



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**



Facultad de Veterinaria

# **Estudio de la cicatrización por segunda intención en la piel de quelonios**

## **Efecto de la insulina tópica como promotor de la cicatrización**



**Tesis Doctoral**

**Joao Marcelino Negrini Neto**

Córdoba - 2016





**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**



**Programa de Doctorado en Biociencias  
y Ciencias Agroalimentarias**

**Facultad de Veterinaria**

---

# **Estudio de la cicatrización por segunda intención en la piel de quelonios**

## **Efecto de la insulina tópica como promotor de la cicatrización**

---

Trabajo presentado por **D. Joao Marcelino Negrini Neto** para  
optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba, España.

Córdoba - 2016

Ilustración de la portada:

*Trachemys scripta elegans*, grabado de 1865 por Karl Bodmer (1809-1893).

Obra de arte de dominio público.



**TÍTULO DE LA TESIS:**

**ESTUDIO DE LA CICATRIZACIÓN POR SEGUNDA INTENCIÓN EN LA PIEL DE QUELONIOS. EFECTO DE LA INSULINA TÓPICA COMO PROMOTOR DE LA CICATRIZACIÓN.**

**DOCTORANDO: D. Joao Marcelino Negrini Neto**

**INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

Esta tesis doctoral ha sido realizada bajo nuestra dirección personal en los Departamentos de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de Córdoba. Se ha desarrollado de acuerdo con los plazos esperados y una vez concluida su redacción, ha sido supervisada por nosotros y merece, a juicio de los abajo firmantes, ser presentada para su mantenimiento y defensa pública ante el tribunal correspondiente. El interés y la calidad de los resultados obtenidos han permitido la presentación de comunicaciones libres en varios Congresos Nacionales e Internacionales, la publicación de 2 artículos en revistas indexadas, el primero de ellos ya publicado y el segundo pendiente de recibir su aceptación definitiva:

. "Clinical and histological findings of cutaneous wound healing in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta elegans*) housed in unheated outdoor enclosures." Veterinary Dermatology DOI: 10.1111/vde.12346 JCR (Veterinary Sciences) índice de impacto (2015) 1,568.

. "Effects of topical insulin on second-intention wound healing in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta elegans*)." Enviado 11/07/2016 Veterinary Research Communications JCR (Veterinary Sciences) índice de impacto (2015) 1,236.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, a 15 de Julio de 2016

Firma de los directores

Fdo.: Prof. Dr. Elena Mozos Mora

Fdo. Prof. Dr. Pedro J. Ginel Pérez



*Soli Deo gloria*

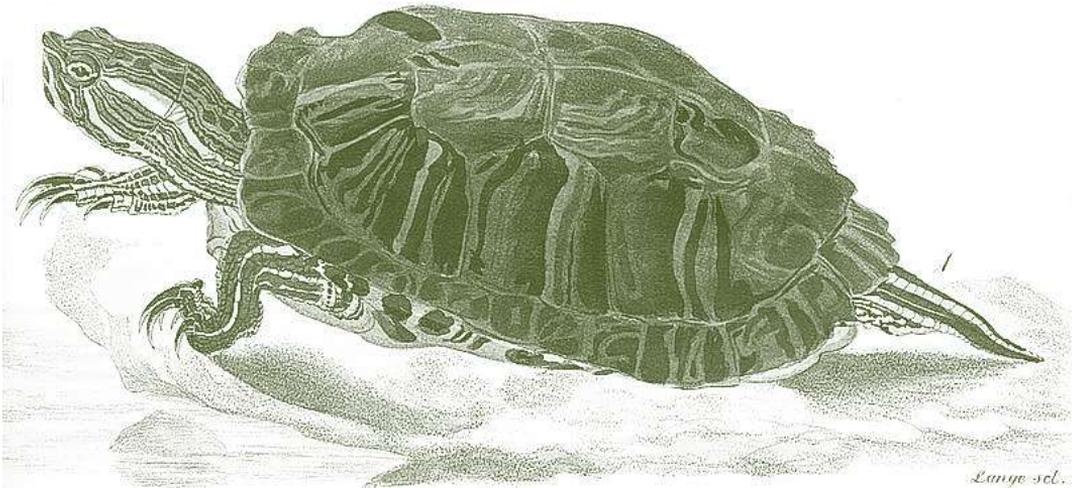


# Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>23</b>
3.1. OBSERVACIONES TAXONÓMICAS.....	23
3.2. ÁREA DE DISTRIBUCIÓN, HÁBITAT NATURAL Y EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN .....	23
3.3. BIOLOGÍA DE LA ESPECIE .....	24
3.4. EL PROCESO DE CICATRIZACIÓN .....	26
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
4.1. ANIMALES.....	39
4.2. INDUCCIÓN DE LA HERIDA: BIOPSIA INICIAL Y CONTROLES.....	42
4.3. EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA CICATRIZACIÓN .....	43
4.4. TRATAMIENTO TÓPICO CON INSULINA.....	44
4.5. ESTUDIO HISTOLÓGICO .....	44
4.6. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO .....	45
4.7. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....	47
4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	47
4.9. CUESTIONES ÉTICAS .....	48
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
5.1. ESTUDIO DE LA CICATRIZACIÓN POR SEGUNDA INTENCIÓN.....	53
5.1.1. EVALUACIÓN CLÍNICA .....	53
5.1.2. RESULTADOS MICROSCÓPICOS .....	55
5.1.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LA PIEL NORMAL EN LA ZONA BIOPSIADA .....	55
5.1.2.2. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LA CICATRIZACIÓN .....	56
5.1.2.3. RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS .....	59
5.1.2.4. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....	61
5.2. ESTUDIO DE LA APLICACIÓN TÓPICA DE INSULINA PORCINA.....	63
5.2.1. EVALUACIÓN CLÍNICA .....	63
5.2.2. RESULTADOS MICROSCÓPICOS .....	66
5.2.3. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....	67
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>81</b>
6.1. CICATRIZACIÓN POR SEGUNDA INTENCIÓN .....	81
6.2. EFECTOS DE LA APLICACIÓN TÓPICA DE INSULINA.....	88
6.3. LIMITACIONES.....	94
6.4. PERSPECTIVAS .....	95

<b>7. PUBLICACIONES .....</b>	<b>99</b>
7.1. ARTÍCULOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS DERIVADOS DE ESTA TESIS DOCTORAL .....	99
7.2. COMUNICACIONES EN CONGRESOS DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL .....	99
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>137</b>
<b>9. RESUMEN .....</b>	<b>141</b>
<b>10. SUMMARY .....</b>	<b>145</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>151</b>
<b>14. ANEXO: AUTORIZACIÓN COMITÉ DE ÉTICA .....</b>	<b>163</b>
<b>15. AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>167</b>

# Introducción



*“Considero que Dios aprecia que estudiemos su Creación”.*

*Francis Collins, genetista director del “Proyecto genoma humano” (1950)*



## 1. Introducción

La cicatrización de heridas cutáneas en los reptiles permanece aún poco estudiada, especialmente en los quelonios, donde estudios previos han analizado casi exclusivamente la estructura epidérmica y las heridas del caparazón (Alibardi y cols., 2004; Norton, 2005; Vella, 2009; Nagashima y cols., 2014). Esta falta de conocimiento contrasta con el aumento del número de estos animales como mascotas y con la alta prevalencia clínica de heridas en la piel de reptiles en cautiverio (Hernández y Camacho, 2002; White y cols., 2010). Como en otros reptiles, las tortugas son propensas a las heridas provocadas por traumas derivados de un manejo inadecuado, abrasiones, quemaduras térmicas, picaduras de roedores o insectos, y procedimientos quirúrgicos (Smith y Barker, 1988; Mitchell y Diaz-Figueroa, 2004). Estas heridas en la piel, especialmente en el caso de las tortugas acuáticas, a menudo curan insidiosamente y cuando el proceso de reparación no es capaz de restaurar la integridad anatómica y funcional en un período de tiempo apropiado, las heridas se cronifican, aumentando el riesgo de complicaciones (MacArthur y cols., 2004).

Aunque cualquier intervención clínica debe basarse en un conocimiento específico de cada especie, en reptiles la mayor parte de la información sobre cicatrización de la piel se basa en datos extrapolados de los vertebrados endotérmicos. La cicatrización de heridas cutáneas es un proceso celular y molecular extraordinariamente bien regulado y complejo que se ha compartimentado a la hora de estudiarlo y explicarlo; según la mayoría de autores consta de tres fases continuas y superpuestas: inflamación, proliferación y remodelación (Baum y Arpey, 2005; Kumar y cols., 2010; Schreml y cols., 2010; Reike y Sorg, 2012). A pesar de que los mecanismos básicos de respuesta al daño tisular están bien conservados filogenéticamente, muchos estudios han reportado diferencias entre las especies, los individuos e incluso entre localizaciones anatómicas dentro del mismo individuo, lo que demuestra que existe una heterogeneidad considerable en la curación de las heridas (Martson y cols., 1999; Schreml y cols., 2010; Nayak y cols., 2012). Esta heterogeneidad es clínicamente relevante debido a que tiene un efecto significativo sobre variables importantes como la respuesta inflamatoria, la contracción de la herida, el tiempo de curación y las posibles complicaciones (Martson y cols., 1999; Wilkink y cols., 1999; Bohling y cols.,

2004). Otra consideración clínica importante que nos hemos planteado al proyectar este estudio es que, en las escasas publicaciones relacionadas con la cicatrización de heridas en los reptiles, los animales son mantenidos en hábitats restringidos con una temperatura ambiente constante óptima para el metabolismo del animal. Estos estudios previos no reproducen por tanto las condiciones de un entorno natural ni las condiciones metabólicas de estos animales heterotermos (Smith y Barker, 1988; Mitchell y Diaz-Figueroa, 2004; Keller y cols., 2014).

Algunos estudios anteriores han demostrado que la curación por segunda intención en heridas en la piel de reptiles se caracteriza por la escasa contracción y la prolongación de los tiempos de curación en comparación con los mamíferos (Smith y Barker, 1988; Cangul y cols., 2006; Keller y cols., 2014). Cuando se han comparado heridas suturadas y sin suturar, se ha demostrado que las heridas sin suturar tuvieron significativamente menos interrupciones del patrón de la cicatrización y menor superposición de los bordes (Smith y cols., 1988; McFadden, 2011). Estos hallazgos comprometen aún más la cicatrización de heridas en estas especies y sugieren una búsqueda de tratamientos prácticos capaces de aumentar la contracción de la herida y mejorar su cicatrización en general.

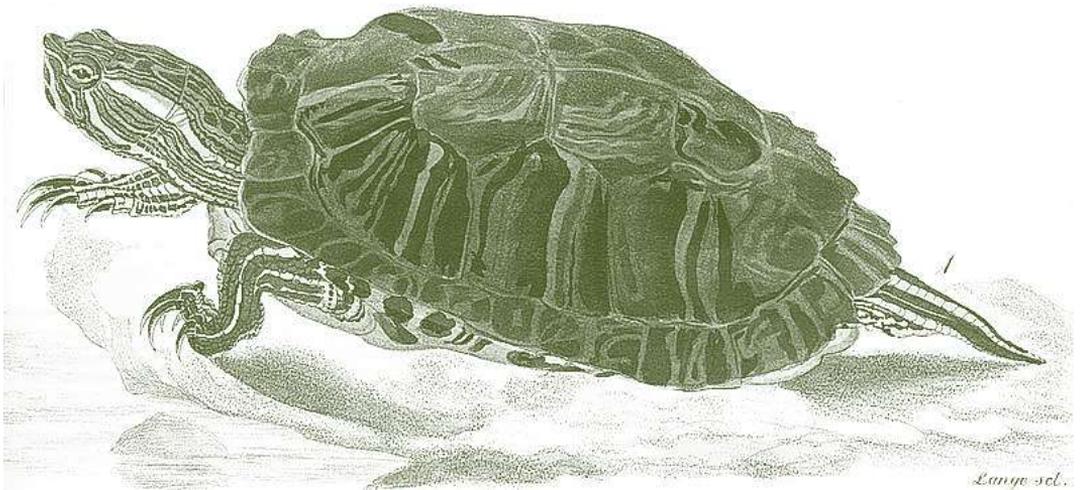
Por otra parte, diferentes estudios han examinado el uso potencial de factores de crecimiento, especialmente en el campo de la curación de heridas. Desafortunadamente, el alto coste de la producción de estos factores de crecimiento purificados ha impedido su integración en el protocolo de tratamiento de heridas crónicas, especialmente en reptiles mantenidos como mascotas por estar considerados de valor biológico y económico bajos. Como una alternativa a los factores de crecimiento recombinantes y otros de precio elevado, se ha demostrado que la insulina promueve una mejora en la cicatrización de heridas en mamíferos. Al contrario que otros factores de crecimiento, las insulinas de origen animal o recombinantes tienen más bajo coste y están disponible universalmente (Hrynyk y Neufeld, 2014; Azevedo y cols., 2015). Algunos modelos animales han mostrado que el tratamiento con insulina mejora la curación de fracturas, incisiones quirúrgicas y las úlceras en la piel. Asimismo, que bajas dosis de insulina en aplicación tópica promueven la curación de heridas y quemaduras en ratas (Gregory, 1965; Hanam y cols., 1983; Apikoglu-Rabus y cols., 2009; Chen y cols., 2012a).

## **Hipótesis**

Nuestra hipótesis de trabajo parte de la idea de que la cicatrización en la piel de tortugas, mantenidas en su entorno natural con variaciones diarias de temperatura y libre acceso al agua, puede presentar diferencias relevantes respecto a lo descrito hasta ahora en reptiles y que la aplicación tópica de factores de crecimiento como la insulina podrían mejorar la respuesta inflamatoria y la curación del tejido dañado.



# Objetivos



*"Lo más incomprensible del universo es que sea comprensible".*

*John Lennox. Matemático y filósofo (1942)*



## 2. Objetivos

El objetivo genérico de este trabajo de Tesis Doctoral es avanzar en el conocimiento de la cicatrización en la piel de los quelonios.

