma un nuevo bulbo de pelo en relación con una papila dérmica. La mitosis continúa alarga la columna. El nuevo crecimiento desplaza al pelo en palo de golf, el cual se cae, y el ciclo continúa.

### **Fase catágena**

Durante la etapa catágena, el bulbo del pelo llega a ser una masa queratinizada y sólida de células, y el folículo distal es delgado. El bulbo en forma de palo de golf se une a la columna del pelo y migra hacia el nivel de las glándulas sebáceas, este tipo de pelo, que no presenta papilas se llama "pelo en palo de golf".

### **Fase telógena**

En la etapa telógena, se desarrolla un germen secundario profundamente con respecto al "pelo en palo de golf", y puede conservarse por semanas o meses (Banks, 1998).

## **2.6. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO DEL PELO**

El ciclo del crecimiento del pelo está gobernado directamente por la herencia, hormonas y por el fotoperiodo, y tan sólo indirectamente por la temperatura. Dentro de los cuales el hormonal es el más importante (Nesbitt y Ackerman, 1998; Gutiérrez *et al.*, 2005).

**Factores Endocrinos:** diversas hormonas tienen influencias en el crecimiento de pelo como las hormonas sexuales (Andrógenos y Estrógenos), ACTH, prolactina, hormonas tiroideas así como los glucocorticoides.

**Factores Locales:** como el calor y masaje aumentan la actividad metabólica y, en consecuencia, favorecen el rápido crecimiento del pelo.

**Factores Genéticos:** la genética tiene una gran importancia no sólo en la caída del cabello, sino también en cuanto a la textura, coloración e incluso densidad pilosa.

**Factores Metabólicos:** la nutrición también influye sobre la cantidad y calidad de los pelos. Sin embargo, ésta influencia se observa solamente durante la fase de desarrollo del ciclo de crecimiento de los mismos. La pérdida de pelo suele ir asociada con la deficiencia de uno o más elementos nutritivos como la vitamina A, el complejo B y la vitamina D3 son necesarias utilizadas adecuadamente, en diversas fases del desarrollo del pelo (Bavera, 2006; Magill, 2005).

## 2.8. PROLACTINA

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica que es sintetizada y secretada por células especializadas de la parte anterior de la glándula pituitaria, los lactotrofos. Basado en sus propiedades genéticas, funcionales y de unión, la prolactina pertenece a la familia de lactógeno placentario/ hormona de crecimiento/ prolactina (grupo I de las hormonas proteicas en paquete espiral (García *et al.*, 1996; Bole-Feysot *et al.*, 1998; Freeman *et al.*, 2000), la PRL en los humanos está conformada por 198 aminoácidos cuyo gen se localiza en el cromosoma 6, donde también está ubicado el del antígeno leucocitario humano (HLA). Se han descrito varias isoformas circulantes de su molécula en muchos mamíferos, incluyendo los humanos: la "prolactina pequeña" que es muy activa biológicamente y ocupa el 80 % de la producción, es la que presenta más actividad sobre el receptor específico y se halla en la mayoría de los casos con hiperprolactinemias. La "prolactina grande- grande", la "prolactina grande", la " prolactina pequeña- pequeña ", y la forma glicosada; sus pesos moleculares son diferentes y probablemente tengan funciones distintas (Velásquez y Fernández, 2004). Las variantes de la prolactina pueden ser resultados de uniones alternativas,

hendiduras proteolíticas y otras modificaciones post traduccional de la cadena de aminoácidos (Freeman *et al.*, 2000). La PRL ovina es la mejor conocida, tiene un peso molecular de 24 000 y contiene 198 aminoácidos en una cadena única. La estructura primaria de PRL ovina, bovina y humana es muy similar (García *et al.*, 1996). La PRL se sintetiza en los ribosomas de los prolactinotropos o lactotropos adenohipofisarios, es concentrada en el aparato de Golgi y almacenada en forma de gránulos en el citoplasma celular, de donde es liberada al recibir las señales secretagogas. Su liberación es episódica, en forma de pulsos de duración, amplitud y elevación variables y modificada en varias condiciones fisiológicas como el sueño, movimientos no rápidos de los ojos (REM), la ingesta alimenticia, embarazo, lactancia y estímulos locales en mama o arcos reflejos como la visión o el llanto del niño (Velásquez y Fernández, 2004).

### **2.8.1. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA PROLACTINA**

La prolactina es una hormona adenohipofisaria que prevalece en todos los vertebrados. Esta implicada en un amplio espectro de acciones biológicas que incluyen la nutrición del recién nacido, osmorregulación, favorecimiento del crecimiento, mantenimiento del metabolismo, consumo de agua, metamorfosis, mantenimiento de los tegumentos y comportamientos migratorios y maternal.

Las acciones de la PRL pueden ser agrupadas en seis categorías distintas:

- ✓ Control del agua y balance electrolítico.
- ✓ Regulación del crecimiento y desarrollo.
- ✓ Efectos metabólicos.
- ✓ Control de las funciones reproductivas.
- ✓ Efectos en tegumentos y estructuras ectodérmicas.
- ✓ Acciones sinérgicas o antagónicas con hormonas esteroides.

Los efectos de la prolactina en mamíferos se ejercen de forma primaria en los órganos de la reproducción, estimula la secreción de leche y provoca el crecimiento de la glándula mamaria durante la preñez (García *et al.*, 1996).

La prolactina no esta subordinada a solo roles reproductivos más que la lactación, sino también juega múltiples roles homeostáticos en el organismo. Además, ahora estamos conscientes que la síntesis y secreción de prolactina no esta restringida a la glándula pituitaria anterior sino a otros órganos y tejidos corporales que tiene esta capacidad (Freeman *et al.*, 2000).

La PRL puede modular directa o indirectamente los ciclos de crecimiento del pelo, la caída y la muda en animales peludos; mientras que la hiperprolactinemia ha sido asociado con hirsutismo. También se ha propuesto que la PRL participa en la regulación de la actividad de la glándula sebácea, desde que el acné vulgaris, puede estar asociado con hiperprolactinemia idiopática en ausencia de concentraciones de andrógeno alterado (Slominski y Worstman, 2000).

Diversos estudios demostraron que la PRL es también sintetizada en sitios extrapituitarios donde actuarían como factores autócrinos/parácrinos. Entre estos sitios se puede mencionar los órganos reproductores, el sistema inmune, el cerebro y otros órganos. Dentro de los órganos reproductores, la PRL es producida por la placenta, miometrio y por las células epiteliales mamarias normales y malignas (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Silvina *et al.*, 2003; Velásquez y Fernández, 2004).

La primera observación de que la prolactina es producida en el cerebro se comprobó hallando la inmunoreactividad de la prolactina en los terminales axónicos del hipotálamo. La inmunoreactividad de la prolactina fue encontrada subsecuentemente en el telencéfalo de la corteza cerebral, hipocampo, amígdala, septo, putamen caudado, tronco cerebral, cerebelo, médula espinal, plexos coroides, y los órganos circumventriculares (huecos). La prolactina puede ser detectada en las células epiteliales de las glándulas mamarias lactantes también en la leche misma (Freeman *et al.*, 2000).

En la actualidad diversos estudios como el de Foitzik *et al.*(2003), quienes al adicionar PRL (400ng/ml) a folículos pilosos anágenos en cultivos de órganos cutáneos murinos por un lapso de 72 horas obtuvieron como resultado catagen

premature *in vitro* así como un decline en el número de proliferación de queratinocitos bulbares pilosos; estos datos apoyan el concepto de que la PRL es generado localmente en el epitelio del folículo piloso, el cual actuaría directamente de forma autocrina o paracrina para la modulación del ciclo piloso.

### **2.8.2. INHIBIDORES Y ESTIMULADORES DE PROLACTINA**

La secreción de PRL está tónicamente inhibida por la dopamina secretada en los núcleos hipotalámicos y que alcanza la hipófisis a través de los capilares del sistema portal hipotálamo-hipofisario, donde a su vez se ha descrito una circulación de retorno desde la glándula al hipotálamo. Varios neuropéptidos también la inhiben, entre los que se encuentran: el ácido gamma-amino-butírico (GABA) en la hipófisis, las catecolaminas y acetilcolina. Otras sustancias son inhibidoras: la levodopa y alcaloides derivados del ergot. Por el contrario, su secreción es estimulada por la hormona estimulante de tirotrópina (TSH), serotonina (5-HT), histamina, betaendorfinas, colecistoquinina (CCK), polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), bombesina, neurotensina y sustancia P y por varios medicamentos tales como los derivados de las fenotiazinas, y clorpromazina y drogas utilizadas como antieméticos o antiulcerosos (cimetidina y derivados) (Velásquez y Fernández, 2004).

### **2.9. RECEPTORES DE PROLACTINA**

El receptor de prolactina (PRLR), es una simple proteína de membrana que pertenece a la clase 1 de la superfamilia de receptores de citoquina. Al igual que sus ligandos, los receptores de PRL y Hormona de crecimiento comparten varias características estructurales y funcionales a pesar de su baja (30%) secuencia homóloga. Cada uno contiene membrana extracelular, transmembrana y dominio intracelular (Freeman *et al.*, 2000).

El gen que codifica el R- prolactina está localizado en el cromosoma 5 y contiene 10 "exones" por lo menos. La regulación de la transcripción del gen de R- prolactina es realizado por tres diferentes promotores tejido específico. Promotor I es específico para las gónadas, promotor II para el hígado y el promotor III es "genérico", presente en ambos tejidos gonadal y no gonadal. Numerosas isoformas de R- prolactina han sido descritas en diferentes tejidos. Aunque las isoformas varían en longitud y composición de sus dominios citoplasmáticos, sus dominios extracelulares son idénticos. Las tres mayores isoformas R- prolactina descritas en ratas son: corto (291 aminoácidos), intermedio (393 aminoácidos) y largo (591 aminoácidos). En ratones, una larga y 3 cortas isoformas han sido descritas (Freeman *et al.*, 2000).

### **2.9.1. DISTRIBUCIÓN DEL RECEPTOR DE PROLACTINA**

Los receptores de prolactina (PRLRs) están extensamente distribuidos a través del cuerpo (Bole-Feysot *et al.*, 1998), por lo tanto el PRLR y su mensajero son encontrados en la glándula mamaria y en el ovario, sitios importantes de acción de la prolactina en mamíferos. Así mismo, el receptor y su ARNm son encontrados además en numerosas partes del CNS. Como lo describió Freeman *et al.* (2000), para la forma larga del PRLR en el cerebro de rata. Receptores para las hormonas pituitarias, para la prolactina, LH y HCG también se expresan en piel (Slominski y Worstman, 2000). En realidad, es difícil encontrar un tejido que no exprese ningún mRNA PRLR o la proteína. De acuerdo a su extensa distribución de receptores, hasta el momento se ha reportado más de 300 acciones distintas de PRL en varios vertebrados, incluyendo efectos sobre balance del agua y la sal (electrolítico), crecimiento y desarrollo, metabolismo endocrinológico, comportamiento, reproducción, regulación y protección inmune (Bole-Feysot *et al.*, 1998). Los receptores de prolactina se localizan en las membranas plasmáticas del aparato de Golgi y del retículo endoplasmático de las células de diferentes órganos, principalmente la glándula mamaria, pero también en las adrenales, riñón, próstata, ovarios y corion de la placenta (García *et al.*, 1996); por otro lado, presentes también en una amplia variedad de órganos periféricos como la glándula pituitaria,



corazón, pulmón, timo, bazo, hígado, páncreas, riñón, glándula adrenal, útero, músculo esquelético y piel (Freeman *et al.*, 2000).

Además de los receptores nativos en la glándula mamaria para la acción de la prolactina en sus diferentes isoformas, otros tipos de receptores para PRL se han localizado en hígados de ratas con una secuencia de aminoácidos similares a los de la hGH; son más abundantes en las hembras. Los PRLRs también se encuentran en hipotálamo, suprarrenales, riñón, páncreas, ovarios, testículos, tejido linfóide, próstata, vesículas seminales y cerebro. En humanos, el PRLR es codificado por un gen en el cromosoma 5p 13-14, cerca del gen para el receptor de hormona de crecimiento y pertenece a una familia que incluye a citoquinas y algunos factores de crecimiento, lo que le ha dado soporte a su dualidad como hormona y citoquina (Ben- Jonathan *et al.* 1996; Velásquez y Fernández, 2004).

Receptores de prolactina han sido localizados en queratinocitos epidermales y foliculares de rata por hibridación *in situ* y en queratinocitos foliculares y fibroblásticos de la papila de la dermis de la oveja con un ensayo de unión radioligando (Ouhtit *et al.*, 1993; Choy *et al.*, 1995). Mediante autoradiografía, inmunocitoquímica, pruebas de unión de receptores estándar, transcriptasa reversa-PCR, y prueba de protección de ribonucleasa, se demostró que los plexos coroideos tienen una muy alta densidad de receptores de prolactina (Freeman *et al.*, 2000).

## **2.10. INMUNOHISTOQUÍMICA**

La Inmunohistoquímica (IHQ) tiene como fundamento la detección y localización de antígenos celulares o tisulares mediante reacciones antígeno- anticuerpo. La inmunohistoquímica al combinar técnicas anatómicas, inmunológicas y bioquímicas, permite localizar componentes tisulares definidos ("in situ") mediante el empleo de anticuerpos específicos y de moléculas marcadoras (Gimeno *et al.*, 2003), como fluorocromos (técnicas de Inmunofluorescencia), enzimas (técnicas

Inmunoenzimáticas) y partículas de oro coloidal (técnica Inmunometálico) (Elías, 1990; Curso Virtual, 2005).

La IHQ tienen diferentes variantes, estas se clasifican en función al marcador (Neira, 2005):

- ✓ Inmunofluorescencia
- ✓ Inmunoenzimático
- ✓ Inmunometálico
- ✓ Inmunorradiactivo
- ✓ Inmunoferritina

La inmunohistoquímica es más específica y sensible que otras pruebas histoquímicas, son extremadamente sensitivas y pueden detectar cantidades muy pequeñas (ejemplo nanogramos o moléculas individuales) de una sustancia (Mills, 1992), el resultado es bueno dependiendo de la calidad de los agentes inmunológicos, de la preparación de IHQ y de la interpretación (Elías, 1990; Gimeno *et al.*, 2003).

Aunque la inmunohistoquímica, es una ciencia relativamente joven, causó impacto en patología, oncología y histología durante la década pasada debido a que produjo altos niveles de especificidad (Elías, 1990; Gonzáles, 2004), convirtiéndose en una herramienta de enorme utilidad en anatomía patológica; en patología humana ha permitido avances espectaculares en el diagnóstico histopatológico. La detección exacta de antígenos en células y en tejidos ha aportado valiosa información en el estudio de los mecanismos de enfermedad, expandiendo así notablemente el diagnóstico histopatológico al brindar datos sobre parámetros bioquímicos de los tejidos en estudio, y adquirió valor pronóstico al reconocer moléculas que se correlacionan con el comportamiento biológico de diversos procesos (Gimeno *et al.*, 2003), la IHQ contribuyen también al diagnóstico precoz, a la formulación de diagnósticos más precisos y a la predicción de respuestas al tratamiento. Estas técnicas tienen menor costo y son más rápidas que la microscopía electrónica (Gonzáles, 2004).

