

Evolución temporal de lesiones en piel y tejidos blandos utilizando técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica **Postmortem temporal evolution of skin and soft tissue lesions using histochemical and immunohistochemical techniques**

Lilian I. Cayax⁽¹⁾

1) Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
Instituto Nacional de Ciencias Forenses, Guatemala, Guatemala.

Correspondencia: Dra. Lilian Cayax, lilianisabel1@yahoo.com

Recibido: 01/04/2020 Aceptado: 22/04/2020

Resumen

En la investigación de los hechos que rodean una muerte violenta, es particularmente útil establecer la antigüedad de las lesiones que se observan. En este estudio, se estableció la evolución temporal de lesiones en piel y tejidos blandos en muestras provenientes de cadáveres. Las necropsias médico legales fueron realizadas en el Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala (INACIF) y habían determinado la presencia de lesiones y se había efectuado estudio histopatológico de rutina.

Se realizaron nuevos cortes y se tiñeron con hematoxilina-eosina, Tricrómico de Masson e Inmunohistoquímica. La identificación positiva a Colágeno IV, CK 5 y EMA, estableció la presencia de ciertos componentes tisulares. La inmunohistoquímica permite identificar específicamente los constituyentes del tejido. Dado que los diferentes elementos celulares aparecen o desaparecen de acuerdo al tiempo que transcurre desde que se produce una lesión hasta el momento en que ocurre la cicatrización, es posible establecer el tiempo de antigüedad de las lesiones. Palabras clave: Lesión tisular. Cicatrización. Necropsia médico legal, Inmunohistoquímica.

Abstract

In the investigation of the facts surrounding a violent death, it is particularly useful to establish the age of the injuries that are observed. In this study, the temporal evolution of skin and soft

tissue injuries was established in samples from cadavers. The medico-legal autopsies were performed at the Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala (INACIF) and had determined the presence of injuries and a routine histopathological study had been carried out.

New sections were made and stained with hematoxylin eosin, Masson's trichrome and Immunohistochemistry. Positive identification to Collagen IV, CK 5 and EMA, established the presence of certain tissue components. Immunohistochemistry allowed specific identification of tissue constituents. Because different cellular elements appear or disappear according to the time that elapses from the time an injury occurs to the moment healing occurs, it is possible to establish the age of the lesions. Key words: Tissue injury. Healing. Medico-legal autopsy. Immunohistochemistry

DOI: <https://doi.org/10.36109/rmg.v159i1.178>

Introducción

El INACIF realiza un promedio de 6,500 necropsias por año, un gran porcentaje están relacionadas a violencia.[1] Cuando un médico forense realiza el examen externo del cadáver y encuentra lesiones como excoriaciones o heridas, debe establecer si fueron realizadas en vida y si es posible estimar el tiempo en el cual fueron efectuadas, para ello puede auxiliarse del estudio histopatológico. El estudio microscópico de la vitalidad de las lesiones y su progresión es el estudio del inicio y la progresión del proceso inflamatorio y reparativo.[2]

Establecer la antigüedad de las lesiones es de suma importancia para la impartición de justicia, es útil saber si una lesión es reciente o antigua y el tiempo estimado en que ocurrió esa lesión. Este diagnóstico se lleva a cabo mediante el examen macroscópico, se auxilia en algunas ocasiones en el estudio histopatológico; no obstante, las técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica permiten la identificación de los constituyentes del tejido cicatrizal, por lo cual es posible establecer el tiempo aproximado de antigüedad de una lesión observada.[3] En la práctica, el médico forense se enfrenta a lesiones o heridas que fueron realizadas en momentos diferentes y por lo tanto hay diferencias histológicas en relación a los componentes. La inflamación aguda es la respuesta inicial e inmediata a una lesión, a la cual le sigue la inflamación crónica y la cicatrización. Para establecer una u otra, la inmunohistoquímica ofrece ventajas que la han convertido en el método de elección en las investigaciones en esta materia.[4] Además de la inflamación, la coagulación también se induce en heridas vitales, por lo tanto, el análisis de los marcadores de coagulación de la sangre en la hemorragia de la herida podría ser un factor discriminatorio adicional importante en la determinación de la edad de la herida.[5] En los estudios dirigidos a determinar la evolución de las lesiones, los anticuerpos a utilizar estarán relacionados con los mediadores del proceso inflamatorio y reparativo. La inmunohistoquímica permite detectar, amplificar y hacer visible un antígeno específico, que generalmente es una proteína, permitiendo identificar la localización de una sustancia específica a nivel tisular o celular.[6] Al hacer evidente la presencia específica de elementos del proceso inflamatorio y cicatrizal, se puede establecer la evolución de una lesión. Si se relacionan los hallazgos con antecedentes del caso, el análisis forense tendrá un mayor sustento científico y por ende valor probatorio,.