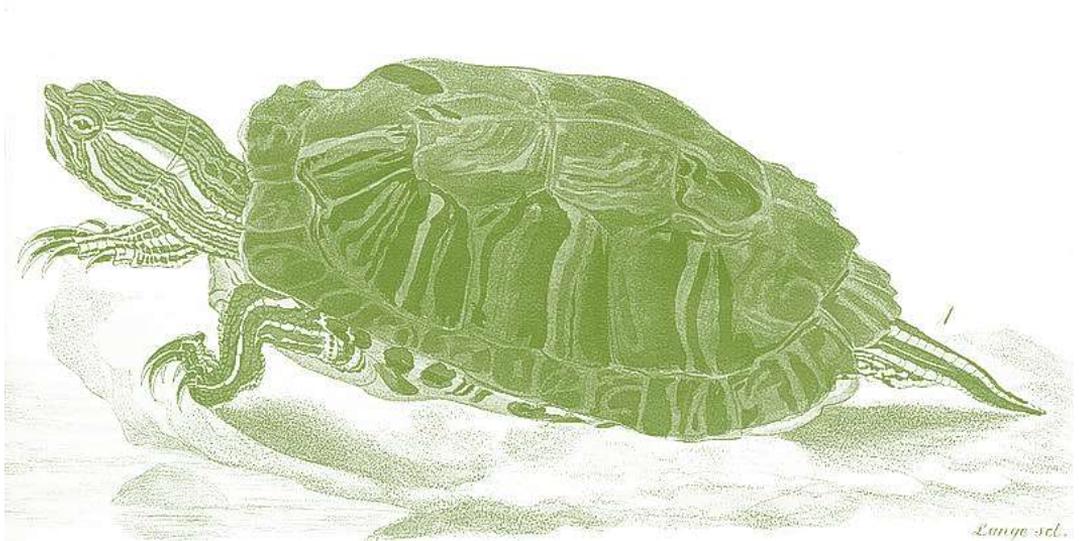
Los objetivos específicos son:

2.1. Estudiar y caracterizar los aspectos clínicos e histopatológicos de la cicatrización por segunda intención de heridas cutáneas inducidas experimentalmente en tortugas de la especie *Trachemys scripta elegans* expuestas a variaciones diarias de temperatura y en un ambiente acuático.

2.2. Estudiar el valor terapéutico de la aplicación tópica de la insulina como factor promotor de crecimiento en el proceso de cicatrización de úlceras cutáneas por segunda intención en tortugas de la especie *Trachemys scripta elegans* empleando un modelo experimental.



# Revisión bibliográfica



*"La fe no es contraria a la evidencia, sino que la trasciende.  
La fe nos dice: Existe otro lugar. Existe algo más allá de la  
sola razón".*

*Alister E. McGrath. Biofísico y teólogo (1953)*



## 3. Revisión bibliográfica

*Trachemys scripta elegans* también conocida vulgarmente como galápago de Florida, tortuga de orejas rojas, o tortuga japonesa es una especie de tortuga acuática perteneciente a la clase Reptilia, orden Chelonia, familia Emydidae que abarca más de 300 especies (Seidel y Ernest, 2006).

### 3.1. Observaciones taxonómicas

La taxonomía del género *Trachemys* ha sido muy controvertida a lo largo del siglo XX. El género ha cambiado repetidamente de denominación, habiéndose considerado anteriormente, entre otros, en los géneros *Chrysemys* y *Pseudemys*. Esto provoca cierta confusión, pues gran parte de la información existente sobre esta especie ha sido publicada bajo la denominación de *Pseudemys scripta* o *Chrysemys scripta*, lo que hace que sea, a veces, dificultosa su búsqueda. Hasta el año 2002, en el género *Trachemys* se incluían hasta 14 subespecies dentro de una única especie, *Trachemys scripta*. A partir de la revisión realizada por Seidel (2002), se considera que el género *Trachemys* incluye 15 especies diferentes. La filogenia realizada posteriormente a partir de estudios de ADN mitocondrial (Jackson y cols., 2008) confirmaron esta revisión taxonómica.

### 3.2. Área de distribución, hábitat natural y evolución de la población

Originaria de la región que comprende el sureste de los Estados Unidos y el noreste de México, tiene desde Brasil hasta el sur de los EEUU, pasando por América Central su área de distribución mundial. En la actualidad se encuentra en muchas otras partes del mundo gracias a su comercio como mascota y su éxito como especie invasora frente a especies autóctonas como el galápago leproso en España. Las tortugas, en general, encabezan la lista de los reptiles más populares como mascotas, incluso antes del gran aumento, en los últimos años, de los reptiles criados como animales compañía (Hernández y Camacho, 2002; White y cols., 2010).

En general, *Trachemys scripta* habita una gran variedad de medios acuáticos de agua dulce, aunque prefiere aguas tranquilas de 1 a 2 m de profundidad con abundante vegetación y disponibilidad de sitios para solearse (Ernst y Lovich, 2009). Entre las variables que se consideran más determinantes de los hábitats utilizados por esta especie en sus áreas de origen, destaca la profundidad del agua, pues no suele encontrarse en aguas someras (<0,5m de profundidad), en las que se considera que no puede hibernar en libertad. Además, prefiere medios acuáticos permanentes a temporales, pues en estos últimos se ve obligado a emigrar hacia otros lugares cuando se produce la desecación (Morreale y Gibbons, 1986).

### 3.3. Biología de la especie

Es un galápago de tamaño mediano, que se caracteriza por la presencia de una mancha prominente a cada lado de la cabeza, cuyo colorido difiere según las subespecies; roja en *T. s. elegans*, y amarilla en *T. s. scripta* y en *T. s. troosti*. La piel es de color verde oliva a marrón con líneas amarillas. La cabeza también es de color verde a marrón con bandas amarillas en la mayoría de los individuos. Las bandas supra temporales y orbito-mandibulares son conspicuas, siéndolo más aún las amplias bandas post-orbitales, que caracterizan a cada subespecie. En la zona prefrontal se observa un dibujo en forma de flecha formado por la unión de las líneas amarillas supra temporales que convergen con la línea sagital sobre el hocico. El cuello también posee numerosas líneas amarillas que bajo la boca se unen formando una Y. Las patas son también de color oscuro con numerosas líneas amarillas (Ernst y Babour, 1989).

Su caparazón se compone de dos secciones: la superior, conocida como caparazón dorsal, y la inferior, también llamada caparazón ventral o plastrón. En las tortugas más jóvenes o recién nacidas, es de color verde hoja, y conforme van creciendo se oscurece un poco hasta volverse de un verde muy oscuro, para más tarde tomar un tono entre marrón y oliva. El plastrón siempre es de color amarillo claro. Todo el escudo está cubierto con rayas y manchas que en la naturaleza le ayudan a camuflarse (Beynon y Cooper, 1999; Meredith y Redrobe, 2012).

### 3.3.1. El tegumento de los reptiles

Los reptiles fueron los primeros vertebrados en adaptarse a un ambiente terrestre permanente. Para adaptarse a las condiciones de los cambios del medio ambiente terrestre y acuático, eran necesarias modificaciones del sistema tegumentario para que los reptiles sobrevivieran. Mientras que el tegumento de anfibios tiene un papel importante en la respiración y la osmorregulación, estas funciones se perdieron en los reptiles. En el examen macroscópico, la piel de reptil es seca, y las escamas están dispuestas en patrones geométricos regulares. El tegumento de los reptiles está básicamente desprovisto de glándulas. A diferencia de los peces, donde las escamas son de origen dérmico, las escamas de los reptiles son de origen epidérmico, con variaciones en tamaño, forma y textura de una especie a otra, lo que se utiliza con frecuencia para ayudar con la clasificación taxonómica. La piel de los reptiles, como el de los vertebrados superiores, se compone de la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo. Histológicamente, la epidermis se compone de tres capas: estrato córneo, el estrato espinoso y el estrato germinativo. El estrato córneo se compone de seis a ocho capas de células. El estrato exterior córneo tiene una superficie dentada y está fuertemente queratinizado y acelular. La función principal de la capa córnea es servir como una barrera física contra los agentes patógenos y para evitar la pérdida de fluidos y electrolitos. La capa de  $\alpha$ -queratina de la epidermis se considera la principal barrera contra la pérdida de agua percutánea, aunque la capa de  $\beta$ -queratina superficial puede también desempeñar un papel en la reducción de la pérdida de agua. La zona intermedia se compone de células provenientes del estrato germinativo en diversas etapas de diferenciación. El estrato germinativo, o capa profunda de la epidermis, se compone de las células regenerativas que migran a la capa córnea. La dermis proporciona nutrición a la epidermis, y se une a la musculatura por una capa delgada de tejido conectivo. Las células de pigmento se encuentran en la dermis. La regulación de las células pigmentarias se considera, generalmente, que se realiza por vía neurológica y por influencias hormonales. Los osteodermos, o placas calcificadas, se encuentran en la dermis de quelonios y cocodrilos (Alibardi y Sawyer, 2002; Alibardi y cols., 2004; Mitchell y Díaz-Figueroa, 2004).

### 3.3.2. El tegumento de los quelonios

La estructura básica de la piel de los quelonios es similar a la del resto de reptiles. Los estudios de su estructura en las partes de piel blanda son escasos pues se han centrado fundamentalmente en describir las modificaciones en el caparazón y plastrón y en evaluar la expresión de algunas citoqueratinas específicas (Alibardi y cols., 2004; Alibardi y Toni, 2006). La epidermis es un epitelio estratificado queratinizado con una capa germinativa basal de queratinocitos, un estrato espinoso formado por 2-4 capas de queratinocitos suprabasales, y más externamente un estrato corneo de espesor variable. La dermis es delgada, menos vascularizada y tienen grandes poblaciones de melanocitos y se adhiere a los tejidos subyacentes profundos por una capa delgada de tejido conectivo laxo. Las glándulas cutáneas son poco frecuentes y varían según la especie (Alibardi y cols., 2004; Alibardi y Toni, 2006; Cooper, 2006).

La piel resistente pero no elástica de los escudos del caparazón y plastrón consta de una fina epidermis con un gran desarrollo del estrato córneo donde se han caracterizado varias  $\beta$ -queratinas que le confieren sus características físicas; el segundo elemento que aumenta la resistencia del caparazón y plastrón de los quelonios son los osteodermos desarrollados en la dermis a partir de una modificación del tejido conjuntivo y que forman una estructura integrada con el esqueleto axial (Cooper, 2006).

### 3.4. El proceso de cicatrización

La cicatrización de las heridas cutáneas es un proceso fisiológico muy bien caracterizado en mamíferos, especialmente en pacientes humanos (Kumar y cols., 2010; Schreml y cols., 2010), pero escasamente descrito en los reptiles (Maderson y Roth, 1972; Smith y Baker, 1988; French y cols., 2006; Keller y cols., 2014). Esta revisión bibliográfica se ha realizado fundamentalmente en base a la información disponible en mamíferos, destacando las diferencias específicas de los reptiles según lo descrito hasta ahora.

La función principal de la piel es servir de barrera protectora contra el medio ambiente. Las heridas cutáneas se definen como una solución de continuidad en la integridad de la piel y la cicatrización es la respuesta del organismo encaminada a restablecer la integridad de la zona dañada. En animales de vida libre, donde el

tratamiento se ve complicado por el manejo clínico de estos animales, las heridas cutáneas con independencia de su origen pueden complicarse y representar un grave peligro para la vida del animal. El proceso de curación depende de numerosos factores, tanto locales de la herida, como de mediadores sistémicos, existencia de enfermedades subyacentes, complicaciones secundarias y también del tipo de herida. La combinación de todos ellos determinará si la cicatrización de las heridas se producirá de una forma fisiológica, o si habrá un proceso complicado de curación. Cuando el daño es severo o crónico y se afectan tanto las células parenquimatosas como el estroma, la curación de la herida se produce por segunda intención, es decir con la formación de una cicatriz que sustituye el tejido dañado (Singer y Clark, 1999, Kumar y cols., 2010; McGavin y Zachary, 2012).

La cicatrización es una respuesta defensiva altamente organizada y compleja regulada por numerosos mediadores químicos que liberan y modulan las células inflamatorias y las células parenquimatosas cutáneas en la zona afectada (Baum y Arpey, 2005; Schrmel y cols., 2010). Para ayudar a entender la sucesión de cambios que ocurren en la herida, clásicamente se distinguen tres grandes fases que se suceden en el tiempo y se solapan durante la cicatrización por segunda intención: 1. Coagulación-inflamación, 2. Proliferación y 3. Remodelación.

La secuencia de acontecimientos en el proceso de cicatrización empieza inmediatamente después de la lesión, con la activación de la cascada de la coagulación, y el inicio de la fase inflamatoria. La hemostasia induce primero un vasoespasmo, a menos que exista un trastorno de coagulación. Pero este espasmo desaparece rápidamente y los vasos sanguíneos lesionados se relajarán poco después, permitiendo el sangrado adicional si las plaquetas/trombocitos no se involucran. La formación del coágulo sirve no sólo para aproximar los bordes de la herida, sino también para sustentar a la fibronectina y proporcionar una matriz provisional en la cual los fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos pueden entrar en el herida (Werner, 2003; Tsirogianni y cols., 2006; Kumar y cols., 2010; McGavin y Zachary, 2012).

Entre las 24-48 horas siguientes al daño, la fase de inflamación aguda se ha establecido totalmente y puede durar hasta 96 horas o más tiempo si el proceso de curación se ve perturbado por infección, trauma, o algún otro factor. Los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos son el primer tipo de células de la sangre que llegan a la zona de la lesión. Estas son las células predominantes durante los primeros 3 días posteriores a la lesión, con su número alcanzando un máximo en aproximadamente

48 horas. La función principal es la fagocitosis de las partículas extrañas y microorganismos (Werner, 2003; Tsirogianni y cols., 2006; Kumar y cols., 2010; McGavin y Zachary, 2012).

A continuación los monocitos circulantes penetran en la herida y se transforman en macrófagos y en células dendríticas. En general, alcanzan su número máximo a las 24-36 horas después de producirse la herida. Los macrófagos fagocitan y limpian el área de detritus celulares y agentes patógenos. Las células "natural killer" también se activan y secretan interferón gamma, que a su vez activa los macrófagos. Además de la fagocitosis, los macrófagos juegan un papel esencial en la inducción de mecanismos del sistema inmune adaptativo, así como en la producción de sustancias que son cruciales en el proceso de cicatrización de la herida (Kumar y cols., 2010, Schreml y cols., 2010).

La formación de tejido de granulación (fase de proliferación) comienza a las 48-72 horas después de la lesión. Se caracteriza por producir nuevos capilares a partir de los preexistentes, proliferación de fibroblastos y nueva matriz extracelular que constituyen el denominado "tejido de granulación" que representa la base de la reparación de la herida. Además, los macrófagos activados liberan diversos mediadores químicos como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1) y factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) que estimulan a los fibroblastos a proliferar, migrar hacia el espacio de la herida y sintetizar los glicosaminoglicanos, proteoglicanos y el colágeno de la nueva matriz extracelular (MEC). Los fibroblastos se convierten en el tipo celular dominante, alcanzando cantidades máximas en 7-14 días. Mientras tanto, empiezan a producir el factor de crecimiento de fibroblastos básico (b FGF), TGF- $\beta$ 1, PDGF, así como el factor de crecimiento de queratinócitos (KGF) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 que facilitan la síntesis de la nueva MEC (Tsirogianni y cols., 2006; Kumar y cols., 2010; Schreml y cols., 2010).