Si bien la identificación de una sustancia o de un agente infeccioso suele ser significativa, la IHQ puede informar la exacta localización en células o tejidos, la existencia y el tipo de lesiones en relación con el antígeno, permite también identificar gérmenes potencialmente peligrosos que han sido inactivos por la formalina, generalmente con ventajas en cuanto a rapidez y costos. La IHQ hoy en día es muy utilizada en el diagnóstico de tumores y sus aportes frecuentemente son concluyentes, al permitir la identificación de marcadores tisulares específicos (filamentos intermedios, hormonas, marcadores neurológicos, antígenos superficiales leucocitarios, etc.) (Gimeno *et al.*, 2003).

### **2.10.1. FUNDAMENTO INMUNOLÓGICO DE LOS MÉTODOS INMUNOHISTOQUÍMICOS: ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS**

#### ***Antígenos***

Se define como un antígeno (Ag) a toda sustancia o partícula animada o inanimada, de cualquier constitución química, que introducida a un organismo superior por cualquier vía o perteneciente al mismo, no sea reconocida como propia e induzca en éste una respuesta inmunológica humoral (producción de anticuerpos) y/o celular detectables tanto *in vivo* como *in vitro* (Gimeno *et al.*, 2003); se define también como cualquier sustancia a la que se unen específicamente una molécula de anticuerpo o un receptor de la célula T (Abbas *et al.*, 2002). En inmunohistoquímica, el antígeno es la sustancia que tratamos de demostrar (Mills, 1992).

#### ***Anticuerpos***

Los anticuerpos son proteínas del suero, inmunoglobulinas (Ig), que son producidas en respuesta a una sustancia específica (antígeno). El propósito de los anticuerpos en el organismo es de neutralizar el efecto del antígeno (Mills, 1992), las moléculas de anticuerpos pueden separarse en clases y subclases específicas en función de las

diferencias en la estructura de las regiones C de sus cadenas pesadas. Las distintas clases de moléculas de anticuerpos también reciben el nombre de isotipos, abarcan cinco clases mayores, que citadas en el orden en que decrecen en el plasma o suero son: IgG, IgA, IgM, IgD y IgE. De las cinco clases de inmunoglobulinas, IgG y IgM son los anticuerpos utilizados con mayor frecuencia en inmunohistoquímica (Boenisch, 2002).

Todas las moléculas de anticuerpos comparten las mismas características estructurales básicas, pero presentan una notable variabilidad en las regiones de unión al antígeno. Esta variabilidad justifica la capacidad de los diferentes anticuerpos de unirse a un asombroso número de antígenos estructuralmente distintos. Todos los anticuerpos tienen una estructura básica simétrica compuesta de dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Cada cadena ligera está unida covalentemente a una cadena pesada por un puente disulfuro, y las dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante puentes disulfuro. Las cadenas pesadas y ligeras de las Ig se componen de regiones variables (V) amino terminales (N-terminales) y de regiones constantes (C) carboxi terminales. La región V de una cadena pesada ( $V_H$ ) se yuxtapone con la región V de una cadena ligera ( $V_L$ ) para formar un sitio de unión al antígeno. Debido a que la unidad estructural básica de cada molécula de anticuerpo contiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, la molécula contiene dos sitios de unión al antígeno.

Los anticuerpos pueden actuar como antígenos cuando se introducen en huéspedes extraños, desencadenando la producción de anti-anticuerpos. Los anticuerpos se pueden utilizar para identificar la distribución anatómica de un antígeno en el interior de un tejido o en los compartimentos de una célula. Los anticuerpos tienen la capacidad de reconocer como antígeno prácticamente cualquier clase de molécula biológica, entre otras los metabolitos intermedios, los azúcares, los lípidos, los autacoides y las hormonas, así como macromoléculas del tipo de los hidratos de carbono complejos, los fosfolípidos, los ácidos nucleicos y las proteínas.

Un anticuerpo se une sólo a una parte específica de la macromolécula, denominada "determinante antigénico o epítipo". Los anticuerpos presentan una notable

especificidad por los antígenos, y son capaces de detectar pequeñas diferencias en la estructura química (Abbas *et al.*, 2002).

a. Anticuerpos Policlonales

Los anticuerpos policlonales son producidos por diferentes células plasmáticas y, en consecuencia, son disimilares inmunohistoquímicamente; estos reaccionan con varios epítopes sobre el antígeno para el que fueron originados. El animal mas frecuentemente utilizado para la producción de anticuerpos policlonales es el conejo, seguido por la cabra, cerdo, oveja, caballo, cobayo y otros (Boenisch, 2002).

a. Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales son el producto de un clon individual de células plasmáticas. Los anticuerpos de un clon dado son idénticos inmunoquímicamente y reaccionan con un epítpe específico en el antígeno contra el cual han sido originados. El animal usado casi exclusivamente para la producción de anticuerpos monoclonales es el ratón, probablemente por razones de economía (Boenisch, 2002). Para la producción de anticuerpos monoclonales, se basa en el hecho de que cada linfocito B produce anticuerpos con una única especificidad. Debido a que los linfocitos B normales no pueden crecer de forma indefinida, es necesario immortalizar las células B productoras de un anticuerpo específico, esto se lleva a cabo mediante fusión celular, o hibridación de células somáticas, entre una célula B productora de anticuerpos normal y una célula de mieloma, seguido de la selección de las células fusionadas que secretan el anticuerpo de la especificidad deseada derivado de la célula B normal. Estas líneas celulares derivadas de la fusión, immortalizadas y productoras de anticuerpos, se denominan "hibridomas", y los anticuerpos que producen reciben el nombre de "anticuerpos monoclonales" (Abbas *et al.*, 2002).

Un "suero" monoclonal es aquel que concentra, en gran cantidad, anticuerpos específicos contra un solo epítoto. Este tipo de "suero" solo se logra en el laboratorio, mediante procesos biológicos dirigidos. Dichos procesos consisten en inocular el antígeno purificado en ratones induciendo en éstos la producción de gran cantidad de anticuerpos específicos. Los ratones son posteriormente sacrificados para extraerles el bazo que contiene gran cantidad de linfocitos B. Estas células son mezcladas con células de mieloma (tumor de células plasmáticas) para inducir la fusión de ambas (producción de hibridomas), en un medio adecuado a tal fin. Los hibridomas resultantes deben ser sembrados por dilución limitante en policubetas para su crecimiento. Cada una de estas células en su propio pocillo comenzará a producir un determinado tipo de anticuerpos debiéndose seleccionar aquel que sea específico para el epítoto deseado (Gimeno *et al.*, 2003; Bourne, 1983).

Las ventajas de los anticuerpos monoclonales frente a los anticuerpos policlonales son:

- ✓ Los anticuerpos monoclonales son homogéneos y a diferencia de los policlonales, no varían con cada inmunización o sangría realizada al animal.
- ✓ No se requiere el uso de antígenos purificados para las inmunizaciones; a pesar de ello se obtienen anticuerpos de gran pureza.
- ✓ Los cultivos permanentes pueden proporcionar el anticuerpo de forma ilimitada (Curso virtual, 2005).

Los anticuerpos policlonales tienen una gran sensibilidad, pero poca especificidad mientras que los anticuerpos monoclonales, tienen una gran especificidad y poca sensibilidad (Neira, 2005); tanto los anticuerpos monoclonales como los policlonales se pueden unir a moléculas marcadas o trazadoras que permiten visualizar el lugar de reacción con sus respectivos antígenos.

## 2.10.2. ENZIMOLOGÍA BÁSICA

Los métodos de coloración inmunoenzimáticos utilizan reacciones de enzima-substrato para convertir a los cromógenos sin color en productos finales coloreados.

### **Enzimas**

Las enzimas son catalizadores que actúan sobre un sustrato para acelerar su conversión a un producto (Mills, 1992), una clasificación muy amplia de las enzimas incluiría enzimas hidrolíticas (esterasas, proteasas), fosforilasas, enzimas oxidoreductivas (deshidrogenasas, oxidasas, peroxidasas), enzimas de transferencia, descarboxilasas y otras. La actividad enzimática depende de diversas variables, tales como las concentraciones de enzima y sustrato, pH, concentración de sal en el buffer, temperatura y luz.

La selección de la enzima más adecuada para una aplicación inmunohistoquímica en particular depende de ciertos criterios:

- ✓ La enzima deberá estar disponible en forma altamente purificada y ser relativamente económica.
- ✓ La conjugación (por ejemplo, unión covalente a un anticuerpo o avidina) o unión no covalente no deberá abolir la actividad de la enzima aunque podrá disminuirla.
- ✓ La enzima conjugada deberá ser estable en solución.
- ✓ La actividad endógena de la enzima sólo deberá interferir de una manera mínima con la coloración específica del antígeno.
- ✓ Los productos de la reacción enzimática deberán ser fácilmente detectables y estables.

De las enzimas usadas en las aplicaciones inmunohistoquímicas, la peroxidasa de rábano y la fosfatasa alcalina son las más utilizadas (Boenisch, 2002).

## **PEROXIDASA DE RÁBANO (HRP)**

La peroxidasa, es la enzima que más se utiliza como marcador inmunoenzimático (Neira, 2005), la variante más habitual del método inmunoenzimático utiliza la enzima peroxidasa de rábano y recibe generalmente el nombre de **técnica de inmunoperoxidasa** (Abbas *et al.*, 2002).

La Peroxidasa de Rábano (HRP), tiene un peso molecular de 40 kD y es aislada de la raíz de la planta de rábano. Tiene un grupo con contenido de hierro (hematina) como su sitio activo y en solución su color es marrón; dicha sustancia primero forma un complejo con el peróxido de hidrógeno y luego se descompone resultando en agua y oxígeno atómico. El HRP oxida a varias sustancias, dos de las cuales son polifenoles y nitratos. Como muchas otras enzimas, el HRP puede ser inhibida por exceso de sustrato. El cianuro y la azida sódica son otros dos fuertes inhibidores (reversibles) de la HRP (Boenisch, 2002).

### **Substratos**

La peroxidasa "rábano picante" (HRP) usada en inmunohistoquímica reacciona con el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), en presencia de un electrón donante, para formar una molécula coloreada. La enzima no es agotada y puede continuar la catalización de la reacción formando muchas moléculas coloreadas (Mills, 1992; Boenisch, 2002).

### **Cromógenos**

Existen varios donantes de electrones que cuando son oxidados, se convierten en productos coloreados por lo que reciben el nombre de cromógenos; estos son capaces de reaccionar con el complejo Peroxidasa- agua oxigenada y dar un precipitado coloreado insoluble (Gimeno *et al.*, 2003).



- ✓ 3,3 ' Diaminobencidina (DAB): es el cromógeno más usado; es específico para la peroxidasa, barato, fácil de conseguir y origina un precipitado marrón, visible en el microscopio óptico y muy estable, siendo altamente insoluble en alcohol y otros solventes orgánicos; esto permite realizar cualquier tratamiento histológico o histoquímico posterior. El DAB produce mejores resultados de coloración que cuando se emplean los cromógenos: 3 amino 9 etilcarbozole (AEC), 4-Cl-1 naftol (CN), Hanker- Yates y tetrametil benzidina. La DAB ha demostrado poseer efectos carcinogénicos en animales de laboratorio y se considera potencialmente peligroso para el ser humano en consecuencia, debe manejarse con mucho cuidado (Elías, 1990; Mills, 1992; Boenisch, 2002; Gimeno *et al.*, 2003).
  
- ✓ 3 - Amino - 9 Etilcarbazol (AEC): el cromógeno AEC produce un producto terminal rojo el cual es soluble en alcohol, por lo que debe usarse contra coloraciones y medios de montaje acuoso (Mills, 1992).

### **2.10.3. PRINCIPALES TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS**

Las técnicas de tinción Inmunoenzimáticas/Inmunohistoquímicas (IHQ), permiten la visualización de antígenos celulares en los tejidos. Estas técnicas están basadas en la inmunoreactividad de los anticuerpos y en las propiedades químicas de las enzimas o complejos enzimáticos que reaccionan con cromógenos -substratos produciendo un precipitado con color. En todos los métodos inmunoenzimáticos se utiliza una reacción enzima- substrato que transforma a un cromógeno incoloro en un producto final coloreado (Gimeno *et al.*, 2003).

#### **A. TÉCNICAS DE INMUNOPEROXIDASA**

En la técnica de inmunoperoxidasa, la enzima peroxidasa de rábano (HRP), es el trazador enzimático más utilizado, puede emplearse en técnicas con anticuerpos

marcados (técnicas directas o indirectas) o con anticuerpos sin marcar (técnica de peroxidasa antiperoxidasa).

#### A.1. Método Directo

En el método directo la inmunoglobulina específica, dirigida contra el antígeno que nos interesa, se encuentra marcada con peroxidasa. Es una técnica muy rápida y fácil de realizar, pero la principal limitante reside en la circunstancia que es utilizable con un solo antígeno. Es un método muy poco utilizado en la actualidad.

#### A.2. Método Indirecto

En el método indirecto, el anticuerpo primario o específico que se une al antígeno, no tiene nada conjugado; para localizar su presencia se necesita un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa que se fije al anterior. Este método es mucho más versátil que el anterior, ya que el anticuerpo secundario (marcado) puede ser empleado con distintos anticuerpos primarios.

#### A.3. Método de la Peroxidasa- Antiperoxidasa (PAP)

El Método de la Peroxidasa- Antiperoxidasa (PAP), constituyó un avance importantísimo en inmunohistoquímica. Implica el empleo de tres reactivos: un anticuerpo primario específico, un anticuerpo secundario y el complejo PAP compuesto por tres moléculas de peroxidasa y dos de inmunoglobulina antiperoxidasa. El anticuerpo secundario o "puente" es capaz de unirse al mismo tiempo al anticuerpo primario y al complejo PAP (Gimeno *et al.*, 2003; Bourne, 1983).

#### A.4. Métodos que utilizan la interacción Avidina- Biotina

Los métodos que utilizan la interacción Avidina-Biotina, se fundamentan en la fuerte afinidad que existe entre la avidina y la biotina.

- La avidina es una glicoproteína de alto peso molecular, puede ser obtenida de la clara de huevo o del hongo *Streptomyces avidinii* (Streptoavidina) (Sedano *et al.*, 1997).
- La biotina es una vitamina del complejo B de bajo peso molecular encontrado en la yema de huevo (Elías, 1990).

La molécula de avidina es cuadrivalente; cada uno de los dos lados opuestos tiene un par de receptores de biotina cercanos por los cuales se une de manera irreversible a la biotina: entre ambas sustancias existe una afinidad que es más fuerte que la reacción antígeno- anticuerpo.