Material y métodos

Este estudio contó con el dictamen favorable del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas, con el aval de la Dirección de INACIF

y la colaboración del Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Se revisaron los estudios histopatológicos de 909 casos a lo largo de cinco años (2014-2018), disponibles en los archivos INACIF, se incluyeron archivos documentales y archivos de láminas, identificando estudios histopatológicos de piel o tejidos blandos provenientes de cadáveres con diagnóstico de inflamación aguda, crónica y/o cicatrización.

Recolección de datos: luego de identificar los casos, se realizaron nuevos cortes a los bloques de parafina y montaje del tejido en láminas portaobjetos. En una segunda etapa, en el laboratorio de histopatología del CIB, se realizó tinción de hematoxilina-eosina a los tejidos; los casos fueron revisados para establecer si el tejido era apto para estudio, las muestras permitieron evidenciar proceso inflamatorio agudo o crónico y la presencia de proceso cicatrizal, la tinción de Tricrómico confirmó la presencia de colágeno, elemento característico de los procesos cicatrizales.[4] **Técnicas e instrumentos:** con el acompañamiento de la empresa Technipath se realiza la aplicación de anticuerpos para Inmunohistoquímica y el procesamiento de muestras mediante técnica de microarreglos, se seleccionó este procedimiento porque permite reducir los costos. En los casos donde se encontró autólisis, las muestras no fueron consideradas aptas, la integridad de la proteína tisular es indispensable para el estudio histopatológico e inmunohistoquímico⁷. Al hacer evidente la presencia de elementos específicos del proceso cicatrizal, sumado a la identificación inmunohistoquímica y considerando que estos elementos tienen un tiempo estimado de aparición y desaparición dentro del proceso se estableció un tiempo de antigüedad.[8] Toda la información se colocó en una boleta diseñada para el efecto. La presencia de elementos del proceso inflamatorio agudo sitúan la lesión en un periodo de 0 a 48 horas, la presencia de elementos del proceso inflamatorio crónico indican que la lesión tiene un tiempo superior a 48 horas, la presencia de angiogénesis (nuevos vasos) sitúa la antigüedad de la lesión entre el día 3-6,

la tinción de Tricrómico de Masson positiva demuestra la presencia de colágeno, fibroblastos o retículo, elementos cicatrizales; el marcador de Inmunohistoquímica Colágeno IV sitúa una lesión entre el día 6-7, el marcador de Membrana Basal Epitelial (EMA) sitúa una lesión entre el día 8 al 13 y el marcador Queratina 5 sitúa una lesión entre el día 13 al 23.[3,9,10]

Resultados

Se identificaron noventa y cuatro muestras (94) relacionadas a lesiones de piel y tejidos blandos. Se determinó que 2 eran normales, 3 mostraban inflamación aguda, 87 mostraban inflamación crónica, 22 de ellas con angiogénesis. Del total de muestras, 86 fueron positivas para Tricrómico de Masson (demostraban presencia de colágeno) y de estas, 40 fueron positivas para colágeno IV; las tinciones de queratina y antígeno de membrana epitelial fueron negativas. Mediante la evaluación histológica de los tejidos y las tinciones mencionadas, se situó la antigüedad de la lesión, usando los siguientes criterios.

- Presencia de infiltrado inflamatorio agudo, antigüedad de 4 a 48 horas.
- Presencia de infiltrado inflamatorio crónico, antigüedad mayor de 48 horas.
- Tricrómico positivo, presencia de colágeno
- Colágeno IV positivo, antigüedad mayor de 6 a 7 días.
- Membrana basal epitelial positiva, antigüedad mayor a 13 días
- Queratina positiva, antigüedad mayor a 23 días.

De las 94 lesiones en las muestras analizadas, dos tenían menos de 48 horas; 87 tenían más de 48 horas, pero de acuerdo a inmunohistoquímica no más de 6 o 7 días. No se encontró ninguna lesión superior a ese periodo. No es posible establecer la cronología de una lesión sin establecer previamente los cambios histológicos propios de la inflamación. El tejido debe estar bien conservado. Si un tejido no permite una observación clara de sus estructuras y sus componentes, pueden elaborarse conclusiones erróneas.[2,11]

Discusión

En la investigación realizada, el estudio histopatológico demostró la presencia de elementos del proceso inflamatorio agudo situando la antigüedad de la lesión en un periodo menor a 48 horas, la presencia de elementos del proceso inflamatorio crónico indica que la lesión tiene un tiempo superior a 48 horas, la presencia de angiogénesis (nuevos vasos) sitúa la antigüedad de la lesión entre el día 3-6, la tinción Tricrómico de Masson demuestra la presencia de colágeno, considerado elemento cicatrizal; la reactividad al marcador de Inmunohistoquímica Colágeno IV situó la lesión entre el día 6-7. Determinar la edad de una herida es un desafío en la patología forense, el progreso reciente en las técnicas ha permitido la evaluación de materiales a nivel celular y molecular, así como la evaluación simultánea de múltiples marcadores.