La formación de nuevos vasos sanguíneos capilares es esencial para proporcionar nutrientes y oxígeno al nuevo tejido de granulación metabólicamente activo. Durante este complejo proceso, las células endoteliales proliferan y migran a través de la matriz extracelular para formar brotes de nuevos vasos capilares. Los principales estímulos para la proliferación de células endoteliales son la liberación de los factores de crecimiento de fibroblastos ácido y básico (FGF) por los macrófagos y la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por los queratinocitos y los macrófagos. El factor de crecimiento de fibroblastos básico también estimula las

células endoteliales para liberar proteasas, que digieren las membranas basales. Esta fragmentación permite que las células endoteliales migren, utilizando ciertas moléculas de adhesión y formen nuevos vasos sanguíneos en el sitio de la lesión (Schreml y cols., 2010).

La reepitelización se encuadra dentro en la fase de proliferación y es fundamental para la óptima curación de la herida, no sólo por la reconstitución de la barrera cutánea, sino también por su papel en la contracción de la herida. En cuestión de horas después de la lesión, los queratinocitos de la epidermis empiezan a migrar sobre la matriz provisional formada por el exudado inflamatorio y coágulo inicial y, 1 o 2 días más tarde comienzan a proliferar. La motilidad de queratinocitos es facilitada por la expresión de receptores de superficie de la integrina que interaccionan con una variedad de componentes de la matriz extracelular, tales como la fibronectina, vitronectina, fibrina y el colágeno tipo 1 del estroma. Los macrófagos y los propios queratinocitos producen TGF -  $\beta$ 1 y el factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HB-EGF) que median la migración y la proliferación de los queratinocitos. Los fibroblastos también secretan KGF que contribuye a la reepitelización (Park y Barbul, 2004, Schreml y cols., 2010).

La fase de proliferación puede durar hasta 3 a 4 semanas o más, dependiendo del tamaño de la herida y otras circunstancias concurrentes (Kumar y cols., 2010).

La remodelación (maduración, contracción) tiene lugar sólo después de que las fases de inflamación y proliferación se hayan completado exitosamente. Incluye la remodelación del tejido de granulación con tejido conectivo inmaduro y su conversión en tejido conjuntivo maduro través de la forma de colágeno extracelular (Kumar y cols., 2010; McGavin y Zachary, 2012).

Durante la segunda semana de la curación, parte de los fibroblastos sufren una modulación fenotípica y se diferencian en miofibroblastos. Estas células tienen características contráctiles y hacen que los bordes de la herida se aproximen, reduciendo así el área del tejido lesionado. La producción de colágeno sigue siendo el proceso dominante en la cicatrización de heridas hasta 6 semanas después del inicio de la curación. Entonces los fibroblastos dejan de producir colágeno y entran en apoptosis. La remodelación de las fibras de colágeno y la resíntesis permite que la herida se fortalezca por la reorientación de aquellas. La degradación del colágeno es dependiente de las enzimas proteolíticas específicas conocidas como metaloproteinasas de la matriz (MPM) que son producidas por los macrófagos,

queratinocitos y fibroblastos. La remodelación continuará hasta 2 años y la piel resultante nunca logra la misma resistencia a la tracción que la piel no lesionada (Kumar y cols., 2010).

Los trabajos que describen la cicatrización de heridas en los reptiles son escasos, la mayoría antiguos con descripciones vagas y escasamente documentadas; cuando se han realizado estudios experimentales de cicatrización llama la atención que los animales se han mantenido en condiciones de aislamiento y a temperatura constante, posiblemente para poder establecer correlaciones con los conocimientos que se tiene de mamíferos (Maderson y Roth, 1972; Smith y Baker, 1988; French y cols, 2006; Keller y cols., 2014). Sin embargo, estas condiciones controladas no reproducen las del medio natural especialmente en especies acuáticas y semi-acuáticas. Basado en los escasos estudios existentes, Cooper (2006) establece que en reptiles las fases de la cicatrización de heridas serían muy similares a las descritas en mamíferos pero siempre con la salvedad destacada por todos los autores de que la temperatura del medio influiría directamente en la velocidad y la eficacia de la cicatrización en estas especies heterotermas.

Con carácter general, una lesión en la piel de reptiles se caracteriza por una respuesta vascular e inflamatoria, seguida por fibroplasia y el restablecimiento de la integridad cutánea. Las serpientes parecen tener generalmente una buena respuesta inflamatoria a la lesión cutánea, mientras que en los lagartos puede ser mínima. La reacción inflamatoria en las serpientes se caracteriza por la presencia principalmente de heterófilos y macrófagos, y los heterófilos persisten más tiempo en la lesión que los macrófagos; esto los diferenciaría de los vertebrados superiores, en los que generalmente los macrófagos están presentes en la herida por más tiempo y constituyen una célula clave en la proliferación del tejido de granulación y fibroplasia (Carlson y Allen, 1970; Smith y Barker, 1988; Maderson, 1995, Kumar y cols., 2010; Scheml y cols., 2010).

Por otra parte, según estudios previos la respuesta fibroblástica en las heridas de piel de los lagartos y en las serpientes generalmente se origina desde los márgenes laterales de la dermis, mientras que en los mamíferos se origina desde los tejidos subcutáneos del lecho de la herida. Además, se ha descrito que las serpientes, en general, forman una costra epitelial significativa, mientras que no ocurre lo mismo en los lagartos (Carlson y Allen, 1970; Smith y Barker, 1988; Maderson, 1995).

### **Mediadores químicos y factores de crecimiento moduladores de la cicatrización**

En el proceso de cicatrización, el depósito de tejido conjuntivo en la zona de la herida se produce en dos etapas: una con la migración y proliferación de fibroblastos en la zona y otra con el depósito de proteínas de la MEC producida por estas células. El reclutamiento y la activación de los fibroblastos para sintetizar las proteínas del tejido conectivo son regulados por muchos factores de crecimiento, como PDGF, FGF-2 y TGF- $\beta$ . Las células inflamatorias son la fuente principal estos factores, en particular los macrófagos presentes en el sitio de la lesión y en el tejido de granulación. Además, la piel tiene abundantes mastocitos perivasculares y linfocitos residentes que colaboran en el proceso. Cada uno de estos tipos de células puede secretar citocinas y factores de crecimiento que contribuyen a la proliferación y activación de fibroblastos. También es interesante saber que a medida que progresa la curación, el número de fibroblastos y nuevos vasos comienza a disminuir y progresivamente los fibroblastos asumen un fenotipo más sintetizador de colágeno y MEC que se va depositando progresivamente en la zona reparada (Kulmar y cols., 2010).

La fase inicial después de la lesión cutánea se caracteriza por reacciones inflamatorias mediadas por las citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, gradientes de pH y pO<sub>2</sub> así como sus acciones sobre los receptores celulares. Con todo ello, se activan las cascadas de señalización intracelular que contribuye a la proliferación, migración y diferenciación celular. De forma concomitante, diversos factores quimioatrayentes reclutan diferentes tipos de células, tales como los granulocitos y macrófagos en el sitio de la herida, iniciando así la reparación (Schreml y cols., 2010).

La interrupción de la circulación conduce a la formación del coágulo de sangre, que se compone de fibrina reticulada y de proteínas de la matriz extracelular tales como fibronectina, vitronectina y trombosponina. Además de proporcionar una barrera contra los microorganismos invasores, el coágulo sanguíneo también sirve como una matriz para las células migratorias y como un depósito de factores de crecimiento requeridos durante el proceso de curación (Clark, 1993; Werner y Grose, 2003).

Los neutrófilos llegan primero dentro de los primeros minutos, seguidos de los monocitos y linfocitos. Producen una amplia variedad de proteinasas y especies reactivas del oxígeno como una defensa contra microorganismos contaminantes, y que están involucrados en la fagocitosis de los residuos celulares. Además de estas funciones de defensa, las células inflamatorias son también una importante fuente de

factores de crecimiento y citocinas, que inician la fase proliferativa de la reparación de heridas. Rápidamente, empieza la migración y la proliferación de los queratinocitos en borde de la herida, seguida por la proliferación dérmica de fibroblastos alrededor de la lesión. Estas células posteriormente migran dentro de la matriz provisional y producen grandes cantidades de matriz extracelular. Además, fibroblastos de la herida adquieren un fenotipo contráctil y se transforman en miofibroblastos, que desempeñan un papel importante en la contracción de la herida (Clark, 1993).

Todas las etapas del proceso de reparación son controladas por una amplia variedad de factores de crecimiento y citoquinas. Múltiples estudios han demostrado un efecto beneficioso de muchos de estos factores de crecimiento, por ejemplo, factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), y el factor estimulante de granulocitos y de colonias de macrófagos (GM-CSF) en el proceso de curación, tanto en modelos animales como en seres humanos que sufren diferentes tipos de trastornos de la cicatrización (Abraham y Klagsbrun, 1996; Greenhalgh, 1996; Edmonds y cols., 2000; Harding y cols., 2002). El PDGF fue el primer factor de crecimiento en que se demostró un efecto en la quimiotaxis de células que migran en la piel durante la curación de las heridas, tales como neutrófilos, monocitos y fibroblastos. Además, actúa aumentando la proliferación de fibroblastos y la producción de matriz extracelular por estas células (Clark, 1993; Heldinch y Westermarck, 1999).

Diferentes estudios sugieren un papel importante del PDGF endógeno en el proceso de reparación tisular. Tras la lesión, PDGF se libera en grandes cantidades durante la desgranulación de las plaquetas (Ross y cols., 1974), y está presente en la herida, sobre todo en el inicio de la lesión (Breuing y cols., 1997; Vogt y cols., 1998). Los patrones de PDGF y la expresión del receptor para PDGF sugieren un mecanismo paracrino de acción, ya que son predominantemente expresados en la epidermis, mientras que los receptores se encuentran en la dermis y el tejido granulación (Beer y cols., 2000).

Los FGFs comprenden un conjunto de factores de crecimiento de polipéptidos, que actualmente consta de 22 miembros (Ornitz y Itoh, 2001). Se transducen sus señales a través de cuatro proteínas tirosina quinasas transmembrana de alta afinidad, receptores de FGF 1-4 (Johnson y Willians, 1993), que se unen a los diferentes FGFs con diferentes afinidades. La mayoría de los FGFs se unen a un subconjunto específico de receptores de FGF. Una característica de los FGFs es su interacción con la heparina que es esencial para la activación de los receptores.

Se conocen numerosos efectos in vivo de los FGFs que permitirían desarrollar, a estos factores de crecimiento, un papel importante en la reparación de heridas. En particular, se ha demostrado que los FGF1 y FGF2 son capaces de estimular la angiogénesis en diversos sistemas de ensayo (Risau, 1990). Además, los FGFs son mitógenos para varios tipos de células presentes en el sitio de la herida, incluyendo fibroblastos y queratinocitos (Abraham y Klagsbrun, 1996). Algunos FGFs se han detectado en el sitio de la herida, lo que indica que las proteínas endógenas son también reguladores de la cicatrización de heridas. El FGF2 se encontró en heridas de humanos y en el exudado de heridas en cerdos, sobre todo en etapas tempranas después de lesiones (Grayson y cols., 1993; Cooper y cols., 1994; Nissen y cols., 1996; Vogt y cols., 1998). A través de estudios de inmunohistoquímica, se han localizado FGFs en piel lesionada. En ratón, utilizando un modelo de herida incisional, se encontró extracelularmente en la superficie de la herida el FGF2 así como dentro de la dermis adyacente a la herida (Whitby y Ferguson, 1991). Para obtener evidencias funcionales del FGF2 en la reparación de heridas, Broadley y cols. (1989) utilizaron un anticuerpo policlonal neutralizante específico para FGF2 humano. El análisis histológico de las heridas reveló un severo retraso en la reepitelización de la herida en los ratones tratados en comparación con los compañeros de camada de control. En el día 5 después de la lesión, el número de queratinocitos que proliferan en el epitelio se redujo un 80-90% en comparación con los ratones de control. Estos resultados demostraron un importante papel para el receptor de FGF de señalización en la reparación de heridas, aunque el tipo de FGF que es responsable no fue identificado por este estudio.

La familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) comprende varios miembros, el EGF, el factor de crecimiento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), así como anfirregulina, epirregulina, betacelulina, neurregulinas, entre otros (Tsahar y cols., 1998; Yarden, 2001; Strachan y cols., 2001). Todos estos factores de crecimiento ejercen sus funciones mediante la unión de alta afinidad con cuatro receptores diferentes y se han demostrado un efecto positivo de EGF, TGF- $\alpha$  y HB-EGF sobre la reparación de heridas. Grotendorst y cols. (1989) detectaron factores similares a EGF en el exudado de heridas de ratas, y se demostró que extractos de este tipo de fluido de la herida tenía una actividad quimiotáctica para las células endoteliales que se neutralizaba con un anticuerpo anti-EGF. Además, se identificó HB-EGF como el principal factor de crecimiento en heridas en piel en cerdos (Marikovsky y cols., 1993). Debido a que el HB-EGF es mitógeno para fibroblastos y queratinocitos, se sugirió que desempeñaría un importante papel en la formación del tejido de granulación y reepitelización. También se ha demostrado que

puede actuar sinérgicamente con el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)-1, otro factor de crecimiento presente en el exudado de las heridas y que se ha demostrado es capaz de estimular la proliferación de queratinocitos *in vitro* (Marikovsky y cols., 1996).

Por otro lado, la coordinación de las sucesivas fases de la inflamación en la cicatrización requiere un sutil equilibrio de citoquinas pro-inflamatorias y de sus antagonistas. Aunque la interleucina (IL)-1 se conoce como un factor clave, poco se sabe acerca de las funciones del receptor de IL-1 antagonista (IL-1ra). Ishida y cols. (2006) mostraron que IL-1ra en ratones provoca una interrupción del factor de crecimiento transformante (TGF)- $\beta$ 1 en la formación y depósito de colágeno así como en la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Las alteraciones del equilibrio entre factores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios son una de las razones centrales para la inflamación persistente en curación de heridas crónicas. La complejidad y variedad de moléculas, células y factores de crecimiento que interactúan en el proceso de cicatrización de heridas posibilitan estrategias alternativas en el tratamiento de lesiones en la práctica clínica diaria (Schreml y cols., 2010).

### **La insulina como factor de crecimiento**

La insulina es una hormona polipeptídica y factor de crecimiento con diversas funciones fisiológicas. Se conoce principalmente por regular los niveles de glucosa en la sangre y la síntesis de proteínas, pero en el último siglo se ha demostrado que la insulina desempeña un papel fundamental en la diferenciación de las células de todos los vertebrados. La insulina ejerce importante función metabólica y participa en los procesos mitogénicos celulares mediados a través del receptor de insulina que está presente en los tejidos prácticamente de todos los vertebrados (Kahn 1985).