La biotina se puede conjugar fácilmente con la fracción Fc de las inmunoglobulinas, sin afectar en nada la capacidad de los anticuerpos de unirse a los antígenos específicos (Gimeno *et al.*, 2003).

La mayoría de los métodos de coloración inmunohistoquímicos actualmente en uso están basados en la alta afinidad que la (estrept)avidina (*Streptomyces avidinni*) y avidina (clara de huevo) tienen para la biotina (Boenisch, 2002).

##### A.4.1. Método de Avidina- Biotina

En el método de la Avidina- Biotina se utilizan cuatro reactivos: el primero es el anticuerpo primario no conjugado, seguido por un segundo anticuerpo conjugado con biotina y capaz de unirse al anticuerpo primario. El tercer reactivo es la avidina y finalmente se agrega peroxidasa biotilada (Gimeno *et al.*, 2003; Bourne, 1983).

#### A.4.2. Método del Complejo Avidina- Biotina- Peroxidasa (ABC)

El método del complejo Avidina- Biotina- Peroxidasa (ABC), también usa tres reactivos: un anticuerpo primario, un anticuerpo secundario que esta químicamente ligado a la vitamina biotina y un complejo de la glicoproteína avidina que esta ligado a la biotina y peroxidasa (Mills, 1992).

#### A.4.3. Método de la Streptavidina - Biotina Marcada (LSBA)

El método de la Streptavidina- Biotina Marcada (LSAB), se fundamenta en la unión entre la avidina y la biotina conjugada con la peroxidasa. En el primer paso se incuba con el anticuerpo primario, luego con el anticuerpo biotinilado y por último con una solución de streptavidina marcada con peroxidasa. Se la considera de 4 a 8 veces más sensibles que el ABC, es más rápida y puede usarse indistintamente con un suero primario monoclonal de ratón o policlonal de conejo, ya que el anticuerpo puente es en realidad una mezcla de Ig anti-ratón y anti-conejo (Boenish, 2002; Gimeno *et al.*, 2003; Sedano *et al.*, 1997).

#### A.4.4. Método de Polímeros de Déxtrano *En Vision* (PDE)

La técnica de Polímeros de Déxtrano *EnVision* (PDE) de inmunohistoquímica desarrollada recientemente se basa en la utilización de un polímero de alto peso molecular conjugado con el anticuerpo secundario y la peroxidasa. Este nuevo sistema de inmunodetección basado en polímeros aporta una sustancial mejora en la técnica inmunohistoquímica en relación con la facilidad y rapidez de las diluciones empleadas. Esta técnica es más sensible y produce menos coloración de fondo "Background" que los métodos de avidina-biotina, incluso a concentraciones subóptimas. Las ventajas más

importantes de esta técnica fueron la desaparición de falsos positivos por la biotina endógena (que permite la utilización casi sin límite de los métodos de recuperación antigénica), la disminución del tiempo y complejidad y su menor costo (Pardo *et al.*, 1998).

## **2.10.4. REQUERIMIENTOS DE LAS TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS**

### **2.10.4.1. FIJACIÓN**

Las técnicas inmunohistoquímicas pueden ser aplicadas en cortes de tejidos, cultivos celulares o material citológico: improntas, extendidos, etc. En todos los casos las células y /o tejidos deben ser sometidas a un proceso de fijación para frenar los cambios autolíticos y preservar la morfología (Gimeno *et al.*, 2003), los fijadores previenen la autólisis por la inactivación de enzimas liso-somales e inhiben el crecimiento de bacterias y mohos, que darían lugar a cambios putrefactivos; actúan desnaturalizando las proteínas por coagulación formando compuestos aditivos o por una combinación de ambos, causando en la estructura de las proteínas la inactivación de las enzimas. Los fijadores además de alterar la naturaleza química de las células y tejidos a los que se aplican, causan también cambios físicos en los constituyentes celulares y extracelulares (Farmilo y Stead, 2002). El fijador ideal para inmunohistoquímica debe reunir las siguientes características: brindar buena preservación de la morfología, no destruir la inmunorreactividad de los antígenos; prevenir la extracción, la difusión o el desplazamiento de antígenos durante el procesado del material, no interferir con las reacciones antígeno-anticuerpo empleadas para localizar a los antígenos. Todos los fijadores determinan pérdida de antígenos en mayor o menor grado; la susceptibilidad de cada antígeno a los fijadores es variable, por lo que aún no se ha descubierto "el fijador ideal" que permita una excelente observación morfológica y una perfecta inmunomarcación de todos los antígenos: en cortes de

tejidos siempre se enfrenta el dilema de mantener los detalles tisulares o preservar los antígenos (Gimeno *et al.*, 2003; Sedano, 2005).

La fijación tiene una gran influencia en la intensidad de las coloraciones en Histoquímica e Inmunohistoquímica. La fijación química de los tejidos es un procedimiento algo complejo que depende de las propiedades intrínsecas de la fijación, pH, molaridad, T°, tiempo del tratamiento, y tipo de tejido (Elías, 1990), la falta de uniformidad en el uso de formalina para la fijación entre los laboratorios, sobre todo en lo relativo a las variables de concentración, pH y tiempo de la exposición, ha contribuido a esta complejidad, ya que estos factores influyen notablemente el resultado de la coloración en inmunohistoquímica (Key, 2002).

Los fijadores químicos empleados comúnmente en los laboratorios de patología pueden ser clasificados en tres categorías: aldehídos, alcoholes y metales pesados (Gimeno *et al.*, 2003), los fijadores más populares contienen formalina (40% peso/volumen de formaldehído en agua), una sal neutra para mantener la osmolaridad y a menudo un sistema "buffer" para mantener el pH. Generalmente, los fijadores a base de formalina son excelentes para la mayoría de las inmunocoloraciones (Farmilo y Stead, 2002).

El fijador más utilizado en la histopatología de rutina es el formaldehído, empleado como solución al 10% de formalina comercial; este confiere rigidez a los tejidos mediante ligaduras cruzadas que se producen entre cadenas polipeptídicas; en realidad el proceso es químicamente complejo y no completamente conocido. El formaldehído (y otros aldehídos) origina ligaduras entre cadenas proteicas en los tejidos; ello produciría un "enmascaramiento" al interferir con la penetración y posterior unión de los anticuerpos (Gimeno *et al.*, 2003).

### **Formalina Neutral Bufferada (NBF) al 10%**

La formalina neutral bufferada (NBF) al 10% (pH 7.0-7.6) es probablemente el mejor fijador para inmunohistoquímica (Mills, 1992), provee una consistente y adecuada preservación morfológica, es fácil de preparar y barato, y compatible con muchas coloraciones histoquímicas usadas. Aunque el NBF penetra rápidamente al tejido, su velocidad de fijación es lenta; pequeños péptidos pueden perderse o desplazarse. Idealmente la fijación en NBF debería de ser en un rango de 12- 24 horas. La NBF no es una fijación inocua para inmunohistoquímica porque también reacciona con las proteínas. Además disminuye completamente la inmunoreactividad de muchos antígenos tisulares por la formación de enlaces cruzados entre grupos terminales de proteínas (Elías, 1990).

Farmilo y Stead (2002), comprobaron que utilizando bloques pequeños de tejidos fijados rápidamente en NBF durante 6 a 24 horas, tuvieron buena preservación citológica e inmunolocalización, con un mínimo de enmascaramiento del antígeno. Otra ventaja es que la NBF, es estable durante muchos meses a temperatura ambiente.

#### **2.10.4.2. RECUPERACIÓN DE ANTÍGENOS (AR)**

El tejido fijado en formol e incluido en parafina (FFPE) permanece hasta hoy como el elegido para la mayoría de los estudios clínicos y de investigación. La pérdida de inmunoreactividad por parte de muchos antígenos como resultado de la fijación en formalina, se ha convertido en un desafío. Los cambios fisiológicos y patológicos en la composición del tejido, incluyendo la yuxtaposición de proteínas del tejido y sus sitios antigénicos (epítopes), no permite predecir el resultado de fijación con algún grado de certeza. Cada antígeno puede contener de uno a muchos epítopes y cada uno de éstos puede estar compuesto de cinco o más aminoácidos. La fijación con formalina permitirá que algunos epítopes permanezcan inalterados (resistentes a la formalina), otros sufrirán cambios sustanciales (sensibles a la formalina). En este proceso, es también posible la

unión cruzada de proteínas no relacionadas al antígeno blanco. El resultado final es la pérdida parcial o completa de la inmunoreactividad por el antígeno y/o el "enmascaramiento" del mismo (Key, 2002). Aunque algunos antígenos no se preservan bien después de la fijación en fijadores a base de formaldehído, muchos pueden demostrarse después del uso de métodos de pre- tratamiento apropiados, como la digestión con enzima proteolítica y/o recuperación antigénica (Farmilo y Stead, 2002).

### Principio y técnica

La recuperación antigénica es un método usado para desenmascarar antígenos que han sido cubiertos por el formol (fijador). El principio de recuperación antigénica depende de la aplicación de calor, por tiempos variables, a los cortes de tejido FFPE en un medio acuoso. Después de desparafinar y rehidratar los cortes de tejido, las láminas normalmente se sumergen en una solución acuosa llamada "solución de recuperación". La mayoría de las soluciones de recuperación comparten un pH que se acerca a 2, 6, 8 o 10. Luego de la inmersión en la solución de recuperación pre-calentada, los recipientes que contienen las láminas se exponen al calor, siendo este el paso más crítico y el grado al que puede restaurarse la inmunoreactividad se relaciona directamente con la duración de la incubación y la temperatura alcanzada.

Los métodos de calentamiento normalmente utilizados incluyen el uso de hornos de microondas, autoclaves, vaporeras, ollas a presión y baños de María.

Aunque la temperatura óptima no se ha establecido, la mayoría de los métodos de AR aplican temperaturas cercanas al punto de ebullición del agua. La duración óptima de la exposición para calentar puede variar de 10 a 60 minutos y puede depender en alguna medida de la duración de la fijación en formalina (Key, 2002).

La recuperación antigénica consiste de dos pasos: primero la recuperación de epítopes y segundo la digestión enzimática. Todos los tejidos fijados en formol



necesitan de recuperación de epítopes; dependiendo del anticuerpo algunos necesitan de digestión enzimática (Sedano, 2005).

Las soluciones buffer más utilizadas para la recuperación de antígenos son:

- Solución de buffer citrato pH= 6.0 de 0.1 molar
- Solución de buffer tris con tween (detergente)

a. Recuperación de Epítopes

*El calentamiento de secciones de tejidos desparafinados dentro de una solución recuperadora de antígenos*, consiste en calentar secciones de tejido desparafinados, dentro de un recipiente de plástico resistente al calor lleno de solución buffer, en un horno microondas. La incubación de 20 minutos parece ser la más satisfactoria, para la mayoría de los antígenos y protocolos de fijación. El enfriado posterior es normalmente lento, requiriendo otros 20 a 30 minutos. El calor es obviamente de gran importancia al revertir los daños causados por la fijación con formalina y la inclusión en parafina. Cualquiera sea el mecanismo, algunas uniones cruzadas inducidas por la formalina deben permanecer intactas ya que sin éstas, las proteínas serían desnaturalizadas por el calor usado durante la AR (Key, 2002), el método se fue perfeccionando rápidamente reemplazando la solución con distintos "buffers", variando la intensidad y el tiempo de la irradiación. Obteniéndose mejores resultados con la inmersión de los cortes en "buffer" de citrato a pH 6,0 e irradiación antes de realizar la inmunomarcación (Gimeno *et al.*, 2003).

Se ha propuesto que la inmunoreactividad era facilitada por un aumento en la permeabilidad de las membranas de la célula, proporcionando así acceso a antígenos celulares y antígenos nucleares previamente enmascarados. La modificación incluye la incorporación de una cantidad pequeña de "detergente" en la solución de recuperación (Key, 2002).

*El calentamiento de secciones de tejido sin desparafinar dentro de una solución recuperadora de antígenos*, se lleva a cabo con una sustancia comercial "Declere"; reactivo con emulsificantes que desparafina, hidrata y desenmascara antígenos de muestras fijadas en formol y procesadas por el método de parafina (Sedano, 2005).

b. Digestión enzimática

La digestión enzimática proteolítica compensa la naturaleza impermeable de los fijadores no coagulantes actuando como mordiente sobre el tejido y permitiendo exponer los determinantes ocultos (Key, 2002), los tejidos expuestos prolongadamente a la formalina deben ser tratados con enzimas proteolíticas, tales como tripsina o pepsina para liberar sitios de unión antigénica (Mills, 1992). El pre tratamiento enzimático debe ser usado con cuidado para evitar daño tisular, porque la exposición excesiva podría debilitar la coloración o crear falsos negativos debido a la digestión de proteínas de interés (Elías, 1990).

Para la digestión enzimática, los agentes proteolíticos universales más utilizados son:

- Solución de pepsina (4 mg x ml) en HCl 0.01 NpH= 2,25
- Solución de tripsina

Función de los métodos de recuperación:

- ✓ Romper los lazos de unión en cruz inducidas por el formol entre los epítopes y las proteínas no relacionadas,
- ✓ Permite una mejor penetración del anticuerpo y accesibilidad hacia los epítopes
- ✓ Por último, desnaturalizar o renaturalizar proteínas descubriendo de este modo el epítope.

Beneficios de los métodos de recuperación (Sedano, 2005):

- ✓ Es superar los resultados falsos negativos de tejidos sobrefijados,
- ✓ Producir resultados notablemente mejorados para un amplio rango de anticuerpos monoclonales y sueros policlonales,
- ✓ Expandir el rango de anticuerpos útiles para tejidos procesados por el método de la parafina,
- ✓ Incrementar la utilidad de materiales de archivo para estudios retrospectivos,
- ✓ Reducir el color de fondo o "background", pues permite titular el anticuerpo a una dilución más alta.

El impacto de los métodos de recuperación antigénica ha sido enorme en Patología Humana y lo será aún mayor en Patología Veterinaria (Gimeno *et al.*, 2003), muchos marcadores, que previamente se creían perdidos por el proceso FFPE, pueden demostrarse ahora rutinariamente, mediante la recuperación antigénica. La AR inducida por calor, ha sido decisivamente más exitosa que el uso de enzimas proteolíticas y por consiguiente, ha afectado profundamente la práctica de la inmunohistoquímica (Key, 2002).

#### **2.10.4.3. CONTROLES**

En las técnicas inmunohistoquímicas resulta esencial la realización de controles para la validación de los resultados de la coloración inmunohistoquímica. Sin su uso, la interpretación de la coloración sería casual y los resultados de dudoso valor. Al menos, un corte control positivo y un negativo conocido deben ser coloreados junto al preparado problema. El reemplazo del anticuerpo primario específico por suero de un animal no inmunizado, debe arrojar un resultado negativo (Boenisch, 2002; Gimeno *et al.*, 2003).