Investigaciones en materiales de autopsia utilizando procedimientos estandarizados como inmunohistoquímica, hace que el campo científico de la determinación de la edad de las heridas haya avanzado durante los últimos años y esto es fundamental para el análisis forense. Se espera que adicionando las tinciones de histoquímica e Inmunohistoquímica al estudio convencional de lesiones en piel y tejidos blandos se pueda establecer un tiempo estimado de antigüedad y, al relacionar los resultados con los antecedentes del caso, el médico forense podrá fundamentar de una manera categórica las conclusiones emitidas en su dictamen pericial.

Referencias

References

1. Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala (2018). Informe Anual. Recuperado de <https://www.inacif.gob.gt/docs/estadisticas/anual/AnualM2018.pdf>
2. Cabrerizo Medina E., Villanueva de la Torre H., Salguero Villadiego M.. Estudio histopatológico de la evolución temporal de las lesiones. Cuad. med. forense [Internet]. 2015 Dic [citado 2020 Mar 31]; 21(3-4): 127 - 134. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pId=S1135-76062015000200005&Ing=es.

3. Betz, P. *Histological and enzyme histochemical parameters for the age estimation of human skin wounds*. *Int J Leg Med* 107, 60–68 (1994). <https://doi.org/10.1007/BF01225491>
4. Gómez Pascual A, Martínez Sánchez MC, Villar Rodríguez JL. *Histopathologic study of vital lesions e inflammation: nomenclature, general characteristics and morphological patterns*. En: Blanco Pampín J, Salguero Villadiego M, editores. *Practical manual of forensic histopathology*. Nueva York: Nova Biomedical; 2012. p. 137-71.
5. Franklin R.W. van de Goot, H. Ibrahim Korkmaz, Judith Fronczek, Birgit I. Witte, Rob Visser, Magda M.W. Ulrich, Mark P.V. Begieneman, Lawrence Rozendaal, Paul A.J. Krijnen, Hans W.M. Niessen, *A new method to determine wound age in early vital skin injuries: A probability scoring system using expression levels of Fibronectin, CD62p and Factor VIII in wound hemorrhage*, *Forensic Science International*, Volume 244, 2014, Pages 128-135, ISSN 0379-0738, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.08.015>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073814003399>)
6. Hitoshi Maeda, Bao-li Zhu, Takaki Ishikawa, Tomomi Michiue, *Forensic molecular pathology of violent deaths*, *Forensic Science International*, Volume 203, Issues 1–3, 2010, Pages 83-92, ISSN 0379-0738, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.024>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073810003737>)
7. Gauchotte G, Martrille L, Plénat F, Vignaud JM. *[The markers of wound vitality in forensic pathology]*. *Ann Pathol*. 2013 Apr;33(2) 93-101. doi:10.1016/j.annpat.2013.02.006. PMID: 23582835.
8. Wolfgang Grellner, Burkhard Madea, *Demands on scientific studies: Vitality of wounds and wound age estimation*, *Forensic Science International*, Volume 165, Issues 2–D03, 2007, Pages 150-154, ISSN 0379 0738. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.029>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073806003148>)
9. Toshikazu Kondo, Yuko Ishida, *Molecular pathology of wound healing*, *Forensic Science International*, Volume 203, Issues 1–3, 2010, Pages 93-98, ISSN 0 3 7 9 - 0 7 3 8 , <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.004>
10. Dettmeyer RB. *Vitality, injury age, determination of skin wound age and fracture age*. En: *Histopathology. Fundamentals and perspectives*. Berlín: Springer-Verlag; 2011. p. 191-209.
11. P. Betz, A. Nerlich, J. Wilske, J. Tu•2Ebel, R. Penning, W. Eisenmenger, *The immunohistochemical analysis of fibronectin, collagen type III, laminin, and cytokeratin 5 in putrified skin*, *Forensic Science International*, Volume 61, Issue 1, 1993, Pages 35-42, ISSN 0379-0738, [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(93\)90247-8](https://doi.org/10.1016/0379-0738(93)90247-8) (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0379073893902478>)