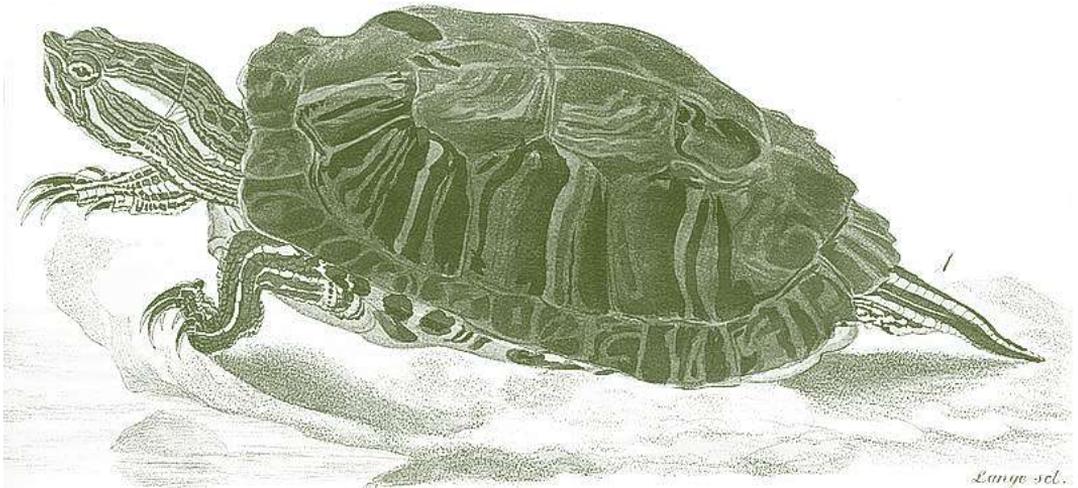
La insulina es uno de los posibles mediadores hormonales de la producción de colágeno. Se sabe que estimula la síntesis de colágeno en los fibroblastos de la piel en una manera selectiva (Chaiken y cols. 1986; Flier y cols. 1986). Pellegrinelli y cols. (2001) describieron la presencia de receptores de insulina en los queratinocitos de la epidermis y en los folículos pilosos, e identificaron las vías de señalización por las cuales la insulina puede promover el crecimiento de la piel. También se ha demostrado que los queratinocitos humanos son dependientes de la insulina para su crecimiento (Tsao, 1982). Varios experimentos *in vitro* sugieren que factores de crecimiento, tales como la insulina, pueden actuar como quimiotácticos y mitógenos

para las células implicadas en la cicatrización de heridas, y que pueden estimular la angiogénesis, la formación y degradación de la MEC y la liberación de citoquinas (Greenhalgh y cols., 1990; Ando y Jensen, 1993; Benoliel y cols., 1997). El aumento del número de fibras de colágeno en animales tratados con insulina está de acuerdo con informes en los que se encontró que la insulina tópica mejora la curación de heridas al influir sobre los miofibroblastos y aumentar la formación de colágeno (Madibally y cols., 2003; Kassem y Trau, 2007). Liu y cols. (2009), estudiando las heridas en la piel de ratas tratadas tópicamente con insulina, observaron que se curaron más rápidamente, y que la insulina estimulaba la proliferación y la migración de los queratinocitos y la migración de células del endotelio microvascular.

La naturaleza química de la insulina en tortugas no se conoce pero se ha demostrado que el mismo antisuero desarrollado frente a la insulina porcina reacciona con las células  $\beta$  del páncreas de tortugas del género *Chrysemys* (actualmente *Trachemys*) y de otros quelonios al igual que lo hace en páncreas de ratones y ratas (Gapp y Polak, 1990). Otros estudios han confirmado la presencia de insulina en el páncreas y el intestino de diferentes especies de reptiles incluyendo los quelonios (Pérez-Tomas y cols., 1989; Campbell, 2006). Sin embargo, nuestra revisión bibliográfica demuestra que, a pesar de la evidencia del papel importante de la insulina tópica en la promoción de la cicatrización de heridas en varios modelos animales, no se han realizado estudios similares en reptiles.



# Material y Métodos



*"El Dios de la Biblia es también el Dios del genoma. Él puede ser adorado en una catedral o en un laboratorio. Su Creación es majestuosa, asombrosa, compleja y bella."*

*Francis Collins, genetista director del "Proyecto genoma humano" (1950)*



## 4. Material y métodos

Para alcanzar los dos objetivos planteados en el proyecto de esta tesis doctoral y demostrar nuestra hipótesis de trabajo se realizaron dos estudios experimentales consecutivos:

1. Estudio clínico e histopatológico de la cicatrización espontánea por segunda intención de heridas experimentalmente inducidas. Realizado en el periodo comprendido entre abril y agosto de 2013.
2. Estudio del efecto de la aplicación tópica de insulina porcina sobre la cicatrización en de heridas experimentalmente inducidas. Realizado en el periodo comprendido entre mayo y julio de 2014.

En ambos diseños experimentales, tanto las instalaciones como las condiciones ambientales, los procedimientos utilizados en la valoración clínica, microscópica y morfométrica, así como el personal involucrado en el manejo de los animales fueron iguales en los dos estudios por lo que se describen en este apartado evitando las repeticiones metodológicas.

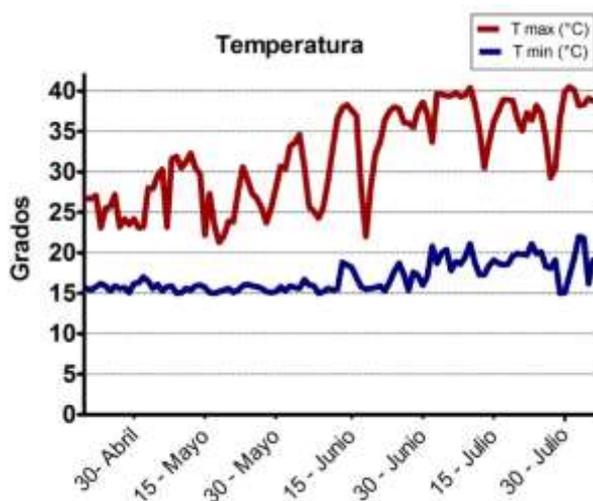
### 4.1. Animales

Los animales utilizados en los experimentos pertenecen a la colección del Parque Zoológico Municipal de Córdoba (Fig. 1) que desarrolla varios proyectos científicos y educacionales. Uno de ellos, es el Programa Andaluz para el control de las especies exóticas invasoras en lo cual actúa como centro receptor de estas especies.

**Experimento 1.** Para el estudio de la cicatrización por segunda intención se utilizaron veinticuatro tortugas hembras adultas, con un rango de peso de 450 a 2000 g de la especie *Trachemys scripta elegans* (Fig. 2). Todos fueron considerados sanos en base al examen físico, el análisis hematológico (Fig. 3) y el análisis de flotación fecal. Las tortugas fueron identificadas con microchip (Fig. 4 y 5) y se alojaron al aire libre en

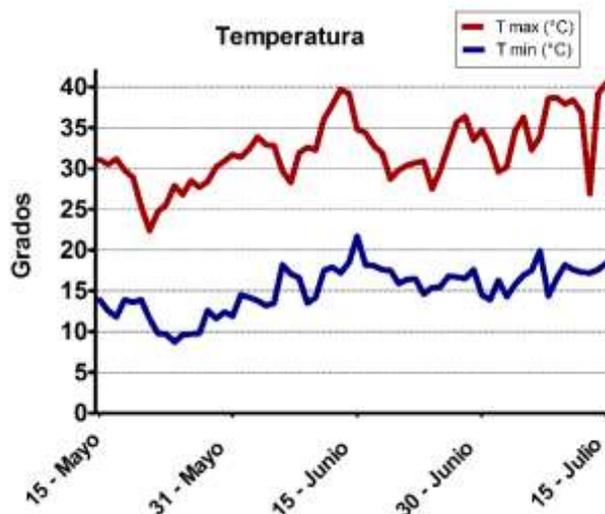
seis patios cerrados (cuatro animales en cada uno) con una superficie de 3 m<sup>2</sup>; cada patio incluía una piscina de plástico (900 litros de capacidad). El agua de las piscinas se cambiaba todos los días y procedía de la red pública de abastecimiento; los principales parámetros de calidad del agua fueron pH 7,72; nitritos 0,023 mg/L; amoníaco 0,266 mg/L; aluminio <100µg/L; combinado de cloro 0,86 mg/L; con el número de bacterias negativas para *Escherichia coli*, coliformes y bacterias aeróbicas a 22°C. La empresa municipal de agua de Córdoba (EMACSA) realiza controles microbiológicos y fisicoquímicos del agua dos veces al mes y publica los resultados en su página web. Todos los animales tuvieron libre acceso a un área de solárium y se alimentaron *ad libitum* con una dieta comercial para tortugas acuáticas (Aquatic Turtle Monster Diet, Zeigler Bros., Inc., Gardners, PA, EEUU).

Después de un período de dos semanas de adaptación, las tortugas fueron asignadas a dos grupos experimentales de igual tamaño (n=12). El **Grupo 1** se utilizó para evaluar las características clínicas, incluida la retracción de la herida; el **Grupo 2**, se utilizó para el estudio histológico de la cicatrización, para lo cual tres heridas de diferentes animales fueron rebiopsiadas a los 2, 7, 14, 21, 28, 42, 60 y 135 días de inducir la herida. Ambos grupos de animales fueron expuestos a las variaciones de temperatura ambiental propias de la época del año (Gráfica 1), y la humedad osciló entre el 48 y el 55%, propio de la estación (primavera/verano) en nuestra región geográfica (MacArthur y cols., 2004). Este periodo del año se consideró adecuado debido a que las tortugas habían salido de su periodo de hibernación y las condiciones meteorológicas eran óptimas para mantener su metabolismo activado.



Gráfica 1: Registro de las temperaturas ambientales máxima y mínima medidas en los terrarios de tortugas durante el período de estudio de 20 de abril hasta 5 de agosto de 2013. (Termómetro digital MicroLite USB data loggers LITE 5032P, Fourtec-Fourrier Technology, EEUU).

**Experimento 2.** Para la evaluación del efecto de la aplicación tópica de insulina porcina en la cicatrización de heridas experimentalmente inducidas se utilizaron 44 tortugas hembras adultas, con un rango de peso de 525 a 2100 g, de la especie *Trachemys scripta elegans*. Como se ha indicado anteriormente, se utilizó la misma metodología descrita en el experimento anterior para el control sanitario, identificación, manejo de los animales, e inducción de la herida y posteriores estudios clínico e histopatológico. Tras el período de adaptación, los animales fueron asignados en dos grupos. El Grupo 1, con 24 animales, se utilizó para evaluar las características clínicas de la cicatrización incluida la evaluación de la retracción de la herida; el Grupo 2, con 20 animales, se utilizó para la evaluación histológica. Tras la inducción de la herida se re-biopsiaron a los 2, 7, 14, 21 y 28 días; en cada tiempo se tomaron las muestras de 8 heridas (4 tratadas con insulina y 4 control). El seguimiento fue realizado durante 28 días pues los principales cambios ocurren en este periodo y es un tiempo suficiente largo para poder evaluar los efectos clínicos de cualquier intervención terapéutica. Ambos grupos se mantuvieron siempre en las mismas instalaciones descritas en el experimento 1 y compartieron las mismas condiciones ambientales (Gráfica 2).



Gráfica 2: Registro de las temperaturas ambientales máxima y mínima medidas en los terrarios de tortugas durante el período de estudio de 15 de mayo hasta 15 de julio de 2014. (Termómetro digital MicroLite USB data loggers LITE 5032P, Fourtec-Fourrier Technology, EEUU).

## 4.2. Inducción de la herida: biopsia inicial y controles

En los experimentos 1 y 2, los animales fueron anestesiados con ketamina 20 mg/Kg IM (Imalgene® 100 mg/mL, Merial, Barcelona, España) y con detomidina, 0,5 mg/Kg IM (Domosedan® 10 mg/mL, Lab. Esteve, Barcelona, España) inyectadas separadamente en las patas delanteras. Sin previa desinfección, se hizo de forma simétrica una herida de 6 mm de diámetro en la cara dorsal de cada extremidad trasera utilizando un bisturí circular desechable (Fig. 6). En ambos experimentos, las heridas del Grupo 2 (Diagramas 1 y 2), para estudio histológico de la cicatrización espontánea y de heridas tratadas, se rebiopsiaron bajo el mismo protocolo de anestesia general con un bisturí circular desechable de 8 mm de diámetro. Después de cada procedimiento de biopsia, los animales se alojaron en terrarios individuales a temperatura ambiente durante aproximadamente 12 horas. La hemorragia de las heridas fue mínima en todas las tortugas y controlada con la presión digital. Tras el período de recuperación, los animales no mostraron signos de malestar y fueron devueltos a sus recintos. No se empleó anestesia local ni se administraron analgésicos post-biopsia o antiinflamatorios para evitar que interfiriesen con la cicatrización de las heridas. Todas las muestras de piel obtenidas cuando se realizaron las heridas fueron fijadas en formaldehído al 10% tamponado durante 16 a 20 horas y procesadas hasta su inclusión en parafina. Los cortes histológicos de las biopsias iniciales se utilizaron como controles internos de la estructura normal de la piel en la zona de las heridas.

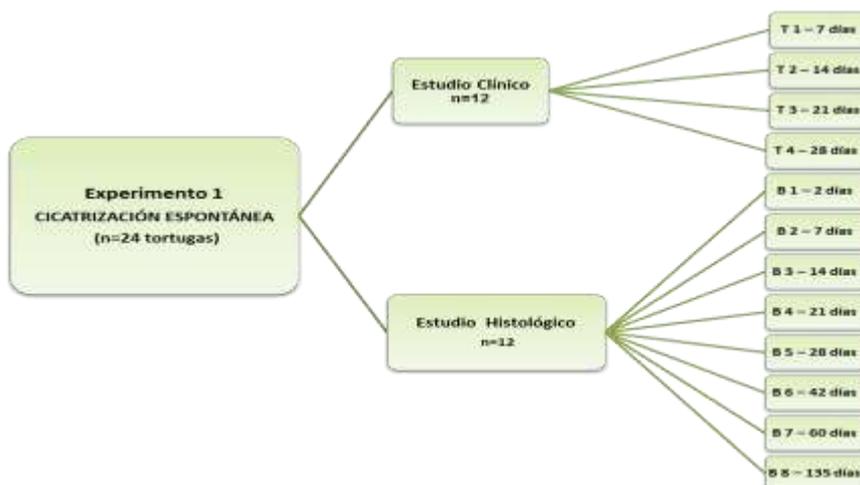


Diagrama 1. Esquematación de los animales utilizados en el experimento 1 y toma de muestras.