El objetivo primordial de los controles del reactivo, es determinar si los anticuerpos primarios y secundarios son específicos para sus antígenos blanco. Es indispensable

probar el anticuerpo primario en inmunohistoquímica primero para determinar la dilución óptima en el tejido positivo y luego utilizando un panel amplio de tejidos adicionales donde es conocido si contienen o no el antígeno en estudio. El anticuerpo secundario (puente) debe absorberse por afinidad para hacerlo no reactivo a las proteínas del tejido. En la práctica, la mayoría de los laboratorios usan como control un suero no inmune o la fracción de inmunoglobulina correspondiente de la misma especie en lugar del anticuerpo primario, o seleccionan un anticuerpo primario de especificidad irrelevante.

Para los controles de tejido negativo, los especímenes deben procesarse (fijados, incluidos) en forma idéntica al desconocido, pero no contener el antígeno buscado. Mientras que los controles de tejido positivos, deben procesarse en forma idéntica al espécimen y contener el antígeno buscado. En algunos casos, será ventajoso que este tejido de control colorea positivo en forma "marginal" para determinar no sólo la presencia del antígeno, sino además cualquier pérdida de sensibilidad del anticuerpo (Boenisch, 2002).

#### **2.10.4.4. FONDO**

La coloración de fondo "background" es probablemente el problema más común en inmunohistoquímica.

En el tejido, las proteínas se tornan más hidrofóbicas por la fijación con reactivos que contienen aldehído como formalina y glutaraldehído. La magnitud de este enlace cruzado hidrofóbico de proteínas del tejido durante la fijación es principalmente una función del tiempo, la temperatura y el pH.

El almacenamiento de inmunoglobulinas también puede aumentar la hidrofobicidad y llevar frecuentemente a la agregación y polimerización lo que produce una disminución o pérdida de la reactividad inmune.

La interacción hidrofóbica entre las proteínas del tejido fijado y la fracción de anticuerpo (sus agregados y conjugados) puede ser minimizada por medio de la

caracterización cuidadosa de los reactivos y por una estricta observación y seguimiento de las condiciones óptimas de fijación.

Los anticuerpos primarios y secundarios pueden unirse a elementos de los tejidos sumamente cargados, tales como el tejido conectivo, resultando en una reacción coloreada positiva en otro sitio, el cual no contiene el antígeno primario. Estos sitios pueden "llenarse" previamente al teñido, con proteínas no inmunológicas del suero de la misma especie animal en el cual el anticuerpo secundario fue producido. Este "llenado" de los sitios cargados previene la unión del anticuerpo secundario al tejido, y reduce grandemente la reacción inespecífica (Mills, 1992), una medida ampliamente practicada para reducir la tinción de fondo causada por la interacción hidrofóbica es el uso de una "**proteína bloqueante**", ya sea en un paso por separado o a través de su adición al diluyente del anticuerpo. Sin embargo, esto sólo tendrá éxito si la proteína para bloquear es del tipo que pueda competir eficazmente con la IgG (o sus agregados o conjugados) por los sitios de unión hidrofóbicos en el tejido. La incubación separada con una solución que contenga proteína bloqueante debe llevarse a cabo inmediatamente antes de la aplicación del anticuerpo primario. La solución deberá contener proteínas idénticas a aquéllas presentes en el anticuerpo secundario o anticuerpo marcado pero no a las del anticuerpo primario para prevenir la unión inespecífica del anticuerpo secundario (Boenisch, 2002).

Una segunda fuente de reacción inespecífica es la producida por la peroxidasa endógena. La mayoría de los tejidos contienen peroxidasa, una enzima que reacciona con el sustrato cromogénico, de la misma manera que el reactivo peroxidasa unido al antígeno. La actividad de la peroxidasa endógena está localizada generalmente en áreas, las cuales contienen un gran número de células sanguíneas (Mills, 1992). La actividad de la peroxidasa endógena puede ser inhibida en forma irreversible tratando los tejidos con una solución al 3% de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) durante 5-10 minutos. Mills (1992), menciona que el uso de la solución comercial de peróxido de hidrógeno al 3% debe ser evitado, ya que puede causar daño al tejido debido al excesivo burbujeo y gas, especialmente en tejidos que contienen mucha sangre.

La tinción de fondo causada por la reactividad cruzada del anticuerpo (monoclonal y policlonal) puede resultar cuando uno o varios epítopes del antígeno blanco son compartidos con otras proteínas del tejido. La reactividad cruzada inespecífica de un anticuerpo con epítopes similares o disímiles en antígenos diferentes también puede ser la causa de un fondo confuso.

La coloración difusa de todos o de la mayoría de los elementos del tejido dentro de un área, puede ser causada por lesión física al tejido, por tejido que se seca antes de la fijación o por la incompleta penetración del fijador en el tejido (Boenisch, 2002).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR DE ESTUDIO**

Las muestras de piel de alpacas adultas de raza Huacaya, criados sobre los 4 200 m.s.n.m., fueron obtenidas de la SAIS (Sociedad Agrícola de Interés Social) “Túpac Amaru”, unidad productiva de Cochas (Junín). Para el estudio histológico de las diferentes fases de crecimiento del pelo (anagen, catagen y telogen) las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Histología, Embriología y Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria - UNMSM; la estandarización y aplicación de la técnica Inmunohistoquímica se realizó en el Laboratorio de Procedimientos Histológicos del Servicio de Patología Clínica del Hospital María Auxiliadora (San Juan de Miraflores- Lima Sur).

#### **3.2. ANIMALES**

Muestras de piel de 40 alpacas adultas Huacaya (de ambos sexos), fueron colectadas durante el mes de Noviembre. La edad de los animales fluctuaron entre 2.5 a 3 años.

#### **3.3. MATERIALES**

##### **3.3.1. Materiales para la toma de muestras**

- Pinzas simples
- Tijeras
- Mango de bisturí N° 4 y hoja de bisturí N° 21
- Sacabocados de borde cortante acerado (6 mm de diámetro).
- Guantes sintéticos no estériles
- Formol neutral bufferado al 10%
- Frascos de plástico de boca ancha y tapa rosca con etiquetas
- Plumones indelebles
- Fichas de muestreo
- Yodo.

### **3.3.2. Materiales de laboratorio**

Procesamiento histológico:

- Alcohol al 70%
- Alcohol al 95%
- Alcohol Absoluto
- Xilol
- Parafina en escamas
- Láminas portaobjetos
- Láminas cubreobjetos
- Bálsamo de Canadá para montaje
- Lapicero marcador de vidrio
- Colorantes: Hematoxilina - Eosina
- Copa de coloración
- Autotechnicom modelo 2A
- Micrótopo Spencer
- Baño Maria
- Microscopio Binocular Zeiss
- Cámara fotográfica digital Sony adaptable a microscopio binocular



#### Procesamiento inmunohistoquímico:

- Agua destilada
- Poli-L- lisina Sigma
- Beaker de 250cc
- Micropipetas de 50 $\mu$ l y de 100  $\mu$ l
- Buffer Citrato
- Buffer Fosfato Salino
- Agua oxigenada al 3%
- Detergente (Pinesol)
- Coplin
- Estufa Leitz
- Anticuerpo monoclonal a PRLR concentrado 100  $\mu$ g, marca Affinity BioReagents (MA1 -610)
- Dilutor para anticuerpo concentrado 125 ml, marca Lab Vision (TA-125- UDX)
- Kit Universal de Inmunohistoquímica: anti- polivalente, HRP/DAB. Marca Lab Vision (TP- 015- HD)
- Horno microondas
- Alcohol absoluto
- Alcohol corriente
- Xilol
- Láminas portaobjetos
- Láminas cubreobjetos
- Bálsamo de Canadá
- Micrótopo Spencer
- Baño María
- Lapicero marcador de vidrio
- Microscopio Binocular Zeiss
- Cámara fotográfica digital Sony adaptable a microscopio binocular

### 3.4. MÉTODOS

#### 3.4.1 Toma de Muestra

Inmediatamente realizada la esquila con ayuda de un bisturí se procedió al afeitado de la zona a muestrear para eliminar la fibra excedente. Las muestras fueron obtenidas mediante una biopsia incisional de piel de la fosa infraespinosa de la zona escapular (lado derecho), éstas se realizaron con ayuda de sacabocados (6 mm de diámetro) e inmediatamente mantenidos en formol neutral bufferado (NBF) al 10% para su fijación (24-48 horas), en frascos debidamente rotulados. Cada muestra se identificó con el número correspondiente del animal, el sexo y la edad; permitiendo así un adecuado procesamiento de las mismas en el Laboratorio de Histología, Embriología y Patología de la FMV- UNMSM (**Figura 1 y 2**).



**Figura 1.** Afeitado de la zona a muestrear (zona escapular derecha), animal previamente esquilado.



**Figura 2.** A. Toma de muestra con sacabocado. B. Muestra mantenida en formol neutral bufferado al 10%

### **3.4.2. Procesamiento histológico**

Las muestras obtenidas fueron reducidas post-fijación en dos cortes cada una y luego se procedió a lavarlas en agua por 30 minutos para así dejar el formol libre; luego se sumergió en alcohol al 70% (en dos baños), alcohol al 95% (en dos baños), alcohol al 100% (en dos baños) todos por un tiempo de 2 horas en cada baño para deshidratarlas. Seguidamente, fueron sumergidas en xilol puro por una hora, con dos repeticiones; estas fueron retiradas cuando se observó las piezas de un color transparente. De ahí se llevaron a la estufa realizándose dos baños de parafina, por una hora cada baño y posteriormente se incluyeron las muestras en parafina. Para la inclusión las muestras se ubicaron en dos posiciones: una oblicua y la otra horizontal para así tener un corte histológico transversal y uno longitudinal de los folículos pilosos.

### **3.4.3. Procesamiento Inmunohistoquímico**

#### **Inmunohistoquímica, reactivos:**

#### **Anticuerpo Monoclonal**

Se uso el anticuerpo monoclonal U5 Anti - Receptor de prolactina de hígado de rata IgG1 (Laboratorio Affinity BioReagents), de presentación de 100 µg liofilizado, se reconstituyó con un diluyente para anticuerpo (LabVision). La primera dilución del anticuerpo se hizo en 5ml del dilutor, es decir se obtuvo una concentración de 20 µg/ml, pero para el desarrollo de la parte experimental se realizó nuevas diluciones, se tomo 1 ml del anticuerpo concentrado (20 µg) y se diluyo en 4 ml del dilutor (trabajando así en concentraciones de 5 µg/ml, según recomienda el protocolo de trabajo del laboratorio donde fue comprado el anticuerpo).

### **Buffer Citrato (pH 6.0)**

Para la preparación del buffer citrato se necesita de una Solución de ácido cítrico al 0.1M (**Solución A**): Acido cítrico monohidratado 21.01 g. en 1 litro de agua destilada y Solución de citrato de sodio 0.1M (**Solución B**): Citrato trisódico dihidratado 29.41 g. en 1 litro de agua destilada.

La solución de trabajo se obtiene: mezclando 9 ml de la **Solución A** y 41 ml de la **Solución B** en 450 ml de agua destilada.

### **Buffer Fosfato Salino (PBS, pH 7.4)**

Se obtiene mezclando: Fosfato de sodio, dibásico anhidro (1.48 g.), fosfato de sodio, monobásico anhidro (0.43 g.) y cloruro de sodio (7.20 g.) en 1 litro de agua destilada.

### **Solución Detergente**

Para la preparación de la solución detergente se utilizó: 12.5 ml de pinesol diluido en agua destilada (987.5 ml).

### **Cromógeno Diaminobencidina (DAB)**

Para su preparación se necesita de: 1 gota de cromógeno DAB y 1 ml de sustrato DAB mezclándose bien mediante agitación. El cromógeno sólo se prepara minutos antes de su uso y no puede ser conservado después de su preparación.

### ***Protocolo Inmunohistoquímico***

Se utilizó el protocolo descrito por Sedano *et al.* (2005), el cual también es aplicado en el Hospital María Auxiliadora. Se debe mencionar que se estandarizó el tiempo de recuperación antigénica para el tejido en estudio.

Para la demostración inmunohistoquímica de receptores de Prolactina, se utilizó el método Streptavidina - Biotina Peroxidasa (LSAB): las muestras de piel embebidas en cera parafina fueron seccionadas seriadamente (3  $\mu$ m) y montadas en portaobjetos con poli-L-lisina, inmediatamente se llevaron a la estufa a 70° C durante 7 minutos. Luego éstas fueron desparafinadas en xilol e hidratadas en alcohol y lavadas en agua corriente. Posteriormente, se realizó la Recuperación Antigénica (AR) colocando las láminas en el coplin (envase plástico resistente al calor), se lleno el recipiente con Buffer Citrato pH 6.0; (10 minutos) y se llevo al microondas. Al iniciarse la ebullición se detiene el microondas para agregar más buffer citrato, repitiéndose este procedimiento sucesivamente hasta culminar los 10 minutos. Luego se agregó una solución detergente al coplin y se llevó nuevamente al microondas de manera similar a lo descrito anteriormente (10 minutos). Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego se procedió al lavado de láminas (3 veces) con agua destilada, se eliminó el sobrenadante y se agregó peróxido de hidrógeno al 3% (20 minutos). Pasado ese tiempo se lavó (3 veces) con agua destilada e inmediatamente se realizó el lavado con Buffer Fosfato Salino (PBS, pH 7.4) (3 x 2 min. c/u) y se secaron las láminas. Mas adelante se aplicó Ultra V Block (20 minutos), se secó el exceso de reactivo pero no se lavó. Se aplicó luego el Anticuerpo Primario Monoclonal: Anti- Receptor de Prolactina U5 (1 hora a temperatura ambiente). Posteriormente, se lavó nuevamente con PBS (igual al anterior), se secaron las láminas y se agregó el Anticuerpo Secundario caprino anti- polivalente biotinilado (mezcla IgG anti ratón y anti conejo), por 20 minutos. Se lavó con PBS y se secaron las láminas. Luego se agregó la Enzima Conjugada Streptavidina Peroxidasa (20 minutos), se lavó con PBS y se secaron las láminas, procediendo luego a la aplicación del cromógeno DAB (10 minutos). Inmediatamente se lavaron las láminas con agua destilada. Finalmente las láminas fueron deshidratadas y aclaradas para luego ser montadas con bálsamo de Canadá.

Como control positivo se utilizó glándula mamaria de alpaca, los controles negativos se obtuvieron omitiendo la aplicación del anticuerpo primario.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA

#### **Folículos Pilosos**

*Sección longitudinal:* estos estuvieron relativamente en moderada cantidad, mostrando algunos de ellos comunicación con el exterior. La mayoría de los folículos pilosos se encontraron predominantemente en **fase anágena (Figura 3)**, los cuales presentaron la papila dermal (núcleos de forma fusiforme en un estroma fibroso) conectada a la vaina pilosa fibrosa que la rodea en el polo inferior; mientras que en la parte superior y lados están rodeados por las células epidérmicas de la matriz (células cuboidales indiferenciadas) del pelo; las células de la matriz están confinadas en la porción más inferior del folículo. La sección bulbosa, expandida, en la parte inferior del folículo incluye a la matriz del pelo y la papila dermal y toma el nombre de "bulbo piloso". Aquí también se observa la vaina de la raíz interna (IRS) y externa (ORS), así como la vaina de tejido conectivo (CTS). La **fase catágena (Figura 4)** en escasa cantidad, casi ausente; presentaron las células de la matriz retraídas de la papila dermal observándose una papila "desnuda", rodeada solamente por una delgada capa de células epiteliales. Por encima de la papila dermal el epitelio folicular permanece como una delgada columna de células indiferenciadas; se observó también la vaina de la raíz interna y externa está última

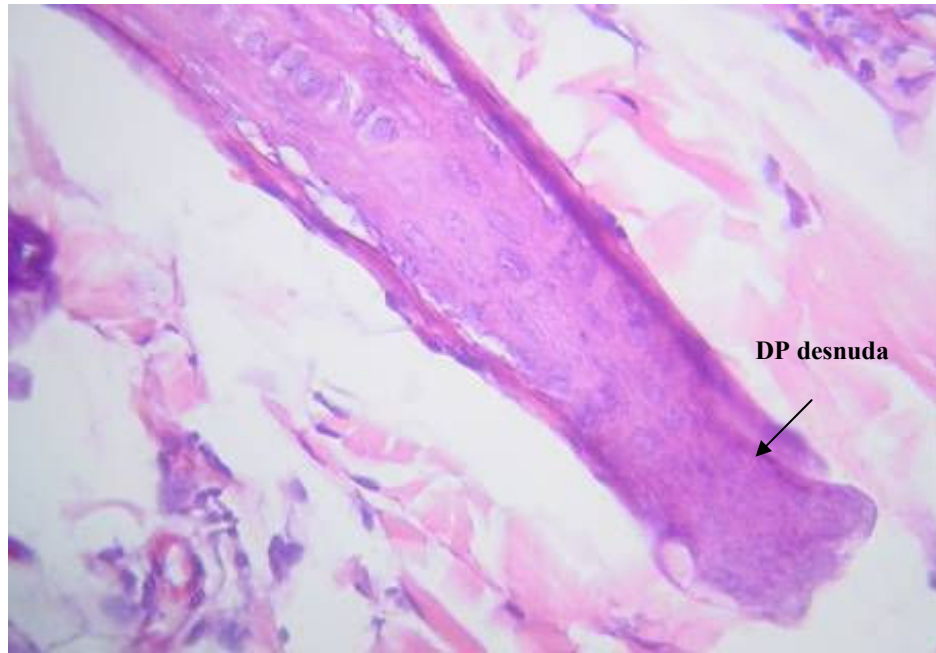
se muestra engrosada y corrugada; mientras que la vaina del tejido conectivo también se observa engrosado.

**La fase telógena (Figura 5)**, se caracterizó por estar presente en mayor cantidad en comparación con el estadio catagen. Estos presentaron una papila dérmica desnuda y sus núcleos se disponen en forma de una pelota compacta a manera de una cabeza de alfiler, seguido por una protuberancia de células de formas irregulares que formara al germen piloso secundario. El telogen se caracteriza por no presentar ninguna vaina.

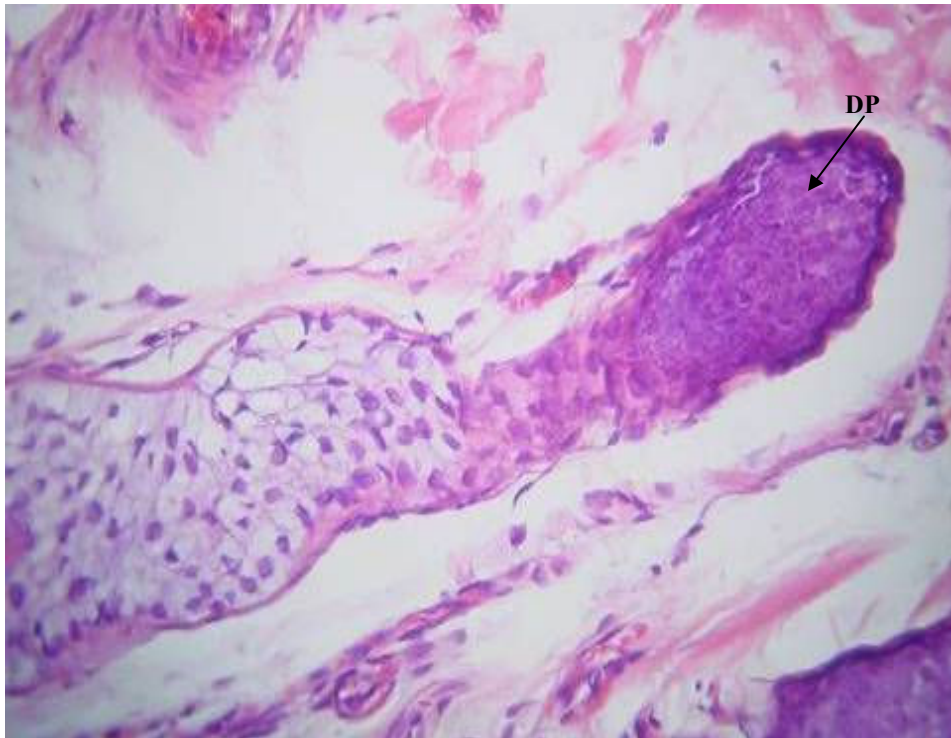




**Figura 3.** Folículo piloso en fase anágena, corte longitudinal. **DP**, papila dermal; **GM**, matriz germinal; **IRS**, vaina de la raíz interna; **ORS**, vaina de la raíz externa; **CTS**, vaina de tejido conjuntivo. Coloración H & E. 400X.



**Figura 4.** Folículo piloso en fase catágena, corte longitudinal. Se observa la papila dermal (**DP**) desnuda, cubierta solamente por una delgada capa de células epiteliales planas. Coloración H & E. 400X



**Figura 5.** Corte longitudinal de folículo piloso en estadio telogen. La **DP** se dispone en forma de una pelota compacta. Coloración H & E. 400X

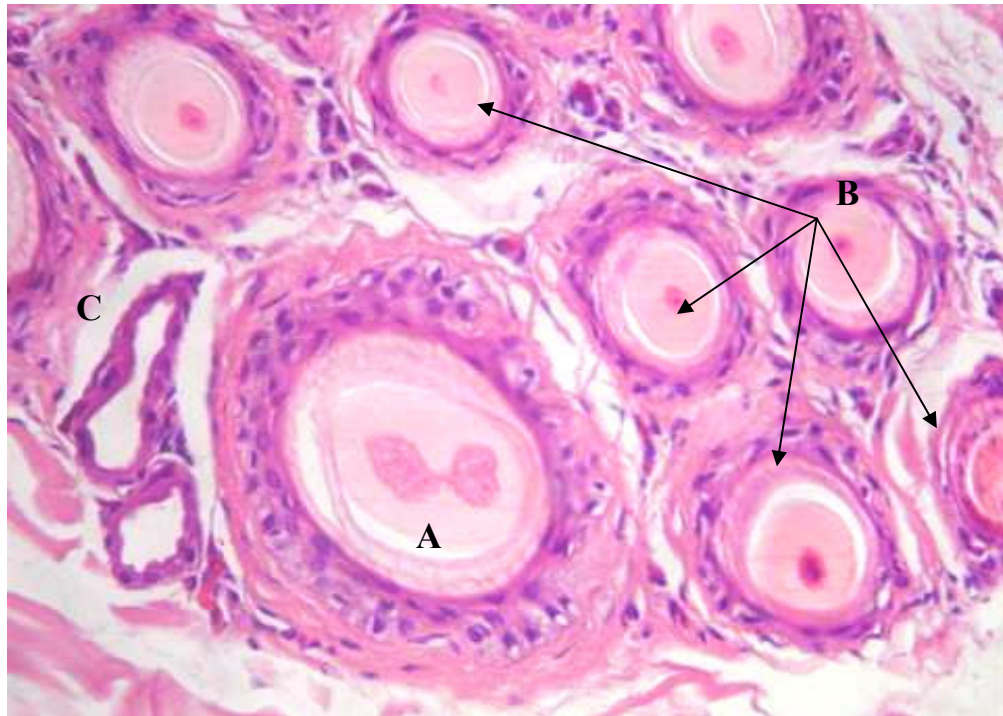
*Sección transversal:* la distribución y disposición de los folículos pilosos son muy similares en la mayoría de los cortes observados, caracterizándose por presentar mayormente folículos pilosos compuestos, formados por varios folículos de diferentes tipos y grosores, rodeados por tejido conjuntivo denso. La emergencia de estos folículos en la superficie de la piel es única.

A estos folículos pilosos compuestos se le conoce como nidos foliculares los cuales se encuentran conformados por un folículo piloso primario y varios secundarios (**Figura 6**). El primario se observa más grande y de mayor diámetro con respecto al secundario. El primero se presentó asociado siempre a glándulas sebáceas y sudoríparas.

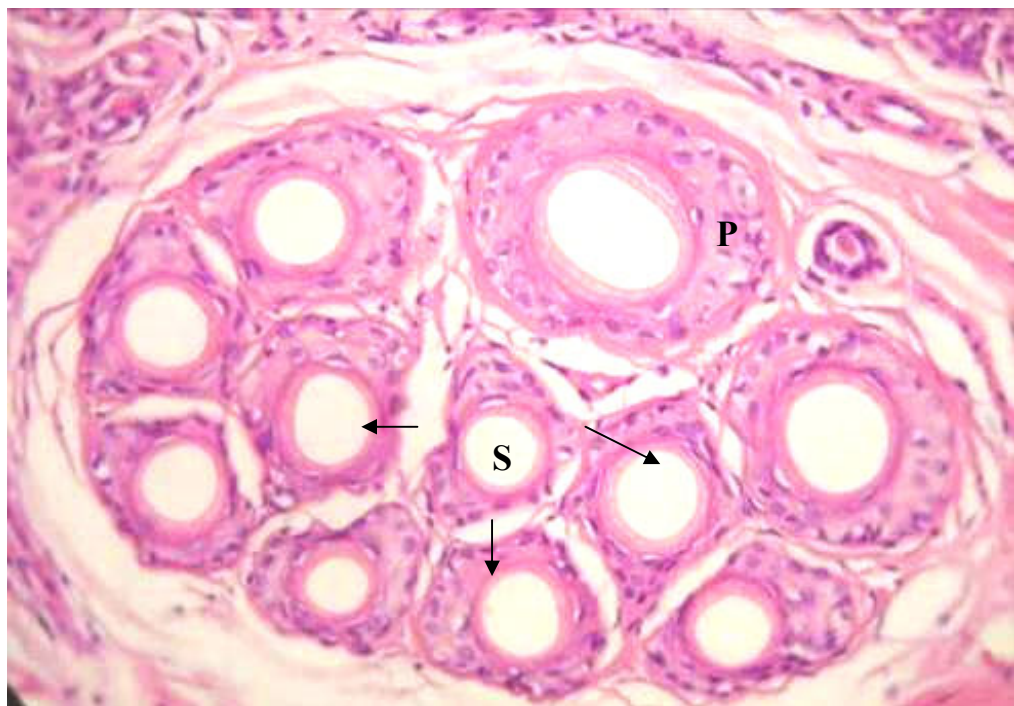
La proporción de folículos pilosos secundarios a primarios (S/P) es muy variado, entre las alpacas se observó que en un mismo individuo existen variaciones en la relación S/P habiéndose observado extremos de 7/3, 8/1, 9/1, 10/1, 13/1, 23/1, 25/1 (**Figura 7**).

Al corte transversal la fibra en su folículo piloso anagen, presenta de adentro hacia fuera las siguientes estructuras: médula, corteza, cutícula, vaina de la raíz interna (conformado por sus capas: cuticular, de Huxley y de Henle), vaina de la raíz externa y vaina de tejido conectivo (**Figura 8**).

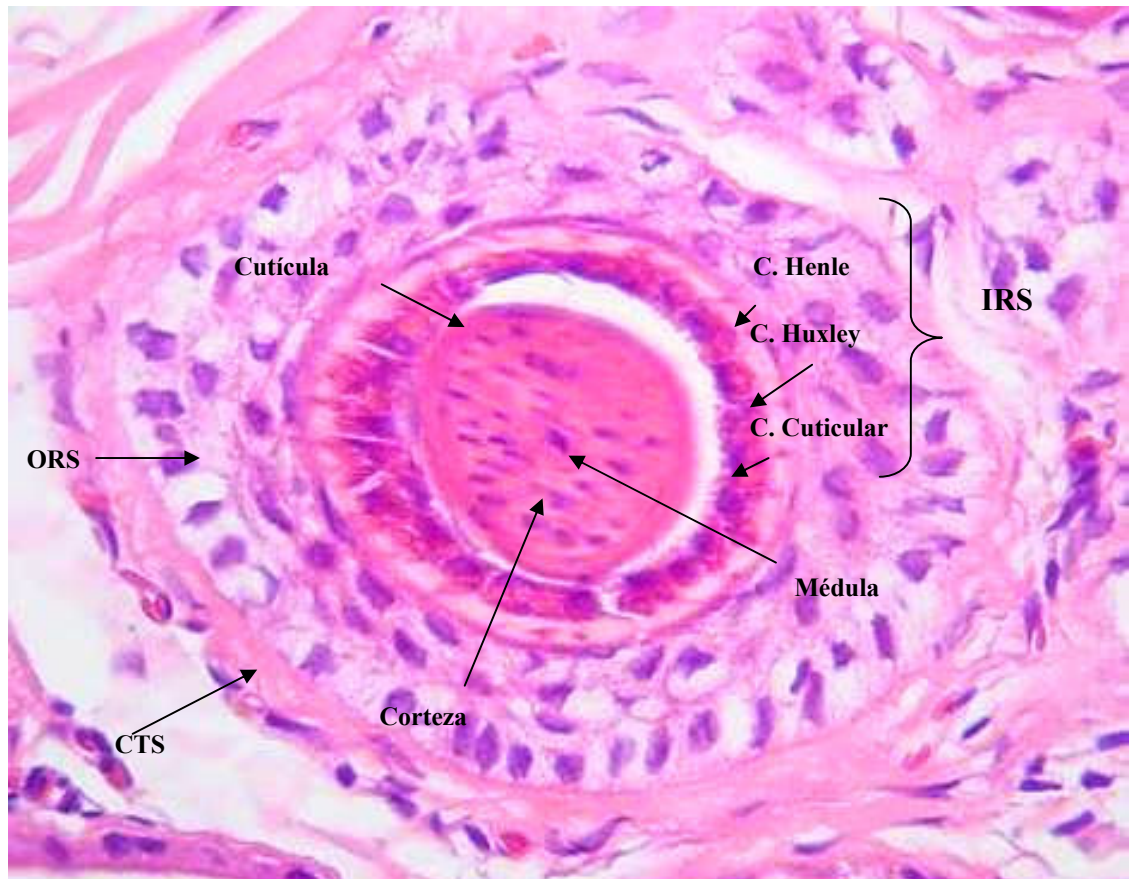




**Figura 6.** Corte transversal de folículo piloso primario (A) rodeado por varios secundarios (B), se observa también 2 glándulas sudoríparas (C). Coloración H & E. 400X



**Figura 7.** Corte transversal, relación folículo secundario a primario S/P. aquí se observa relación 10 a 1. Coloración H & E. 400X



**Figura 8.** Folículo piloso anágeno en corte transversal, con sus respectivas estructuras. **IRS**, vaina de la raíz interna conformado por la capa Cuticular, (capa interna), Huxley (capa media) y Henle (capa externa); **ORS**, vaina de la raíz externa; **CTS**, vaina de tejido conectivo. Coloración H & E. 1000X.