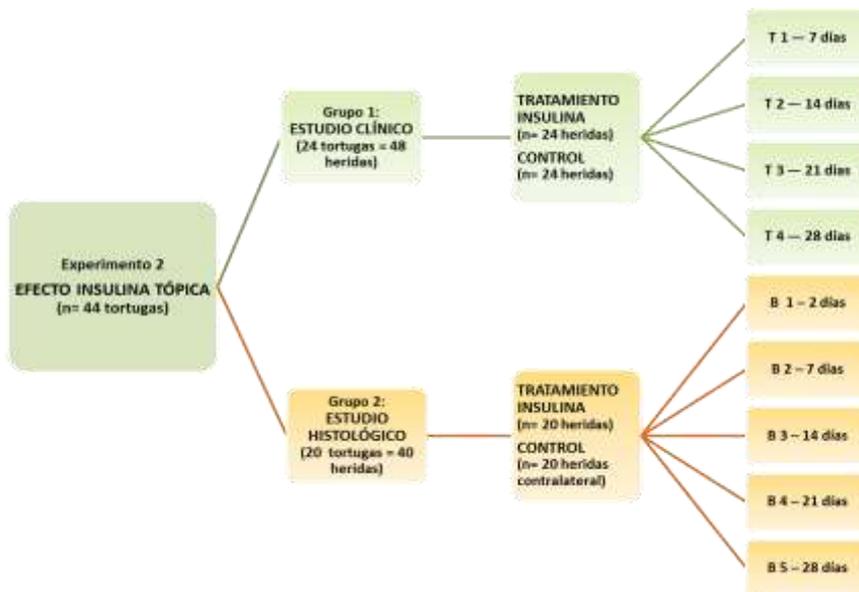


Diagrama 2. Esquematación de los animales utilizados en el experimento 2 y toma de muestras.

### 4.3. Evaluación clínica de la cicatrización

La evaluación clínica de curación de las heridas y valoración de la retracción se llevó a cabo en 24 heridas (Grupo 1). Las heridas fueron fotografiadas el día de su inducción (Fig. 7) y semanalmente hasta el día 28 después de la inducción (tiempos de control T0 a T4) usando un objetivo macro (Nikon AF-S DX 40 mm). Todas las fotografías se realizaron colocando una regla milimetrada junto a la herida que sirvió como escala interna para obviar las variaciones en la distancia de enfoque y para usar como escala durante la medición digital de la herida. Con este fin se utilizó un software de análisis de imágenes con el que se midieron dos diámetros de cada herida en cada tiempo de control (Fig. 8) para calcular posteriormente el perímetro de la herida (Analysing digital imaging, Global System Science, University of California, Berkeley, EEUU, <http://dew.globalsystemscience.org/software>). La retracción de la herida se valoró calculando el porcentaje de reducción del perímetro de la herida en cada tiempo de control frente al perímetro de la herida inicial (T0). La medición digital de las heridas se hizo durante 4 semanas, hasta el día 28 posterior a la realización de la herida (T4). Otras medidas, incluyendo el área y el diámetro también se examinaron y proporcionaron información comparable. Las fotografías fueron valoradas siguiendo un modelo de un estudio ciego con dos observadores independientes. El coeficiente

de correlación entre los observadores fue de 0,98 y 0,97; calculado a partir de 20 medidas repetidas del perímetro y del área de la herida, respectivamente.

En el experimento 2 para evaluar el efecto de la insulina tópica sobre la cicatrización, se evaluó la retracción de la herida y las características macroscópicas de la cicatrización en 48 heridas del Grupo 1 (24 heridas control y 24 heridas tratadas con insulina) con la misma metodología aplicada en el proceso de cicatrización normal por segunda intención.

#### **4.4. Tratamiento tópico con insulina**

En el experimento 2, para el tratamiento tópico de las heridas se utilizó insulina porcina (Caninsulin® 40 UI/mL, MSD Animal Health, Salamanca, España) a la concentración de 5 UI/mL diluida en glicerol (G5516, Sigma-Aldrich, Inc., Missouri, EEUU). La primera aplicación se realizó a las seis horas de la inducción de la herida y diariamente durante la primera semana (7 días de tratamiento). La herida contralateral recibió sólo glicerol tópico en los mismos tiempos. Después de cada aplicación, las tortugas se mantuvieron durante una hora en un terrario sin acceso al agua.

#### **4.5. Estudio histológico**

Para el estudio microscópico todas las biopsias fueron fijadas en formaldehído al 10% tamponado durante 16 a 24 horas; se cortaron en dos mitades y se procesaron para inclusión en parafina de acuerdo con los procedimientos histológicos de rutina. De los bloques de parafina formados se hicieron cortes de 4 a 5 micrómetros de espesor. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H&E), ácido periódico de Schiff (PAS), tinción de plata metenamina de Gomori (PAMS), tricrómico de Masson (TM) y tinción de Fraser-Lendrum (FL) para el estudio morfológico general, la zona de membrana basal (ZMB) e identificar con precisión el tejido fibroso proliferación/remodelación y exudado de fibrina, respectivamente. Se realizó para cada tiempo y muestra la evaluación microscópica sistemática de la re-epitelización y la formación de la zona de la membrana basal (ZMB), y los cambios morfológicos durante las fases de inflamación, proliferación, la progresión y remodelación del tejido de granulación que forma la cicatriz en la zona de la herida (Fig. 9).

#### 4.6. Estudio inmunohistoquímico

El objetivo del estudio inmunohistoquímico fue valorar si, en la piel de tortuga fijada en formol y con inclusión en parafina, se producía reacción cruzada con algunos anticuerpos comerciales utilizados comúnmente como marcadores celulares de células de mamíferos; si resultaran fiables permitiría su uso en el estudio de patologías de la piel y particularmente para caracterizar diferentes células durante el proceso de cicatrización de las heridas (Fig. 10). Se testó un panel de 15 anticuerpos monoclonales y policlonales cuyos datos se muestran en la Tabla 1. El estudio fue realizado en la piel normal de las tortugas, (primeras biopsias realizadas para inducir las heridas) y también en las biopsias tomadas a diferentes tiempos para el estudio de las fases del proceso cicatricial. El método inmunohistoquímico usado fue el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) (Perez y cols., 1999). Brevemente, se realizaron cortes de 4-5 micras que se recogieron en portaobjetos tratados con resina adherente; se desparafinaron en xilol y se rehidrataron en escala ascendente de alcoholes. La recuperación del antígeno se llevó a cabo mediante el pretratamiento de las secciones con pronasa 0,75% en tampón fosfato salino (PBS) durante 10 min a temperatura ambiente, o con ácido cítrico 0,01 M, pH 6 en un horno de microondas (650 W) durante 2 min, y después a temperatura baja (150 W) durante 5 min; la elección de un pretratamiento u otro se hizo siguiendo las recomendaciones del fabricante del anticuerpo. De forma sistemática los cortes histológicos se lavaron en PBS 0,01M pH 7,2; entre cada paso de la técnica. La peroxidasa endógena se inactivó mediante incubación en peróxido de hidrógeno metanol al 3% durante 30 min y la unión no específica del anticuerpo secundario fue bloqueada por incubación con suero normal de cabra al 10% durante 30 min a temperatura ambiente. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario, bien durante la noche en una cámara humidificada a 4°C, o bien durante 3h a temperatura ambiente; a continuación se incubó con el anticuerpo secundario (monoclonal de cabra anti-ratón o policlonal de cabra anti-conejo, Dako, Glostrup, Dinamarca) a la dilución específica (1:50 o 1:200, respectivamente) durante 30 min.

Para revelar la inmunorreacción se utilizó a continuación el Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, EEUU), durante 60 min a temperatura ambiente y en cámara oscura. Posteriormente el cromógeno utilizado fue Vector® Novared (Vector Laboratories, Inc). Los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se procedió al montaje con cubreobjetos utilizando el medio conservante y adhesivo EUKITT® (Sigma-Aldrich Co, Alemania). La positividad de la inmunorreacción se demostró como una tinción marrón, difusa o granular,

intracitoplasmática o la membrana plasmática en las células que expresan el antígeno. Como control positivo se utilizaron piel normal y nódulos linfáticos de perros. Para los controles negativos se incubó con el diluyente de anticuerpos en lugar de los anticuerpos primarios.

Tabla 1: Panel de anticuerpos y procedimientos utilizados para el estudio inmunohistoquímico en la piel de tortugas de la especie *Trachemys scripta elegans*.

Anticuerpo	Clon	Especificidad	Tratamiento	Dilución	Incubación
<b>Citoqueratinas *</b>	AE1/AE3	Epitelio simple y estratificado	Pronasa	1:100	18 horas a 4°C
<b>CK 5/6 *</b>	D5/16B4	Citoqueratinas 5 y 6	Pronasa	1:50	18 horas a 4°C
<b>Anti-human cytokeratin *</b>	MNF 116	Células epiteliales	Citrato	1:50	18 horas a 4°C
<b>Desmina *</b>	D 33	Células musculares lisas y estriadas	Citrato	1:50	18 horas a 4°C
<b>Vimentina *</b>	Vim 3B4	Células mesenquimales	Citrato	1:100	18 horas a 4°C
<b>NCL-MSA §</b>	HHF 35	Musculo liso	Pronasa	1:200	18 horas a 4°C
<b>Factor VIII *</b>	Policlonal	Células endoteliales	Citrato	1:100	3 horas a temperatura ambiente
<b>Lisozima *</b>	Policlonal	Lisozima	Pronasa	1:200	3 horas a temperatura ambiente
<b>Myeloid/Histiocyte Antigen *</b>	MAC 387	Macrófagos/histiocitos	Pronasa	1:100	3 horas a temperatura ambiente
<b>α-1 antitripsina*</b>	Policlonal	Leucocitos polimorfonucleares, monocitos	Citrato	1:75	18 horas a 4°C
<b>CD3 §</b>	LN 10	Linfocitos	Pronasa	1:200	3 horas a temperatura ambiente
<b>CD 14 ¥</b>	CAM36A	Macrófagos	Citrato	1:50	18 horas a 4°C
<b>CD 21 ¥</b>	GB25A	Células dendríticas foliculares y células B maduras	Citrato	1:50	18 horas a 4°C
<b>CD 31 *</b>	JC70A	Células endoteliales/vasos sanguíneos	Citrato	1:20	18 horas a 4°C
<b>CD 68 §</b>	514H12	Macrófagos	Citrato	1:100	18 horas a 4°C

\*Dako, Glostrup, Dinamarca; § Leika Biosystems, Milton Keynes, Reino Unido;

¥ Monoclonal Antibody Center, Washington State University, EEUU.

#### 4.7. Análisis morfométrico

El estudio morfométrico se realizó para valorar la evolución de la respuesta inflamatoria en las diferentes fases del proceso de cicatrización y poder disponer con ello de un patrón de referencia cuando los animales se encuentran en condiciones ambientales con variaciones de la temperatura propias de la época del año.

**Experimento 1.** Para el análisis morfométrico de la cicatrización normal, se utilizaron tres cortes histológicos, no seriados, teñidos con H&E de cada una de las tres biopsias de las heridas tomadas a los 2, 7, 14, 21, 28, 42 y 60 días post-inducción de la herida. Aunque el seguimiento de la cicatrización se realizó en este estudio hasta los 135 días, el análisis morfométrico no se consideró relevante ya que en ese el tejido de reparación se compone, básicamente, de los fibroblastos. De cada sección, se fotografiaron tres campos de gran aumento (400X) en los bordes laterales y el lecho de la herida; para cada punto de control, células inflamatorias (heterófilos, macrófagos, linfocitos y fibroblastos) fueron anotados por dos observadores (Fig. 11). La presencia de colonias bacterianas en la corteza fue registrada. El análisis morfométrico se realizó con el software "Image Pro Plus 4.0" (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EEUU).

**Experimento 2.** Para el análisis morfométrico de la cicatrización de heridas tratadas con insulina tópica se emplearon tres cortes histológicos no seriados, (H&E) de cada una de las biopsias (cuatro tratadas y cuatro control) a los 2, 7, 14, 21 y 28 días post-inducción de la herida. Los mismos procedimientos descritos anteriormente en el experimento 1 fueron aplicados en estos grupos.

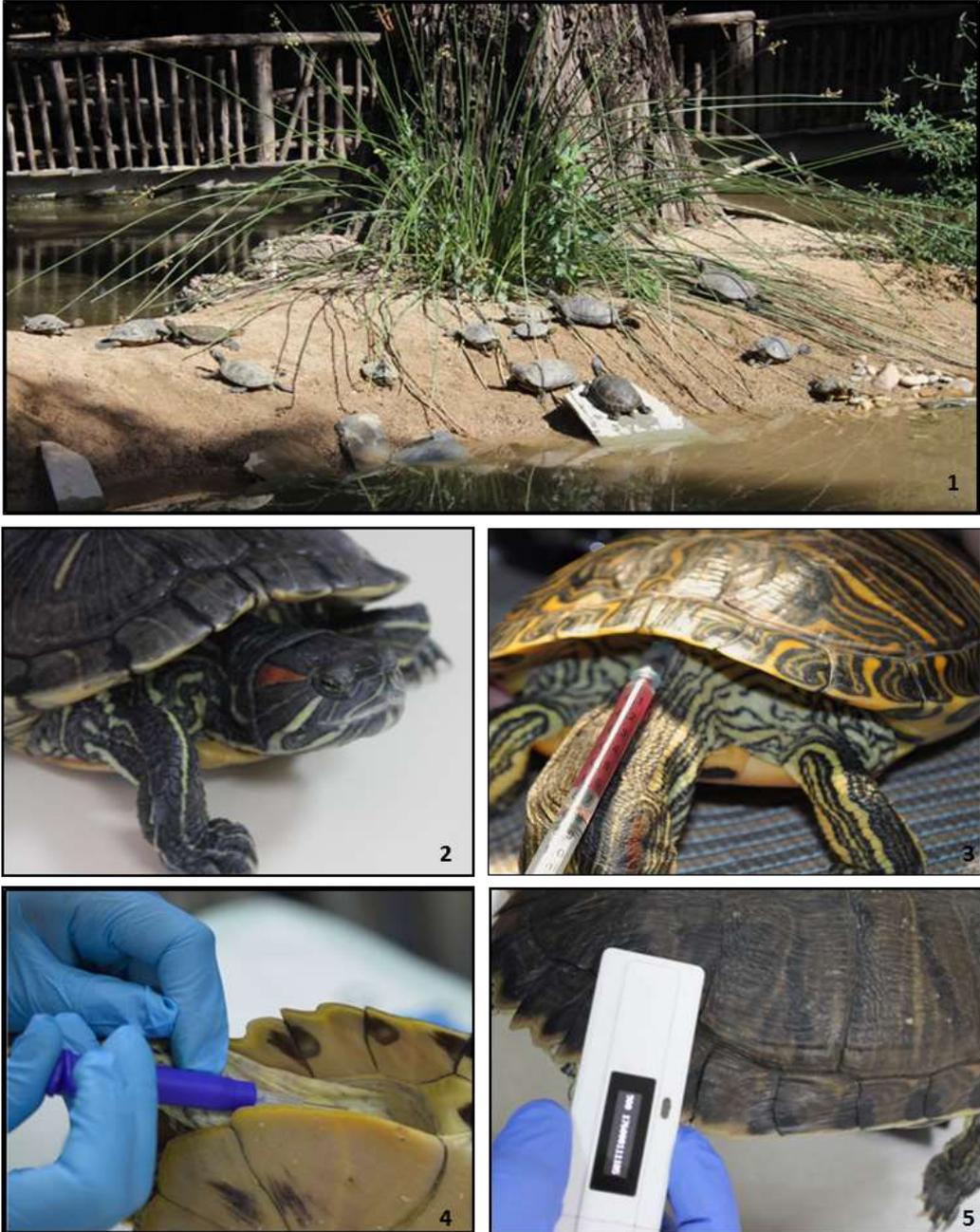
#### 4.8. Análisis estadístico

La normalidad de la distribución de las variables en todas las columnas de datos se analizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Como la medida de los recuentos de células no se distribuyeron normalmente se utilizó para su comparación el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de una prueba de Dunn para comparaciones múltiples del número de heterófilos, macrófagos, linfocitos y fibroblastos en cada tiempo de control enfrentando todos los pares de columnas dentro de un mismo tipo celular. Un valor de  $P < 0,05$  se consideró significativo. Se utilizó la prueba de Grubbs para detectar valores atípicos (*outliers*) significativos. El tamaño de la muestra necesario para detectar como significativas diferencias  $\geq 25\%$

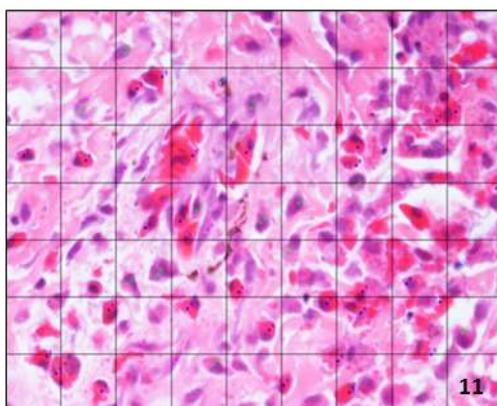
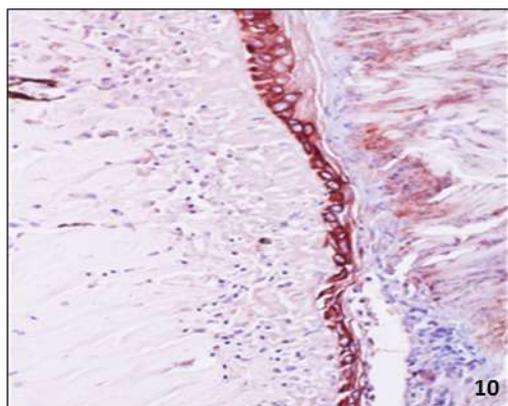
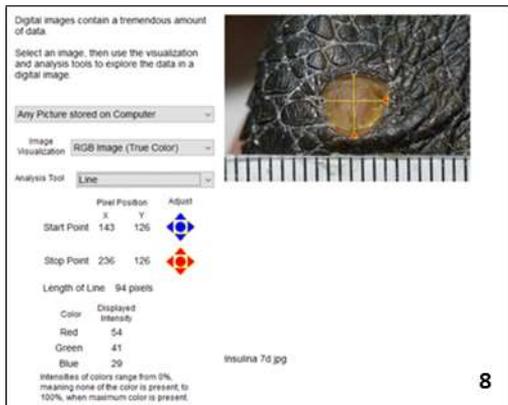
en el porcentaje de reducción de la herida se calculó mediante el software StatMate 2.0; El resto de cálculos estadísticos se realizaron utilizando el software Prism 5.04 para Windows (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EEUU).

#### **4.9. Cuestiones éticas**

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices europeas para el uso y cuidado de los animales de laboratorio y fueron aprobadas por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Córdoba, España, documento en anexo (referencia 2168 /2013.03.21).

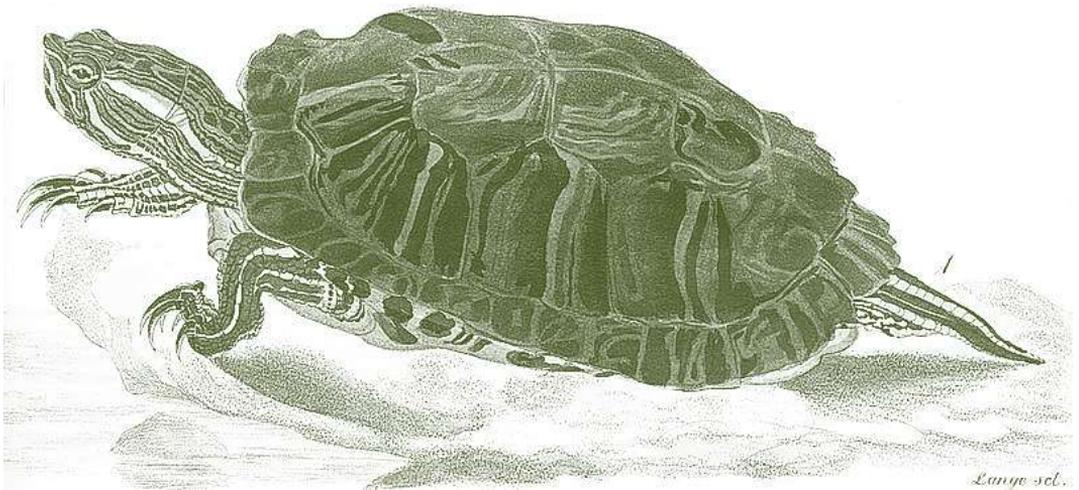


**Figura 1.** Vista general del recinto de las tortugas en el Zoológico de Córdoba. **Figura 2.** *Trachemys scripta elegans*, la presencia de una mancha roja a cada lado de la cabeza es una de las características de esta subespecie. **Figura 3.** Para el análisis hematológico se utilizó la sangre del seno subcaparacial. **Figura 4.** Implantación del microchip en la cavidad celomica posterior derecha. **Figura 5.** Identificación de las tortugas con el lector del microchip.



**Figura 6.** Biopsia inicial realizada en el miembro posterior con bisturí circular de 6 mm de diámetro. **Figura 7.** Fotografía con regla de la biopsia en el tiempo T0 para medir su perímetro. **Figura 8.** Imagen de la pantalla del programa “Analysing digital imaging” utilizado para verificar el perímetro y el área de las heridas. **Figura 9.** En cada tiempo si fotografiaron los bordes y el lecho de cada herida para el estudio histológico. **Figura 10.** Inmunorreacción positiva frente el anticuerpo AE1/AE3 en los queratinocitos utilizando el método ABC. **Figura 11.** Fotomicrografía con aplicación del programa “Image Pro Plus 4.0” utilizado para el estudio morfométrico.

# Resultados



*"Creo que al darnos la inteligencia, Dios tenía como intención darnos la oportunidad de investigar la belleza de su Creación. Él no se ve amenazado por nuestras aventuras científicas".*

*Francis Collins, genetista director del "Proyecto genoma humano" (1950)*



## 5. Resultados

### 5.1. Estudio de la cicatrización por segunda intención.

#### 5.1.1. Evaluación clínica

El comportamiento y la condición física general de los animales no se vieron afectados por las heridas inducidas ni por el procedimiento del diseño experimental. La utilización del bisturí circular para la creación de las heridas cutáneas es un método rápido y seguro, que produce una exposición superficial del tejido subcutáneo y del musculo esquelético. Este método fue seleccionado para describir la curación por segunda intención en la piel de tortugas porque el modelo es mínimamente invasivo, técnicamente sencillo, reproducible, fácil de seguir con el tiempo y se ha utilizado anteriormente en diversas especies, incluyendo reptiles (Smith y Barker, 1988; French y cols., 2006; Hom y cols., 2007). Clínicamente, la variable principal evaluada fue la tasa de contracción de la herida porque se trata de una variable numérica adecuada para evaluar la eficacia del tratamiento y que cambia más rápidamente durante las primeras semanas de cicatrización; esto permite apreciar las diferencias más rápidamente y diseñar ensayos terapéuticos más cortos (Fig. 12).

Inmediatamente después de la realización de la herida, la zona estaba cubierta con líquido seroso o seroso-hemorrágico; las hemorragias eran raras y fácilmente controladas con presión digital. Después de 7 días las costras eran finas y translúcidas y no rellenaban el defecto de la piel de manera que los bordes de la herida aparecían elevados. Una vez que el lecho de la herida ya estaba cubierto por el material que formaba la costra, ésta se caracterizó por estar deprimida en el centro y por tener poca consistencia de forma que con frecuencia se formaban anchas fisuras transversales. Las costras eran blanquecinas especialmente en sus centros, pero también presentaban zonas rojizas que correspondían a restos hemorrágicos, especialmente cerca de los bordes de la herida. En algunas heridas, las costras presentaban un aspecto húmedo con una superficie friable y muy irregular. En varias heridas las costras tenían un aspecto más seco y una superficie más lisa, oscura y de color rojizo debido a la hemorragia posterior a la biopsia (Fig. 12).

Después de 14 días, todas las heridas estaban cubiertas por costras completas con aspecto variable. Algunas de las costras eran de color amarillo oscuro, seco, con una superficie regular y bien adheridas a los bordes de la herida, pero en la mayoría de las heridas, las costras eran de color blanquecino, húmedo, con una textura friable edematosa. La superficie era irregular y tenía una fisura central. En general, las costras eran más gruesas que 7 días antes y de mayor espesor de modo que rellenaban progresivamente el lecho de la herida, reduciendo la profundidad de la herida (Fig. 12).

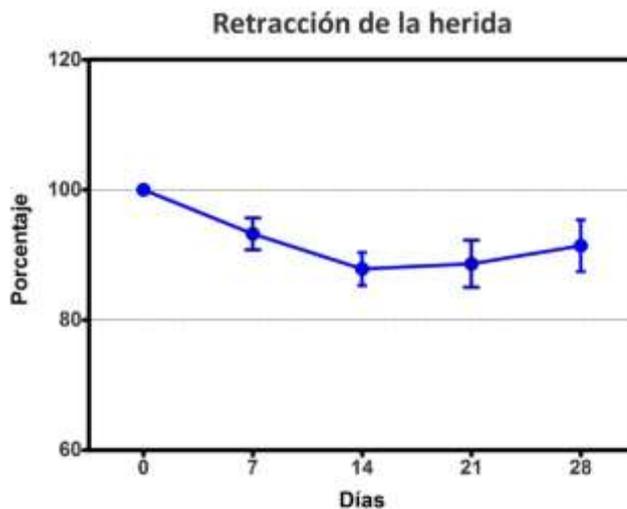
La cicatrización de las heridas, después de 21 días, avanzaba lentamente y sin cambios significativos en comparación con la semana anterior. Todas las heridas permanecieron cubiertas por costras que eran más gruesas y de color más claro. La adherencia y la consistencia de las costras seguían siendo similares, pero tenían una superficie más irregular y todavía se veían friables, con restos de la costra desprendidos en superficie y con amplias fisuras que exponían el lecho de la herida. La mayoría de las costras se volvió de color amarillo claro (Fig. 12).

A los 28 días, todas las costras mostraban características más homogéneas que en los controles anteriores. En general, la superficie de la costra era ahora más irregular, con un aspecto húmedo, casi mucoso y el color predominante en casi todas las heridas era el amarillo claro. La mayoría de las costras estaban ahora alineadas con los bordes de la herida y se veían menos firmes y gruesas (Figs. 12 y 13).

La contracción de la herida fue lenta y muy heterogénea entre los animales; mientras que algunas heridas tenían un tamaño equivalente al 68,76% del valor basal después de una semana, en el tamaño que otros habían aumentado a 116,4% en comparación con la herida inicial. Después de 28 días el tamaño medio de las heridas fue sólo ligeramente inferior a la inicial con un tamaño medio respecto al perímetro inicial del 91,41% (Tabla 2). Este valor representa una reducción media de la herida después de 28 días de solo 8,59% (Grafica 3). A pesar de esta contracción lenta de las heridas, la cicatrización de las heridas progresaba de manera uniforme en todos los animales. El tiempo necesario para que las costras se desprendieran de forma espontánea fue variable pero en todos los animales fue superior a seis semanas. Una vez desprendida de la costra y cicatrizada la herida, la piel aparecía despigmentada, ligeramente deprimida y sin haber desarrollado por completo las reticulaciones o escudos típicos de la piel blanda en las tortugas.

Tabla 2. Estadística descriptiva de tamaño de las heridas, expresada como porcentaje de la circunferencia inicial de la herida. El tamaño de la herida se registró semanalmente durante 4 semanas.

	T1	T2	T3	T4
Número de muestras	24	24	24	24
Media	93,24	87,84	88,64	91,41
Desviación típica	11,98	12,45	17,75	19,42
Error estándar	2,445	2,542	3,623	3,964
Mínimo	68,76	59,96	56,05	52,56
Límite inferior	84,09	78,66	74,43	74,37
Mediana	96,44	87,79	88,27	99,98
Límite superior	101	98,01	102,1	104,4
Máximo	116,4	113,2	124,6	132,1
Cuartil inferior	88,18	82,58	81,15	83,21
Cuartil superior	98,3	93,1	96,13	99,61



Gráfica 3: Evolución clínica de la contracción de la herida en la cicatrización por segunda intención.

## 5.1.2. Resultados microscópicos

### 5.1.2.1. Características de la piel normal en la zona biopsiada

Las 48 biopsias iniciales de los Grupos 1 y 2 se evaluaron histológicamente para conocer la estructura precisa en esa región y usarlas como controles internos. La piel de la zona dorsal de las extremidades posteriores se caracteriza por tener una epidermis regular, moderadamente gruesa y descansa en una fina dermis (Fig. 14). La

unión dermo-epidérmica era lisa y la ZMB corría paralela a la superficie de la piel (Figs. 14-17). La epidermis consistía en alrededor de 12-25 capas de queratinocitos diferenciadas en tres estratos: el estrato germinativo (una capa), estrato espinoso o suprabasal (4-10 capas) y el estrato córneo (8-16 capas) (Figs. 16 y 17). La dermis, muy pobre en células, estaba compuesta principalmente por gruesas bandas de colágeno dispuestas regularmente en paralelo a la superficie de la epidermis y embebidas en escasa sustancia fundamental. Los fibroblastos eran escasos y dispersos en las bandas de colágeno (Figs. 14-16). Cuando estaban presentes, las células mononucleares linfoides eran escasas y no se observaron histiocitos. Los melanocitos se presentaban en número variable de acuerdo con el patrón de pigmentación de cada tortuga y pero siempre localizados en la dermis exterior, alrededor de los vasos dérmicos así como dentro de la capa basal de la epidermis (Figs. 15-17). La unión dermo-epidérmica se definió por una ZMB poco visible cuando las muestras se tiñeron con H&E; sin embargo, era visible como una banda homogénea o acidófila fibrilar débil usando PAS, y de color marrón-negruzco usando tinción de plata metenamina (Fig. 17). Una delicada, y a menudo poco visible, red de capilares y pequeñas arteriolas aparecía dispuesta en la dermis superficial y profunda, paralela a la epidermis. La red linfática también presentaba un aspecto similar a modo de una delicada red de vasos con paredes delgadas y lúmenes anchos e irregulares. Los linfáticos se localizaban cerca de la red de vasos sanguíneos; el tejido subcutáneo era delgado y compuesto por un escaso número de fibrocitos y fibras de colágeno (Fig. 14).