## 4.2. DESCRIPCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cortes de piel fijados en formol neutral bufferado (NBF) al 10% y expuestos a la técnica Inmunohistoquímica empleando el método Streptavidina - Biotina Peroxidasa, usando diaminobencidina (DAB) como cromógeno para demostrar la presencia de receptores para Prolactina en folículos pilosos de piel de alpaca se obtuvo introduciendo cambios en los tiempos de recuperación antigénica, brindándonos los siguientes resultados:

### *Localización Inmunohistoquímica de la inmunoreactividad de los receptores de prolactina en folículos pilosos primarios y secundarios de la fibra de alpaca*

Se observó inmunoreactividad a receptores de prolactina en todas las muestras de piel examinadas tanto en machos como en hembras, bajo la forma de coloración (manchas) marrón oscura.

Los folículos pilosos primarios y secundarios mostraron patrones consistentes de inmunoreactividad, tanto en los estadios de anagen, catagen y telogen (**Figura 9**). Las células de la papila dermal como de la matriz germinal evidenciaron inmunoreactividad a receptores de prolactina (**Figura 10**). A lo largo de la longitud del folículo, la inmunoreactividad de los receptores de prolactina de la vaina de la raíz externa se dio al menos al nivel del bulbo y fue mayor cerca de la zona superior del folículo. Los cortes transversales de los folículos a diferentes niveles, desde la zona de desprendimiento hasta el bulbo, ilustran el grado del lugar dependiente de la expresión de los receptores de prolactina en la envoltura de la raíz externa e interna (**Figura 11**). La envoltura de la raíz interna mostró tinción poco consistente y este no se observó en todos los cortes transversales, así mismo, la inmunoreactividad estuvo ausente en la región superior de la envoltura de la raíz interna (**Figura 11a**), mientras que si se observó tinciones positivas como negativas a inmunoreactividad a receptores de prolactina en la envoltura de la raíz interna en la zona de transición (**Figura 11b**) y también se determinó inmunoreactividad de receptores de prolactina en la vaina de la raíz interna en el tercio inferior del folículo (**Figura 11c**).

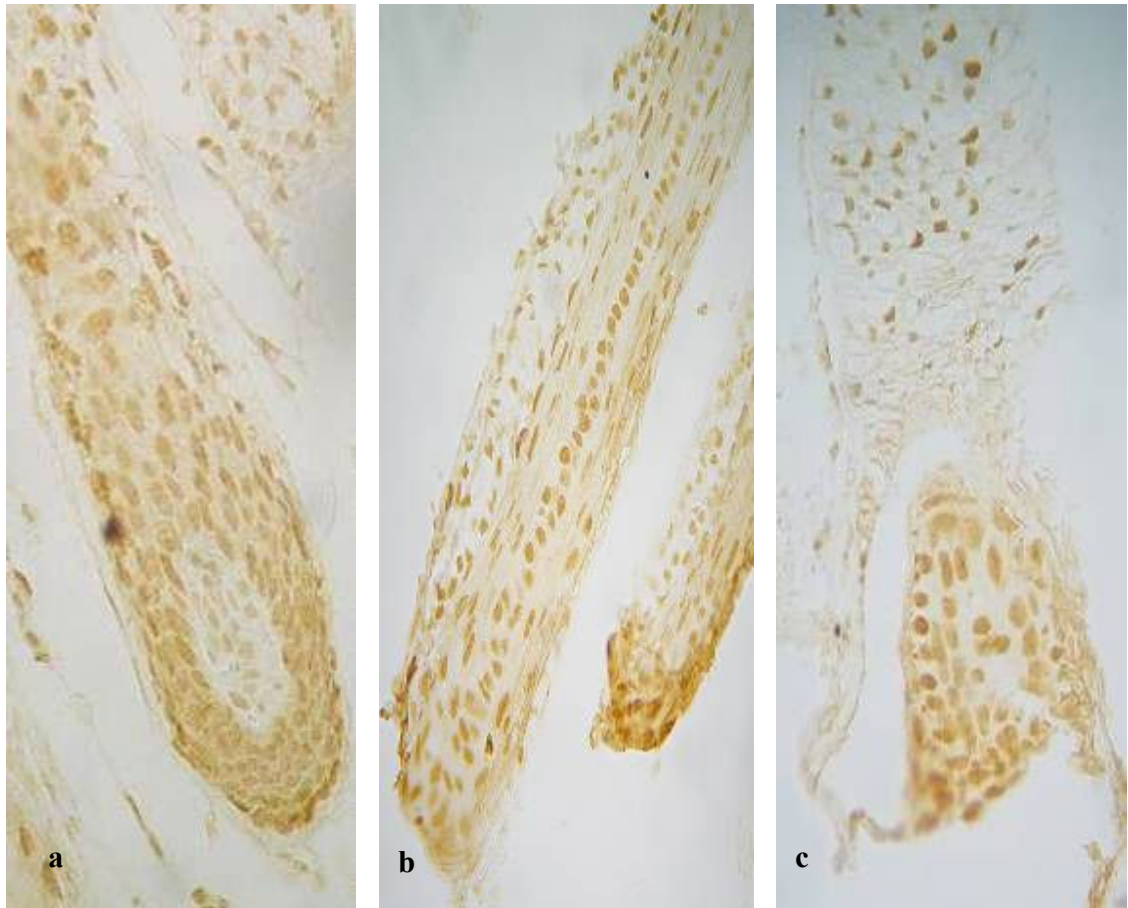
La localización celular de la inmunoreactividad de los receptores de prolactina en los folículos pilosos primarios y secundarios en las diferentes fases de crecimiento de la fibra de la alpaca, se dio principalmente en el área nuclear (**Figura 12**).

Se debe mencionar que no en todas las zonas la inmunoreactividad fue uniforme, pues hubo zonas de tinciones intensas y tenues.

#### ***Localización Inmunohistoquímica de la inmunoreactividad de los receptores de prolactina en otros tejidos cutáneos***

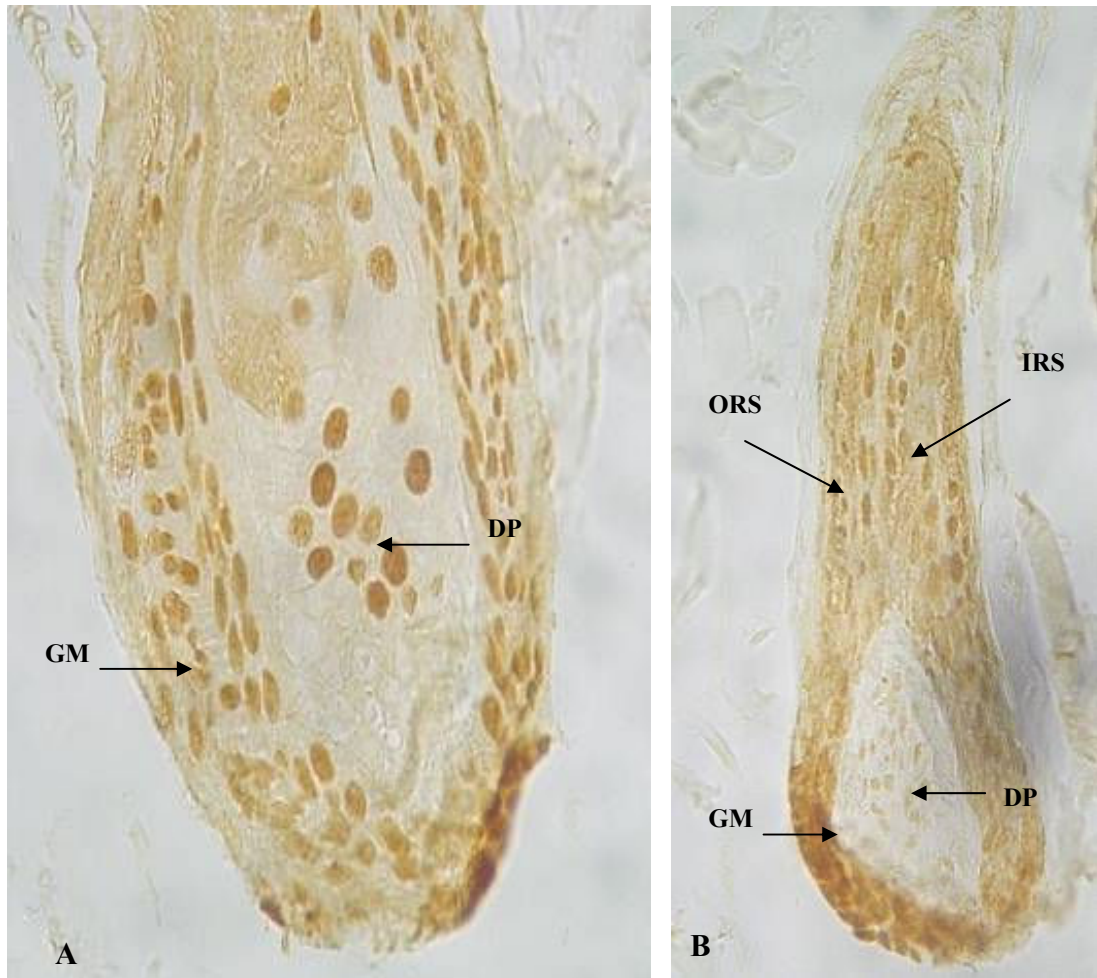
En todas las muestras de piel, las glándulas sudoríparas apocrinas (**Figura 13**), glándulas sebáceas (**Figura 14**) y la epidermis interfolicular (**Figura 15**) fueron positivas a la tinción. La inmunoreactividad a receptores de prolactina en estos tejidos cutáneos también se dieron a nivel del núcleo siendo su distribución no uniforme, así como la intensidad de la tinción. Se presentaron tinciones positivas como negativas a inmunoreactividad a los receptores de prolactina, pudiéndose observar en glándulas sebáceas sólo algunas células teñidas, así como en el epitelio de la epidermis que también mostró discontinuidad a la tinción. Sólo algunas células que conforman el conectivo de la dermis mostraron inmunoreactividad a receptores de prolactina.



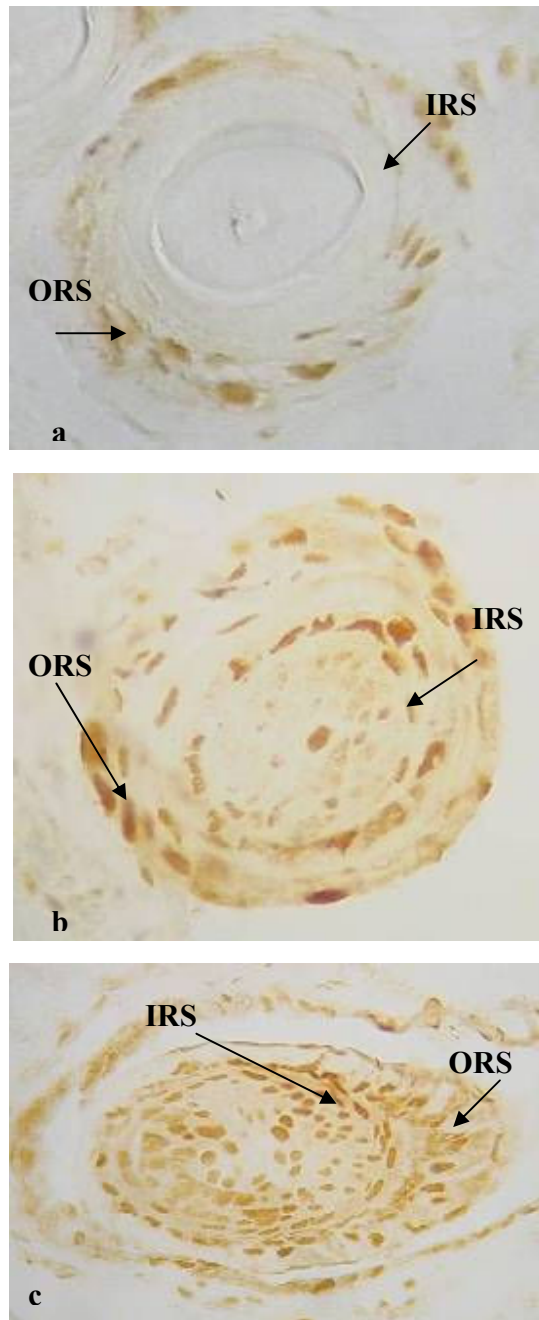


**Figura 9.** Corte longitudinal de folículos pilosos mostrando inmunoreactividad a receptores de prolactina por inmunohistoquímica utilizando el método Streptavidina- biotina peroxidasa usando DAB como cromógeno (marrón) en diversas fases. **a.** Anágena; **b.** Catágena; y **c.** Telógena. 400X.