### **5.1.2.2. Características histológicas de la cicatrización**

A los dos días de inducir las heridas, microscópicamente se observaba la superficie cubierta por una fina capa de exudado compuesto por plasma, fibrina, numerosos heterófilos intactos o degenerados, eritrocitos y algunos restos de células (Figs. 20-22). En los márgenes, los extremos libres de las fibras de colágeno aparecían degenerados e infiltrados por escaso o moderado exudado sero-fibrinoso, heterófilos a menudo desgranulados, y macrófagos ocasionales que definían una delgada banda de reacción entre la dermis más profunda y la superficie (Figs. 20-22). En la dermis y la hipodermis perilesional, los principales cambios morfológicos fueron hiperemia aguda moderada, edema intersticial discreto y prominentes manguitos perivasculares de heterófilos y escaso o moderado número de linfocitos pequeños (Fig. 23). Los queratinocitos basales situados más próximos a los bordes de la herida mostraron cambios proliferativos discretos pero la reepitelización no se apreciaba morfológicamente en este momento del proceso de cicatrización; la ZMB aparecía sin cambios en el borde de la herida (Figs. 20 y 21).

A los 7 días, las heridas presentaban la superficie completamente cubierta por una costra serosa-celular compuesta por un exudado acidófilo denso formado por plasma, fibrina y numerosos heterófilos degenerados o intactos, así como eritrocitos y restos celulares (Fig. 24); asimismo, se observaron los fragmentos degenerados de fibras de colágeno engullidos en las caras laterales de las costras. Un número variable de colonias de bacterias de morfología cocoide (Gram +) estaban presentes en la superficie de las costras sin afectar a los tejidos. Gran parte de los márgenes laterales de las heridas estaban ahora cubiertos por una delgada epidermis neo-formada, con una característica forma de cuña (Fig. 24) y donde se distinguen los queratinocitos basales y suprabasales (2 a 10 capas de espesor); con el anticuerpo AE1/AE3 los nuevos queratinocitos reaccionan intensamente, lo que permitió reconocer y valorar mejor el grado de reepitelización de las heridas bajo las costras (Fig. 25). En este tiempo de control, el lecho permanecía sin reepitelización cubierto por abundante exudado inflamatorio compuesto por plasma, numerosos heterófilos, algunos macrófagos y escasos fibroblastos o angioblastos (Fig. 26). En los laterales reepitelizados, la ZMB aparecía mal definida, a modo de banda fina e intermitente con restos de exudado y heterófilos y se había desprendido de la dermis subyacente en dos de las tres heridas. Curiosamente, observamos a menudo heterófilos situados justo debajo de los queratinocitos basales de la nueva epidermis donde la ZMB se estaba formando y estrechamente relacionados con fibroblastos activos (Fig. 27). Las zonas más profundas de la dermis presentaba un infiltrado con plasma abundante, heterófilos, macrófagos y algunos linfocitos pequeños.

A los 14 días de inducir la herida, la superficie de la herida seguía cubierta por una costra similar a la descrita a los 7 días. La reepitelización era completa en dos heridas pero en una biopsia la zona del lecho de la herida permanecía sin cubrir. La nueva epidermis era más gruesa (8-12 capas) que a los 7 días y el estrato basal y espinoso estaban bien diferenciados (Fig. 28), aunque el estrato córneo era poco visible especialmente en el lecho de la herida (Fig. 29). En este tiempo de control, la ZMB era más regular en los bordes superiores respecto del lecho de la herida, y en dos animales la epidermis se desprendió de la dermis en zonas profundas (Figs. 28 y 29); al igual que a los días 7, numerosos heterófilos aparecían estrechamente relacionados con los queratinocitos basales de la nueva epidermis en la ZMB. El exudado inflamatorio y serofibrinoso persistía y el tejido de granulación era escaso con pocos macrófagos y fibroblastos; se observaron algunos angioblastos y yemas vasculares sobre todo en el lecho de la herida. El infiltrado de linfocitos era más abundante en la dermis perilesional alrededor de pequeñas arteriolas que en la zona de lesión.

A los 21 días, la superficie de la herida estaba cubierta por una costra con abundantes restos celulares. La reepitelización se había completado y la nueva epidermis aparecía normal o con variable grado de hiperplasia en las heridas de las diferentes tortugas. El tejido de granulación era más abundante con escasas fibras de colágeno y abundante matriz extracelular (Fig. 30) y el exudado inflamatorio ha disminuido en la mayoría de lesiones; la unión dermo-epidérmica estaba más diferenciada en los bordes superiores, aunque la membrana basal no es completamente idéntica a la de piel normal (Fig. 31); se observaron desprendimientos especialmente en zonas más internas y en el lecho (Fig. 30). En este tiempo de control de la cicatrización se observó proliferación de algunos melanocitos en los márgenes laterales de las heridas.

A los 28 días, la superficie de las heridas estaba aún cubierta por costras densas compuestas principalmente de restos celulares. Ocasionalmente se observaron algunas colonias bacterianas cocáceas (Gram +) restringidas a la zona de la costra. En este momento de la cicatrización, la nueva epidermis (con más de 15 capas de grosor) mostraba los 3 estratos definidos (Figs. 32 y 34) y en alguna herida se observó hiperplasia focal discreta a moderada. El tejido de granulación era predominante en la herida con numerosos fibroblastos activos, angioblastos (Figs. 33 y 34), y menor número de macrófagos y heterófilos aunque en una de las heridas se mantenía con características similares al día 21 de cicatrización y el exudado inflamatorio era todavía abundante (Figs. 36 y 37). La cantidad de fibras de colágeno era variable se disponía con frecuencia de forma desorganizada; no obstante, en los bordes laterales y algunas zonas del lecho, los haces de fibras de colágeno tendían a estar dispuestas en paralelo a la epidermis (Fig. 33). La repigmentación todavía era escasa y progresaba desde los bordes laterales hacia el centro.

A los 42 días, ya no se observaba la costra sobre la epidermis regenerada que tenía una estructura morfológica igual a la de la epidermis normal (Fig. 38). Bajo la epidermis, el tejido de granulación era mucho más maduro con abundantes fibroblastos y fibras de colágeno y yemas. La remodelación del nuevo tejido conectivo estaba más avanzada y progresaba desde los bordes laterales hasta el lecho de la herida (Fig. 38). No obstante, en este tiempo de cicatrización (seis semanas de la inducción de la herida) todavía estaban presentes zonas con tejido de granulación con fibroblastos activos, yemas vasculares e infiltrado de macrófagos y linfocitos en el lecho de la herida (Fig. 39), lo que demostraba que no se había logrado la curación total. La repigmentación estaba más avanzada también, tanto en la epidermis como en la dermis.

A los 60 días de inducir la herida, la epidermis era morfológicamente normal o moderadamente hiperplásica. La dermis se había restituido completamente por el nuevo tejido conectivo, en su mayor parte ya remodelado (Fig. 40). El número de fibroblastos disminuyó en relación con el control anterior y las fibras de colágeno se disponían con frecuencia paralelas a la epidermis. Sin embargo, el tejido regenerado todavía no es tan denso como en la dermis normal adyacente. Focalmente todavía se encontraron células mononucleares y yemas vasculares maduras. La ZMB estaba bien definida y morfológicamente mostró un patrón regular finamente fibrilar similar al de la piel normal (Fig. 41).

A los 135 días, la epidermis presentaba todos sus estratos bien definidos y la ZMB era morfológicamente normal. El cambio principal fue la avanzada remodelación del nuevo tejido conectivo. Los haces de colágeno eran más gruesos que en las etapas anteriores, más similares a los de la piel normal, pero todavía no idénticos, por lo que se podía diferenciar bien la zona de cicatriz (Figs. 42 y 43).

### 5.1.2.3. Resultados inmunohistoquímicos

Del panel de anticuerpos testados en la piel normal y durante la cicatrización, los Acs AE1/AE3, Factor VIII, MAC 387, CD3, NCL-MSA, desmina y lisozima mostraron reactividad cruzada en las tortugas (Tabla 3), al reaccionar con las células y tejidos que pueden expresar los antígenos equivalentes para los que han sido desarrollados de las células humanas y que se utilizan por su reactividad cruzada con los tejidos de diferentes vertebrados como el perro, gato, conejo, ratón y también en aves. Así, AE1/AE3 mostró una reacción citoplasmática, de patrón difuso, intensa a moderada en los queratinocitos basales y suprabasales tanto en la epidermis normal como en la epidermis regenerada; el estrato córneo no mostró reacción (Figs. 18, 25 y 34). El Ac Factor VIII mostró inmunorreacción citoplasmática granular y/o difusa, de intensidad moderada en las células endoteliales y algunas células de morfología fusiforme del tejido de granulación; también se observó reacción moderada a intensa con la membrana citoplasmática de los eritrocitos. Con el Ac MAC 387 se observó inmunoreactividad citoplasmática difusa de moderada a o intensa con numerosos macrófagos del exudado inflamatorio (Fig. 36); algunas células fusiformes (fibroblásticas) y células endoteliales del tejido de granulación también reaccionaron con este anticuerpo. El Ac anti CD3 mostró tinción de membrana plasmática de numerosos linfocitos pequeños, intensa o moderada, en el exudado inflamatorio (Fig. 37). Con el anticuerpo NCL-MSA, se observó inmunorreacción granular citoplasmática moderada o débil en células fusiformes (como angioblastos o fibroblastos), células

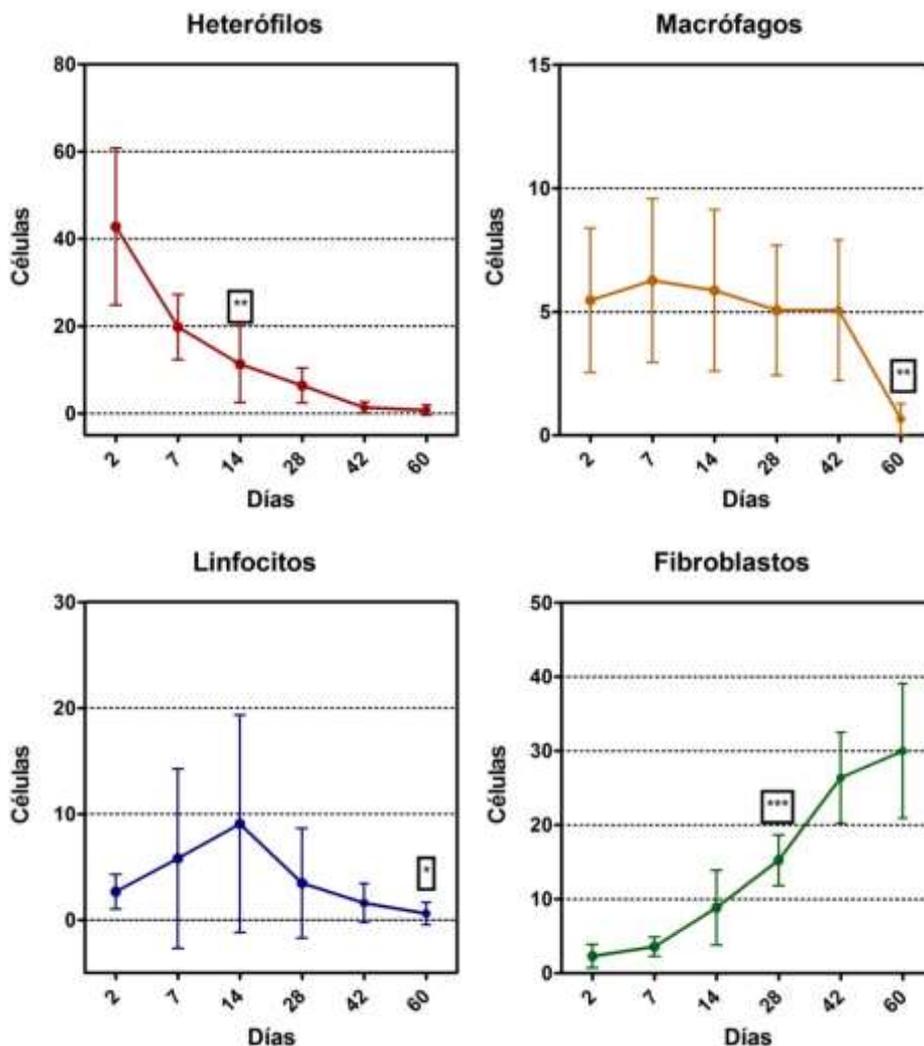
endoteliales y fibras musculares lisas de los vasos (Fig. 19). El Ac anti desmina reaccionó con fibras musculares lisas de los vasos. Finalmente el Ac anti lisozima reaccionó con células del exudado inflamatorio de morfología fibroblástica, macrófaga y también con células endoteliales del tejido de granulación.

Tabla 3: Resultados de los estudios inmunohistoquímicos realizados en la piel de tortugas.

Anticuerpo	Observaciones	Resultados
<b>Citoqueratinas (AE1/AE3)</b>	Reacción citoplasmática media a intensa en extracto basal e espinoso.	+++
<b>CK 5/6</b>	Inmunoreacción negativa	-
<b>Anti-human cytokeratin (MNF 116)</b>	Inmunoreacción negativa	-
<b>CD3</b>	Reacción en linfocitos, fibroblastos y células endoteliales en el tejido de granulación	++
<b>CD 14</b>	Inmunoreacción negativa	-
<b>CD 21</b>	Inmunoreacción negativa	-
<b>CD 31</b>	Escasa reacción en células fusiformes en tejido de granulación.	-
<b>CD 68</b>	Reacción débil Reacción en plasma y restos necróticos	-
<b>Desmina</b>	Inmunoreacción moderada en fibra muscular lisa	++
<b>NCL-MSA</b>	Inmunoreacción, preferentemente, granular citoplasmática de fibroblastos y angioblastos	+++
<b>Vimentina</b>	Inmunoreacción negativa Tinción inespecífica de costra	-
<b>Factor VIII</b>	Inmunoreacción intensa granular y difusa citoplasmática Células endoteliales (++) Células fusiformes (++) Glóbulos rojos /reacción de membrana (++)	+++
<b>Lisozima</b>	Reacción citoplasmática en células de morfología fibroblástica (+) Reacción con patrón granular en endotelio vascular (++)	+++
<b>Myeloid/ Histiocyte Antigen</b>	Inmunoreacción intensa difusa citoplasmática Células endoteliales (++) Células fibroblásticas (+) Macrófagos (++)	+++
<b><math>\alpha</math>-1 antitripsina</b>	Reacción débil en células macrófagas.	-

#### 5.1.2.4. Análisis morfométrico

La evolución de las subpoblaciones de células inflamatorias desde los días 2 a 60 no siguió una trayectoria similar en todos los tipos celulares (Grafica 4). El número de heterófilos alcanzó su valor medio más alto en el control del día 2,  $42,8 \pm 17,99$  células/HMF (media  $\pm$  SD), para más tarde disminuir de manera constante a lo largo de los siguientes controles. La reducción fue estadísticamente significativa ( $P < 0,01$ ) en el día 14 ( $11,27 \pm 8,81$  células/HMF). Existió gran variabilidad entre los diferentes animales, como indica la alta desviación estándar de la distribución. En contraste con la curva de heterófilos, el número medio de linfocitos fue menor en el día 2 y alcanzó su punto máximo en el día 14 ( $9,06 \pm 10,27$ ). La dispersión de los datos también fue muy alta y comparando los valores medios para cada control, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los controles de 2 y 60 días ( $P < 0,05$ ). Los recuentos de macrófagos fueron muy estables desde el día 2 ( $5,47 \pm 2,92$  células/HMF) hasta el día 42 ( $5,06 \pm 2,84$  células/HMF), y esta baja variabilidad se aprecia gráficamente por dibujar sus recuentos medios una curva plana a lo largo del estudio. Al igual que en el recuento de linfocitos, las diferencias, respecto al día 2, fueron estadísticamente significativas el día 60 ( $P < 0,001$ ). Por último, el número de fibroblastos aumentó lentamente desde el día 2 ( $2,33 \pm 1,58$  células/HMF) hasta el día 60 ( $30,0 \pm 9,08$  células/HMF), y las diferencias fueron estadísticamente significativas en el día 28 ( $P < 0,001$ ).