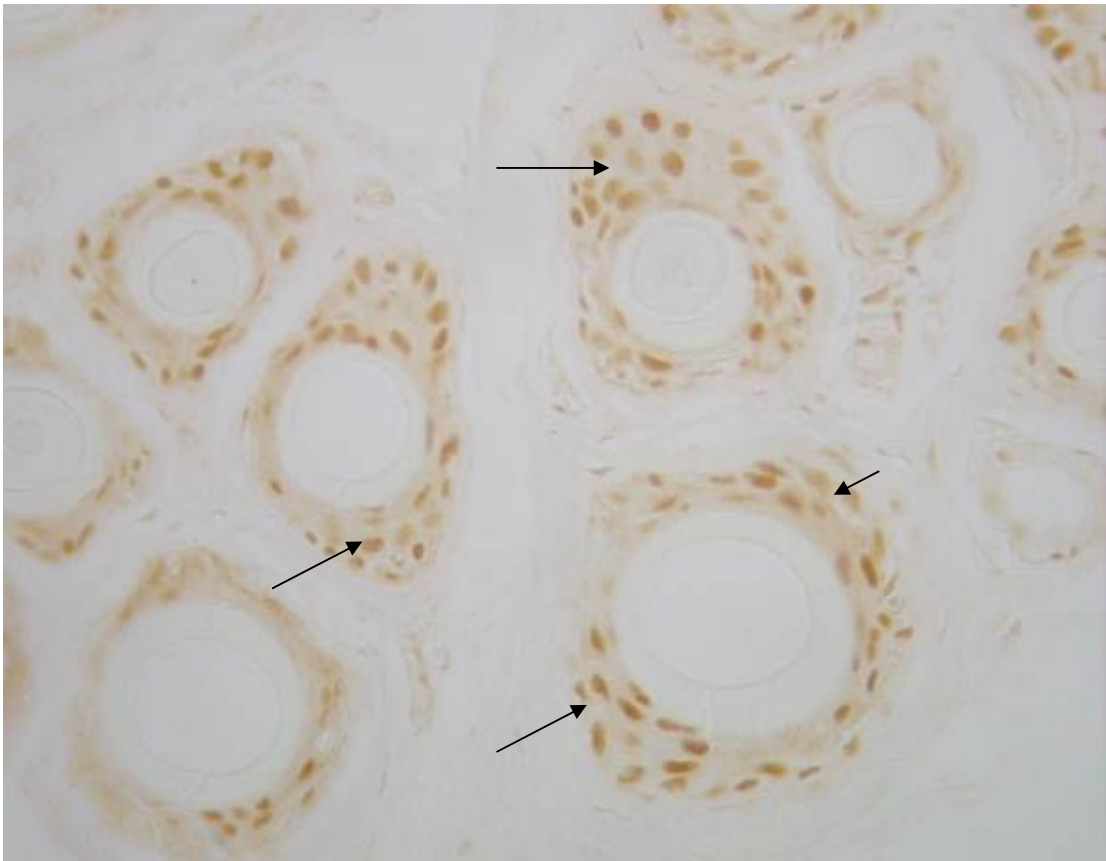




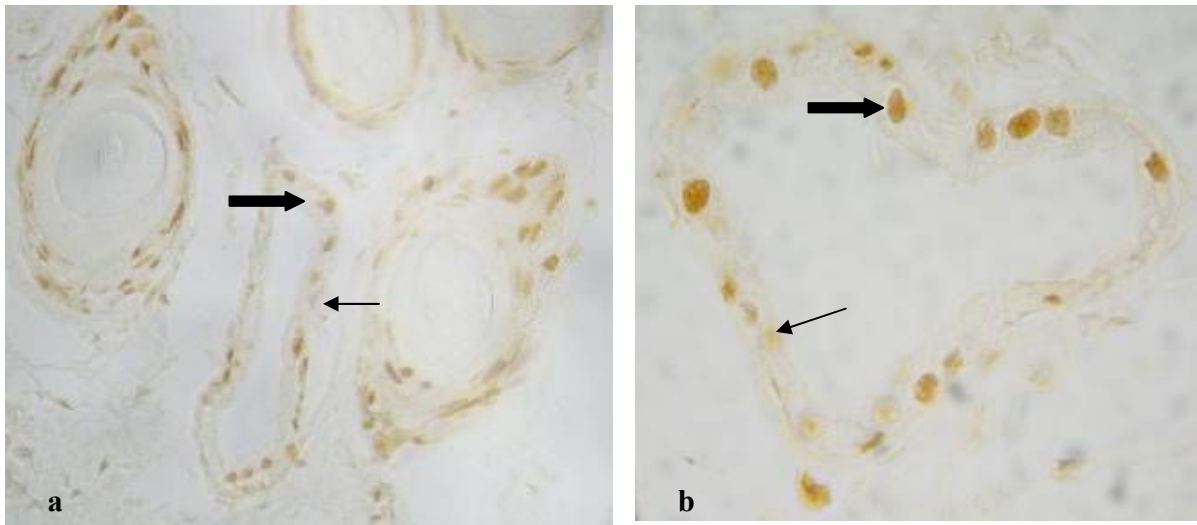
**Figura 10.** Corte longitudinal de folículo **anágeno**, ilustrando la localización de la inmunoreactividad a receptores de prolactina mediante la técnica Inmunohistoquímica, utilizando el método Streptavidina- biotina peroxidasa.  
**A.** Localización positiva de inmunoreactividad de los receptores de prolactina (ver flechas) después de la incubación con anticuerpo monoclonal anti-receptores de prolactina en células de la matriz germinal (GM) y papila dermal (DP). Vista a 1000X. **B.** Se observa (ver flechas) localización positiva en células de la GM, DP, ORS y IRS. Vista a 400X



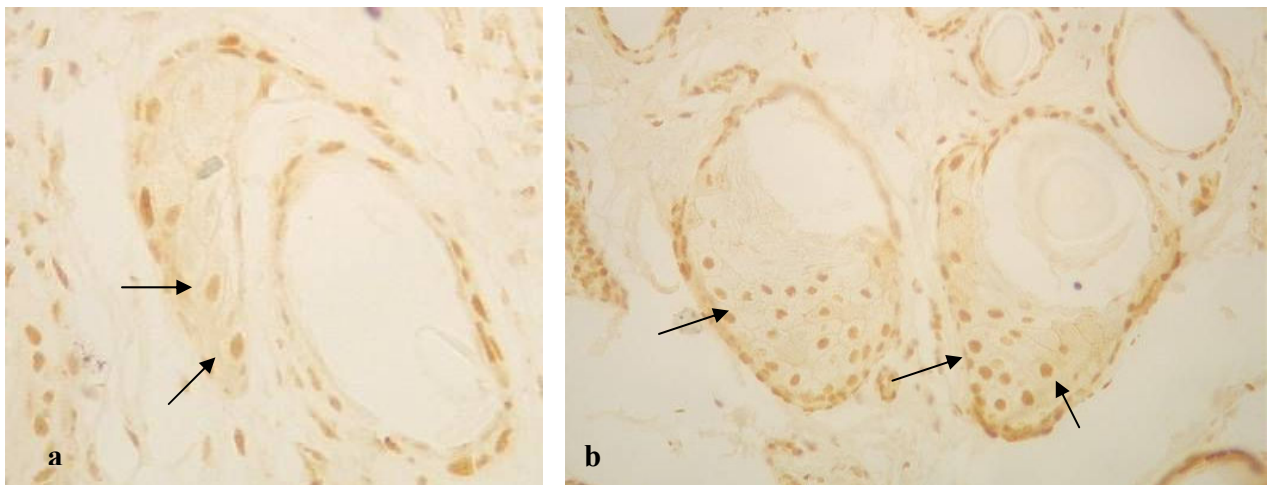
**Figura 11.** Folículo **anágen** en corte transversal, ilustrando la localización de inmunoreactividad de los PRLRs por inmunohistoquímica. **(a)** Folículo superior mostrando la inmunoreactividad únicamente en ORS. Vista 1000X. **(b)** Folículo medio (zona de transición) mostrando la inmunoreacción en IRS y ORS. Vista a 1000X. **(c)** Folículo inferior mostrando la inmunoreacción en IRS, ORS. Vista a 400X.



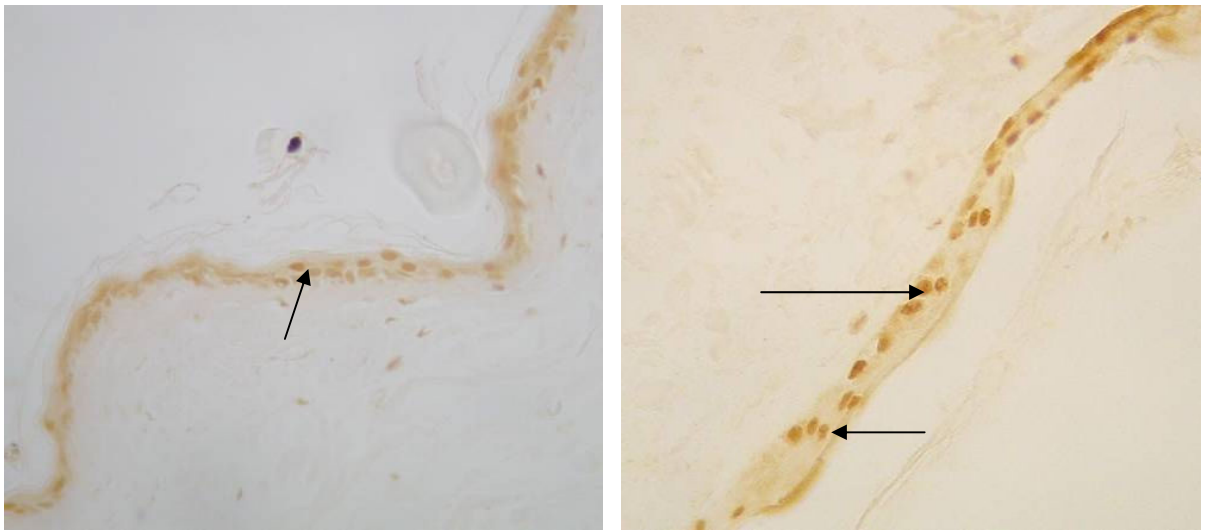
**Figura 12.** Corte transversal. Localización positiva a receptores de prolactina se dio principalmente en el área nuclear (flechas) tanto en folículos pilosos primarios y secundarios, como en todas las fases del ciclo de crecimiento de la fibra. 400X.



**Figura 13.** Localización positiva de PRLR's en glándulas sudoríparas apocrinas en corte transversal (**a** y **b**), se observa la inmunoreacción en el área nuclear (flechas); está no fue uniforme; pues no todas las células mostraron tinción positiva. 400X



**Figura 14.** Localización positiva de receptores de prolactina en glándulas sebáceas (**a** y **b**), la inmunoreacción se dio en el área nuclear (flechas) y está no fue uniforme. 400X



**Figura 15.** Localización positiva a receptores de prolactina en epidermis, se observa inmunoreactividad en el área nuclear (flechas). Vista a 400X

## V. DISCUSIÓN

Al examen histológico de la piel de alpaca se observó que posee folículos pilosos simples y compuestos, lo cual coincide con lo expresado por Gaitan (1967), Tapia (1969), Fowler (1989) y Bustinza (2001). Los folículos pilosos simples, son definidos como primarios solitarios, los cuales emergen individualmente y se encuentran siempre asociados a glándulas sebáceas y sudoríparas; mientras que los compuestos se encuentran conformados por uno a varios folículos pilosos primarios grandes rodeados por múltiples secundarios, los cuales comparten un infundíbulo folicular común y único, similar a lo encontrado por Atlee *et al.* (1997) en llamas.

Se observó también que la mayor parte de folículos pilosos primarios presentaron una marcada médula eosinofílica, mientras que en los secundarios la medulación fue variable, lo cual concuerda con lo reportado en alpacas por Bustinza (2001) y en llamas por Atlee *et al.* (1997), a diferencia de lo reportado en ovinos que presentan folículos pilosos primarios medulados, mientras que los secundarios carecen de médula (Dellmann y Brown, 1980).

Con respecto a la relación de folículos pilosos secundarios y primarios (S/P), encontramos una gran variación dentro del mismo individuo que va desde 9/1 la más baja y 25/1 la más alta, así como también hay gran variación entre individuos de la misma especie, semejante

a lo reportado por Fowler (1989) y Bustinza (2001) en alpacas, y en llamas por Atlee *et al.* (1997).

La mayoría de los folículos pilosos se encontraron en fase anágena lo cual podría deberse a la temporada de toma de muestras (mes de Noviembre), pues entre el amplio rango de acciones biológicas atribuidas a la prolactina se tiene que participa en el control de ciclo de pelaje de mamíferos estacionales. En ovinos, se ha reportado que el ciclo de la lana está influenciado por su medio ambiente principalmente por el fotoperiodo, pues a incrementos naturales y experimentales en la longitud del día, tiene efecto inhibitorio a corto plazo sobre los folículos en crecimiento (anágenos) de la lana, el cual es iniciado por un incremento de prolactina en el plasma (Pearson *et al.* 1996). Contrario a lo reportado en visones por Martinet *et al.* (1984), quienes determinaron que el acortamiento de los días y las concentraciones reducidas de prolactina en el plasma se encuentra asociado con el inicio del crecimiento de la fibra. Así también, reportan que se necesita de un incremento en las concentraciones de prolactina en primavera para la reactivación de los folículos latentes (telógenos).

A la técnica inmunohistoquímica se demostró que los receptores de prolactina (PRLR), están localizados en las células de la papila dermal, matriz germinal, así como en las células de las vainas de la raíz externa e interna las cuales fueron también positivas a la reacción inmunohistoquímica, a pesar del lugar dependiente a lo largo del folículo y la variable entre los folículos de la misma fase de crecimiento, similares a lo reportado en ovejas por Choy *et al.* (1997), quienes mediante análisis de Western Blot y Protección de ribonucleasa (RPA) también encontraron inmunoreactividad a receptores de prolactina en papila dermal, matriz germinal, vaina de la raíz externa, regiones bajas de la vaina de la raíz interna y también en la vaina de tejido conectivo de los folículos pilosos de la lana. Estos autores manifestaron que la distribución de los receptores de prolactina es descrita en los folículos que están en crecimiento (anágenos) como en los que están inactivos (telógenos). En este estudio se demostró inmunoreactividad en las diferentes fases de crecimiento de la fibra (anagen, catagen y telogen).

Asimismo, Choy *et al.* (1995) determinaron mediante Microautoradiografía la presencia de enlace radioligando específicos de receptores de prolactina en piel ovina, siendo la papila

dermal y la envoltura de la raíz externa las que exhiben un enlace más fuerte, mientras que la matriz germinal demostró una menor densidad de los lugares de unión de prolactina, así mismo las glándulas sudoríparas, sebáceas y epidermis interfolicular se unieron también a las hormonas lactogénicas. Al igual Nixon *et al.* (2002), mediante Protección de ribonucleasa, hibridación *in situ* y PCR transcriptasa reversa determinaron en piel de ovinos, la expresión de receptores de prolactina en papila dermal, vaina de la raíz externa, matriz germinal, glándulas sebáceas, sudoríparas y epidermis en los diferentes estadios de crecimiento de la lana.

Mientras que en piel murina Foitzik *et al.* (2003), detectaron PRLR en células epiteliales foliculares, siendo notablemente ausente en la papila dermal, vaina de tejido conectivo y glándulas sebáceas. Estos hallazgos fueron parcialmente consistentes con los de Craven *et al.* (2001), quienes encontraron inmunoreactividad para PRLR en la epidermis, glándula sebácea y vaina de la raíz externa del folículo piloso, pero no en la vaina de la raíz interna ni en la papila dermal de folículos pilosos anágenos de piel de ratones con el receptor de prolactina alterado.

Por otro lado, las células epiteliales planas de la envoltura de la raíz interna mostraron tinción poco consistente (irregular) y este no se observó en todos los cortes transversales, estando presente en el tercio inferior del folículo, pero se mantuvo ausente en la región superior del folículo, lo cual coincide parcialmente con lo expresado por Choy *et al.* (1997), quienes respectivamente no detectaron inmunoreactividad a receptores de prolactina en las células queratinizadas (estrato córneo, envoltura de la raíz interna en los dos tercios superiores del folículo y en la corteza y médula de la fibra) manifestando que pudo deberse, por lo menos en parte, a un acceso muy pobre de los anticuerpos a las células queratinizadas. Este hallazgo difieren con lo reportado por Foitzik *et al.* (2003), quienes demostraron que tanto PRL y PRLR están localizados en los queratinocitos de la vaina interna y externa de los folículos pilosos anágenos y catágenos de piel de ratones. Estos autores mencionan que PRL y la expresión de Receptor de Prolactina (PRLR) durante el ciclo piloso murino no estacional, en contraste con la oveja y en comparación con el cuero cabelludo del humano se presenta estrictamente restringido al epitelio del folículo piloso y son fuertemente dependientes de ciclos del pelo.



En todas las muestras de piel, las glándulas sudoríparas apocrinas, glándulas sebáceas y la epidermis interfolicular del presente trabajo fueron positivas a la tinción, al igual que lo descrito por Choy *et al.* (1995 y 1997), los cuales manifestaron que dichos receptores de prolactina en las glándulas de la piel de ovino son consistentes con el rol de la prolactina en el control de las secreciones del epitelio. Por otro lado, Craven *et al.* (2001), demostraron también en piel de ratones inmunoreactividad en epidermis y en glándulas sudoríparas y sebáceas.

La presencia de inmunoreactividad en este estudio en la matriz germinal, vaina de la raíz externa y papila dermal nos hace pensar que la papila dermal (grupo de fibroblastos especializados) juega un rol clave en la inducción de la formación folicular y en la regulación del crecimiento de la fibra desde la matriz germinal en la alpaca. La inmunoreactividad demostrada en la envoltura de la raíz externa nos hace suponer su implicancia en el control del crecimiento de la fibra en la alpaca. Estos hallazgos probablemente nos indican la acción de la prolactina sobre los centros que controlan el crecimiento dentro del folículo piloso señalados por las variaciones estacionales en la secreción de la prolactina, al igual que lo mencionado por Choy *et al.* (1997) y Nixon *et al.* (2002).

El conjugado empleado es un anticuerpo monoclonal U5 contra PRLRs de hígado de la rata y que produjo inmunoreactividad positiva en el tejido de piel de alpaca del presente trabajo, esto nos indicaría que el PRLR es muy similar al de la rata, mostrando epítopes muy similares para el humano y especies domésticas como el porcino y conejo (Okamura *et al.* 1989); a pesar que estos varían en tamaño y secuencia polipeptídica pero tienen un dominio similar de unión al receptor.

La inmunoreactividad a receptores de prolactina en todas las muestras de piel de alpaca se dio predominantemente en el área nuclear, a diferencia de lo expresado por Choy *et al.* (1997), quienes en su estudio en ovinos manifestaron que la reacción se da en principalmente en el citoplasma, esto posiblemente se deba a que si bien los PRLRs se

encuentran localizados en la membrana celular, también están presentes intracelularmente en variados compartimientos según Tsai-Morris y Dufau (2004).

Finalmente, la presencia de PRLRs en estas células estaría confirmando que la PRL participa en la regulación del ciclo de crecimiento de la fibra de alpaca; se ha demostrado que a parte de la producción de prolactina en las células hipofisarias que tienen una acción endocrina, también se ha determinado la producción local de PRL en diversas células de la piel tanto de humanos como en otras especies (ratones, visones) que también participa en dicha regulación (Foitzik *et al.* 2003 y Rose *et al.* 1995).

## VI. CONCLUSIONES

1. Se determinó receptores de prolactina (PRLRs) en la piel de alpaca (*Lama pacos*) mediante la inmunoreactividad aplicando el método inmunohistoquímico Streptavidina- Biotina Peroxidasa en las células que conforman la papila dermal **(DP)**, vaina de la raíz externa **(ORS)** y regiones bajas de la raíz interna **(IRS)** de los folículos pilosos primarios y secundarios de la fibra.
2. Las células de la epidermis interfolicular y las glándulas sebáceas y sudoríparas apocrinas de alpacas son inmunoreactivas en conjugado contra PRLRs de hígado de rata.
3. La localización celular de la inmunoreactividad PRLRs en los folículos de la fibra así como en la epidermis y sus anexos se evidenció en sus áreas nucleares.
4. La distribución de los PRLRs es descrita en los folículos de las fibras anágena (crecimiento), catágena (regresión) y telógena (descanso).

## VII. LITERATURA CITADA

1. **Abbas A.; A. Lichtman y J. Pober.2002.** Inmunología celular y molecular. 4ta Ed., p.45-52, 64-65 y 545. Editorial Interamericana - Mc Graw Hill. España.
2. **Alzola, R. 2002.** Guía de estudio: Sistema tegumentario. Curso de histología, embriología y teratología. p. 3-12. UNCPBA. Facultad de Ciencias Veterinarias. Argentina.
3. **Atlee, B.; A. Stannard; M. Fowler; T. Willemse; P. Ihrke y T. Olivry. 1997.** The histology of normal llama skin. *Veterinary Dermatology*. 8: 165-176.
4. **Banks, W. 1998.** Histología veterinaria aplicada. 2da Ed., p. 427-436. Editorial El Manual Moderno. México.
5. **Bavera, G. 2006.** El pelaje del bovino y su importancia en la producción. 1ra Ed., p. 34-38. Córdoba. Argentina.
6. **Ben-Jonathan, N.; J. Mershon; D. Allen y R. Steinmetz. 1996.** Extrapituitary Prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocr Rev.* 17(6): 639- 669.
7. **Boenisch, T. 2002.** Anticuerpos, Inmunohistoquímica Básica, Enzimología Básica, Métodos de Coloración, Controles, Fondo. En: Métodos inmunohistoquímicos de coloración. 3era Ed., p. 5-15, 26-36. T. Boenisch (ed). Editorial DAKO Corporation. California. USA.
8. **Bole-Feysot, C.; V. Goffin; M. Edery; N.Binart y P.A. Kelly. 1998.** Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev.* 19(3): 225-268.
9. **Bourne, J. 1983.** Handbook of Immunoperoxidase Staining Methods. 1ra Ed., p 9 y 12. Editorial DAKO Corporation. California. USA.
10. **Bustinza, V. 2001.** La alpaca: conocimiento del gran potencial andino.1ra Ed., p. 57-91. Publicaciones UNA - Puno. Perú.
11. **Cormack, D. 1988.** Histología de HAM. 9na Ed., p. 558-561, 572-574. Editorial HARLA. México.

12. **Craven, A.J.; C.J. Ormandy; F.G. Robertson; R.J. Wilkins; P.A. Kelly; A.J. Nixon y A.J. Pearson. 2001.** Prolactin signaling influences the timing mechanism of the hair follicle: analysis of hair growth cycles in prolactin receptor knockout mice. *Endocrinology*. 142(6): 2533-2539.
13. **Chambilla, V. 1983.** Estructura histología de la piel de llama (*Lama glama*). Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Univ. Nac. Técnica del Altiplano. Puno. 62 p.
14. **Choy, V.J.; A.J. Nixon y A.J. Pearson. 1995.** Localisation of receptors for prolactin in ovine skin. *J Endocrinol*. 144(1): 143-151.
15. **Choy, V.J.; A.J. Nixon y A.J. Pearson. 1997.** Distribution of prolactin receptor immunoreactivity in ovine skin and changes during the wool follicle growth cycle. *Journal of Endocrinology*. 155(2): 265-275.
16. **Curso Virtual: Inmunohistoquímica Básica en Histología. 2005.** Departamento de Patología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia. España.
17. **Dellmann, H. y E. Brown. 1980.** Histología veterinaria. 1ra Ed., p. 485- 499. Editorial Acribia, Zaragoza. España.
18. **Elias, J.M. 1990.** Immunohistopathology: A practical approach to diagnosis. 1ra Ed., p. 1-4 y 11-27. American Society of Clinical Pathologists. Chicago. USA.
19. **Farmilo, A. y R. Stead. 2002.** Fijación. En: Métodos inmunohistoquímicos de coloración. 3era Ed., p. 18-20. T. Boenisch (ed). Editorial DAKO Corporation. California. USA.
20. **Foitzik, K; K. Krause; A.J. Nixon; C. Ford; U. Ohnemus; A.J. Pearson y R. Paus. 2003.** Prolactin and its receptor are expressed in murine hair follicle epithelium, show hair cycle-dependent expression, and induce catagen. *Am J Pathol*. 162(5): 1611-1621.
21. **Fowler, M. 1989.** Medicine and surgery of South American Camelids: llama, alpaca, vicuña, guanaco. 1ra Ed., p. 176- 179. Ames: Iowa State University Press.
22. **Freeman, M.; B. Kanyicska; A. Lerant y G Nagy. 2000.** Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*. 80(4): 1523-1631.
23. **Gaitan, M. 1967.** Estudio preliminar de los folículos pilosos en alpacas variedad Huacaya. Tesis de Ingeniero Zootecnista. Facultad de Ingeniería Zootecnista. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. 31 p.

24. **García, A.; F. Castejon; L.F. de la Cruz; J. González; M. Murillo y G. Salido. 1996.** Fisiología veterinaria. 1ra Ed., p. 690-691, 897-899. Editorial Mc Graw Hill. Madrid, España.
25. **Gimeno, E.; A. Massone y E. Portiansky. 2003.** Introducción a las técnicas de inmunohistoquímica y aplicaciones en patología veterinaria. En: Decimoquinto curso internacional de Post-Grado en técnicas de Inmunohistoquímica, Lectinhistoquímica y Microscopia Electrónica. 25 al 29 de agosto. Fac. Cienc. Veterinarias. Univ. Nac. De La Plata. Argentina.
26. **González, S. 2004.** Inmunohistoquímica en el diagnóstico del Melanoma. En: VXII Congreso Latinoamericano de Patología Clínica. Del 16 al 20 de Noviembre. La Paz-Bolivia.
27. **Gutiérrez, C.; M. Meneses; A. Gutiérrez; A. Vallarta; L. Andrade; A. Ávila; C. Montoya; R. Sánchez y P. Santana. 2005.** Depilación con láser. Rev Cirugía Plástica (México). 15(1): 18-26.
28. **Key, M. 2002.** Recuperación de Antígenos. En: Métodos inmunohistoquímicos de coloración. 3era Ed., p. 23-25. T. Boenisch (ed). Editorial DAKO Corporation. California. USA.
29. **Leeson, T.; C. Leeson y A. Paparo.1990.** Texto- atlas de histología. 1ra Ed., p. 365-386. Editorial Interamericana - Mc Graw Hill. Estados Unidos.
30. **Magill, F. 2005.** Alopecia androgenética. Calvicie ¿Problema médico o cosmético?. Rev Diagnóstico (Perú). 4(1): 1-15.
31. **Martinet, L.; D. Allain y C. Weiner. 1984.** Role of prolactin in the photoperiodic control of moulting in the mink (*Mustela vison*). J Endocrinol. 103(1): 9- 15.
32. **Mills, B.1992.** Métodos histotecnológicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. 1ra Ed., p. 253-256. Editorial AFIP. USA.
33. **Neira, R. 2005.** Comunicación personal.
34. **Nesbitt, G.; L. Ackerman. 1998.** Canine and feline dermatology, diagnosis and treatment. 1ra Ed., p. 6-23. Veterinary learning systems. USA.
35. **Nixon, A. J.; C.A. Fort; J.E. Wildermoth; A.J. Crave; M.G. Ashby y A.J. Pearson. 2002.** Regulation of prolactin receptor expression in ovine skin in relation to circulating prolactin and wool follicle growth status. J Endocrinol. 172(3):605-614.

36. **Okamura, H.; J. Zachwieja; S. Raguet y P.A. Kelly. 1989.** Characterization and applications of monoclonal antibodies to the prolactin receptor. *Endocrinol.* 124: 2499-2508.
37. **Ouhtit, A.; G. Morel y P.A. Kelly. 1993.** Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in the rat. *J Endocrinol.* 133:135-144.
38. **Pardo, J.; A. Panizo y L. Martínez. 1998.** Valoración del sistema de polímeros de dextrano *EnVision* (PDE) en la detección inmunohistoquímica. *Rev Esp Patol.* 31(1): 9-16.
39. **Paus, R. y Cotsarelis. 1999.** The biology of hair follicles. *N Engl J Med.* 341(7): 491-497.
40. **Pearson A.J.; A.L. Parry; M.G. Ashby; V.J. Choy; J.E. Wildermoth y A.J. Craven. 1996.** Inhibitory effect of increased photoperiod on wool follicle growth. *J Endocrinol.* 148(1): 157-166.
41. **Pearson A.J.; M.G. Ashby; J.E. Wildermoth; A.J. Craven y A.J. Nixon. 1999.** Effect of exogenous prolactin on the hair growth cycle. *Exp Dermatol.* 8:358-360.
42. **Rose, J.; T. Garwood y B. Jaber. 1995.** Prolactin receptor concentrations in the skin of mink during the winter fur growth cycle. *J Exp Zool.* 271(3):205-210.
43. **Sedano, E.; J. Victorio; C. Neira y C. Rojas. 1997.** Demostración inmunohistoquímica de células de Langerhans en córnea humana. *Anales de la Facultad de Medicina. UNMSM.* 58(3): 1-12.
44. **Sedano, E.; C. Neira y E. Vilcarromero. 2005.** Manual de prácticas histoquímica. 2da Ed., p. 106-109. UNMSM.
45. **Sedano, E. 2005.** Comunicación personal.
46. **Silvina, R.; A. Soria; E. Stisman y N. Ruiz. 2003.** Niveles de prolactina circulante en patologías mamarias. *Actas Bioquím. Clín Latinoam.* 37(2):137-147.
47. **Slobodan, M. y J. Snezana. 1998.** Control of hair growth. *Dermatology Online Journal.* 4(1): 1-15.
48. **Slominski, A. y J. Wortsman. 2000.** Neuroendocrinology of the skin. *Endocrine Reviews.* 21(5): 457-487.
49. **Stenn, K.S. y R. Paus. 1999.** What control hair follicle cycling? *Exp Dermatol* 8: 229-236.

50. **Stenn, K.S. y R. Paus. 2001.** Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev.* 81(1): 449-494.
51. **Tapia, M. 1969.** Estudio preliminar de la densidad y relación folicular de la piel de alpacas de la variedad Suri. Tesis de Ingeniero Zootecnista. Facultad de Ingeniería Zootecnista. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. 31 p.
52. **Tsai-Morris C.H. y M.L. Dufau. 2004.** PRLR (Prolactin receptor). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. URL:  
*<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/PRLRID42891ch5p14.html>*
52. **Velásquez, N. y M. Fernández. 2004.** Secreción extrahipofisaria de prolactina. Revisión. *Rev Obstet Ginecol.* 64(1): 23-31.