Grafica 4: La media de los recuentos de células inflamatorias en cada punto de tiempo de 2 a 60 días después de la creación de la herida. Las barras verticales representan la desviación estándar. Diferencias estadísticamente significativas a partir del día 2: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  (prueba de Kruskal-Wallis con la prueba de comparación múltiple de Dunn).

## 5.2. Estudio de la aplicación tópica de insulina porcina.

### 5.2.1. Evaluación clínica

El comportamiento y la condición física general de los animales no se vieron afectados por las heridas o cualquier otro procedimiento del diseño experimental. No hubo diferencias significativas ( $P=0,715$ ) que indicaran un aumento de peso antes y después del estudio tanto en el grupo de estudio clínico (Tabla 4) como en el grupo para estudio histológico (Tabla 5).

Tabla 4: Comparativo entre los pesos iniciales y finales, en gramos, de las tortugas del grupo de estudio clínico.

	Microchip	Peso inicial	Peso Final	Diferencia
1	11170	1773	1798	25
2	11176	1336	1338	2
3	11197	1188	1179	-9
4	86556	1355	1378	23
5	11155	1215	1238	18
6	11195	686	710	24
7	11192	915	923	8
8	86557	925	932	8
9	86558	1108	1120	12
10	86559	1174	1168	-6
11	86560	1207	1229	22
12	11190	993	1002	9
13	11173	1140	1168	28
14	11175	893	915	22
15	11177	886	913	27
16	11191	457	460	3
17	11189	388	379	-9
18	11186	1409	1413	4
19	11188	1296	1322	26
20	11171	1215	1240	25
21	11178	1007	1018	11
22	11179	586	581	-5
23	11198	646	640	-6
24	11196	458	475	17
Media (desviación típica)				11,8 (12,75)

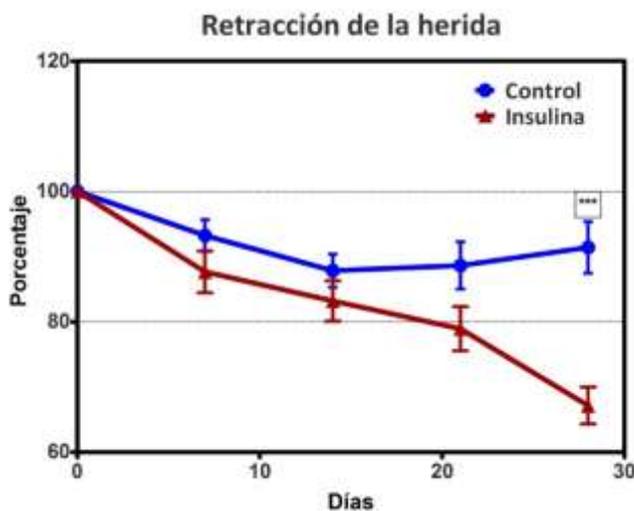
Tabla 5: Comparativo entre los pesos iniciales y finales, en gramos, de las tortugas del grupo de estudio histológico.

	Microchip	Peso inicial	Peso final	Diferencia
1	86570	1125	1144	19
2	86571	1287	1312	25
3	86572	958	974	16
4	86573	749	772	23
5	86574	823	841	18
6	86575	469	485	16
7	86576	698	692	-6
8	86577	1058	1075	17
9	86578	583	592	9
10	86579	625	621	-4
11	86580	1825	1836	11
12	86581	1518	1539	21
13	86582	1565	1558	-7
14	86583	2012	2023	11
15	86584	1769	1781	12
16	86585	1596	1614	18
17	86586	1308	1303	-5
18	86587	1582	1597	15
19	86588	1647	1653	6
20	86589	1602	1611	9
Media (desviación típica)				11,2 (9,82)

El procedimiento de biopsia produjo heridas circulares bien delimitadas exponiendo el tejido subcutáneo y el músculo esquelético superficial. Inmediatamente después de realizar la herida, la zona estaba cubierta gradualmente con líquido seroso o sero-hemorrágico, pero fueron poco frecuentes las hemorragias. La aplicación de insulina diluida en glicerol se caracterizó por la formación de una película lisa, resistente al agua, unida a los bordes de la herida (Fig. 44).

En el grupo de tratamiento, las heridas se cubrieron rápidamente por una costra que persistió a lo largo de los 28 días de observación; además las características macroscópicas de estas costras eran claramente diferentes al grupo control. En las heridas de control, las costras se caracterizaban por un color más claro y una superficie más irregular; aunque las costras cubrían toda el área de la herida, la mayoría de ellas tenían fisuras que dejaban expuesto el lecho de la herida. Además, las costras de las heridas de control se hizo cada vez más húmeda y en el día 28 presentan una textura mucoide. Por el contrario, las heridas tratadas con insulina se caracterizaron por un color más oscuro, una superficie más regular, y una mayor consistencia que se hacía evidente por la ausencia de fisuras o grietas en el espesor de la costra, que eran comunes en las heridas de control. En el día 28 las costras no habían desarrollado la textura mucosa observada en las heridas de control.

La retracción media de la herida, estimada por el porcentaje de reducción del perímetro de la herida inicial, fue mayor en las heridas tratadas con insulina en todos los puntos de control (Gráfica 5). En los días 7 y 14, la retracción de la herida fue similar en ambos grupos y también parecía avanzar con un ritmo similar, pero después de esta fase inicial, las heridas de control revirtieron esta tendencia en el día 21 y su tamaño aumentó ligeramente mientras que en el grupo de heridas tratadas con insulina se produjo el fenómeno contrario y la retracción progresó más rápidamente, con una pendiente descendente más pronunciada, de manera que al día 28, cuando el tamaño medio de la herida en el grupo control y en grupo de heridas tratadas con insulina eran 91,41% y 67,15%, respectivamente. En este momento, la retracción de las heridas tratadas fue significativamente mayor ( $P < 0,0001$ ) (Tabla 6).



Gráfica 5: Evolución de la retracción de la herida durante los primeros 28 días después de la lesión inicial en los grupos tratados con insulina y el control. Cada punto representa el tamaño medio de la herida y se expresa como un porcentaje de la circunferencia inicial de la herida. Las barras verticales representan el error estándar de la media. Diferencias estadísticamente significativas \*\*\*  $P < 0,001$  (prueba t no pareada).

Tabla 6. Estadística descriptiva de tamaño de las heridas tratadas con insulina tópica y control, expresadas como porcentaje de la circunferencia inicial de la herida. El tamaño de la herida se registró semanalmente durante 4 semanas.

	7 días (T1)		14 días (T2)		21 días (T3)		28 días (T4)	
	Control	Insulina	Control	Insulina	Control	Insulina	Control	Insulina
Numero de muestras	24	24	24	24	24	24	24	24
Media	93,24	87,66	87,84	83,19	88,64	78,93	91,41	67,15
Desviación típica	11,98	15,76	12,45	15,16	17,75	16,63	19,42	13,89
Error estándar	2,445	3,217	2,542	3,095	3,623	3,395	3,964	2,835
Límite inferior	88,18	81,01	82,58	76,79	81,15	71,90	83,21	61,28
Límite superior	98,30	94,32	93,10	89,59	96,13	85,95	99,61	73,01
Mínimo	68,76	65,02	59,96	62,42	56,05	57,48	52,56	39,95
Cuartil inferior	84,09	75,46	78,66	72,32	74,43	67,01	74,37	54,94
Mediana	96,44	84,13	87,79	80,17	88,27	77,12	99,98	65,48
Cuartil superior	101,0	95,64	98,01	89,19	102,1	88,96	104,4	75,60
Máximo	116,4	132,1	113,2	130,5	124,6	119,4	132,1	94,76

### 5.2.2. Resultados microscópicos

Tras las primeras 48 horas, las heridas tratadas con insulina y los controles mostraban una apariencia similar; la superficie estaba cubierta por exudado seroso-hemorrágico compuesto por plasma, fibrina, eritrocitos y numerosos heterófilos (Figs. 45 y 46). En los bordes, el extremo libre de las fibras de colágeno estaba infiltrado por exudado sero-fibrinoso y por heterófilos a menudo degranulados en ambos grupos, pero el número de macrófagos era mayor en los bordes de la herida del grupo tratado lo que le daba un aspecto más definido de demarcación de los bordes (Fig. 47). La reacción inflamatoria en la dermis y la hipodermis perilesional fue similar en ambos grupos y consistió en hiperemia moderada, edema y heterófilos perivasculares prominentes con un número escaso de linfocitos.

A los 7 días, las heridas tratadas con insulina y control mostraban la superficie cubierta por una costra serosa-celular compuesta por un exudado acidófilo, denso de plasma y fibrina, y con numerosos heterófilos, eritrocitos y restos celulares. La re-epitelización de los bordes laterales se había producido de forma similar en ambos grupos pero la epidermis y la ZMB estaban mejor diferenciadas en las heridas tratadas (Figs. 49 y 50). La zona del lecho de la herida permanecía cubierta por exudado inflamatorio y sero-fibrinoso. Las heridas tratadas presentaron mayor número de heterófilos, macrófagos y fibroblastos formando un tejido de granulación joven en el grupo tratado respecto a los controles (Figs. 49 y 50).

A los 14 días, había diferencias microscópicas significativas entre las heridas tratadas con insulina y las heridas control (Figs. 51 y 52). Las heridas tratadas mostraban bajo la nueva epidermis un abundante tejido de granulación más celular y maduro. Con frecuencia, los fibroblastos activos aparecían dispuestos en paralelo a la superficie en la ZMB y estaban bien organizados en comparación con los controles correspondientes (Figs. 51 y 52); se observaron desprendimientos de la nueva epidermis en los grupos control, pero este fenómeno no se observó en las heridas tratadas. En este tiempo de control, el exudado inflamatorio era abundante tanto en los bordes laterales como en el lecho de la herida y se caracterizó por una cantidad moderada de plasma, reducción en el número de heterófilos, macrófagos y aumento moderado del número de linfocitos que era más prominente en las zonas perivasculares. El grupo control mostró número similar de heterófilos pero los macrófagos y los fibroblastos fueron menos prominentes en el tejido de granulación que en las heridas tratadas (Fig. 53). Por otra parte, morfológicamente el tejido de granulación y la ZMB eran más maduros en las heridas tratadas, a pesar de que la reepitelización era completa en ambos grupos.

Al día 21, todas las heridas estaban todavía cubiertas por una costra acidófila con abundantes restos de células. La nueva epidermis era más gruesa y diferenciada ahora y mostraba todos los estratos con un grado variable de hiperplasia en ambos grupos. No obstante, en el grupo tratado con insulina, la ZMB era más completa y el tejido de granulación más maduro, con mayor número de fibroblastos activos dispuestos en paralelo a la superficie y cantidad variable de fibras de colágeno.

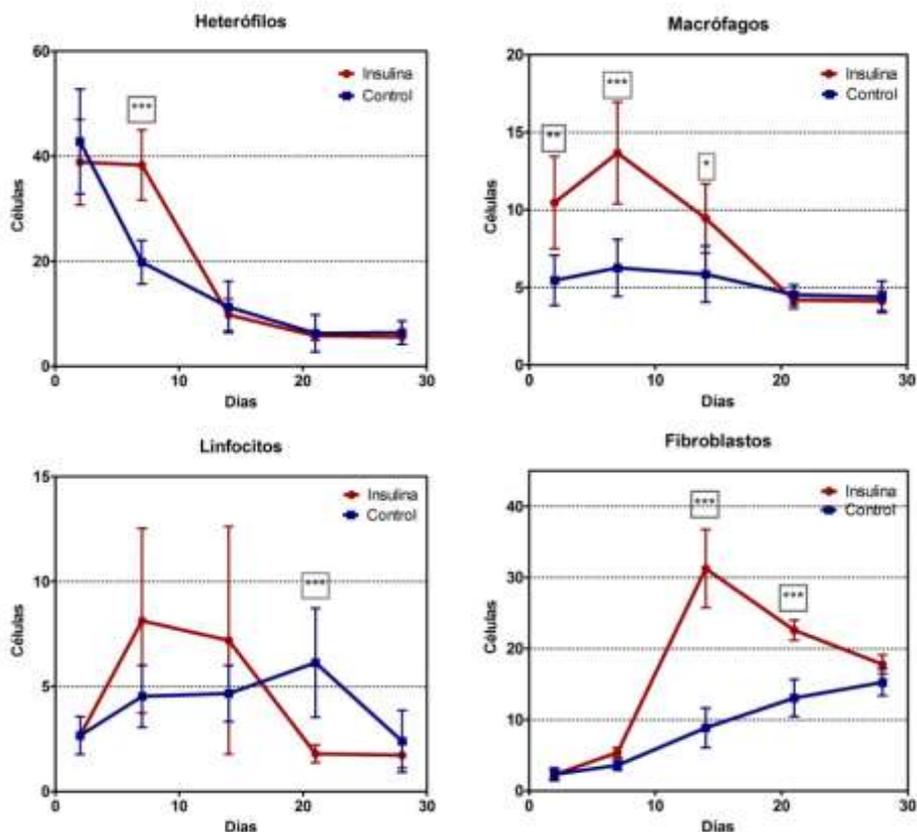
En el día 28, las heridas tratadas con insulina mostraron un tejido de granulación más abundante y remodelado en toda la herida, compuesto por numerosos fibroblastos activos que producían fibras de colágeno, organizadas en un patrón que se asemejaba a la disposición ordenada característica de la dermis normal (Figs. 54 y 55). En las heridas control, el tejido de granulación presentaba una cantidad variable de fibras de colágeno poco remodeladas. En ambos grupos se observó que la cicatrización en los bordes laterales se reparaban antes que el lecho de la herida (Fig. 56). La repigmentación fue moderada o abundante, progresando centripétamente desde los bordes laterales.

### **5.2.3. Análisis morfométrico**

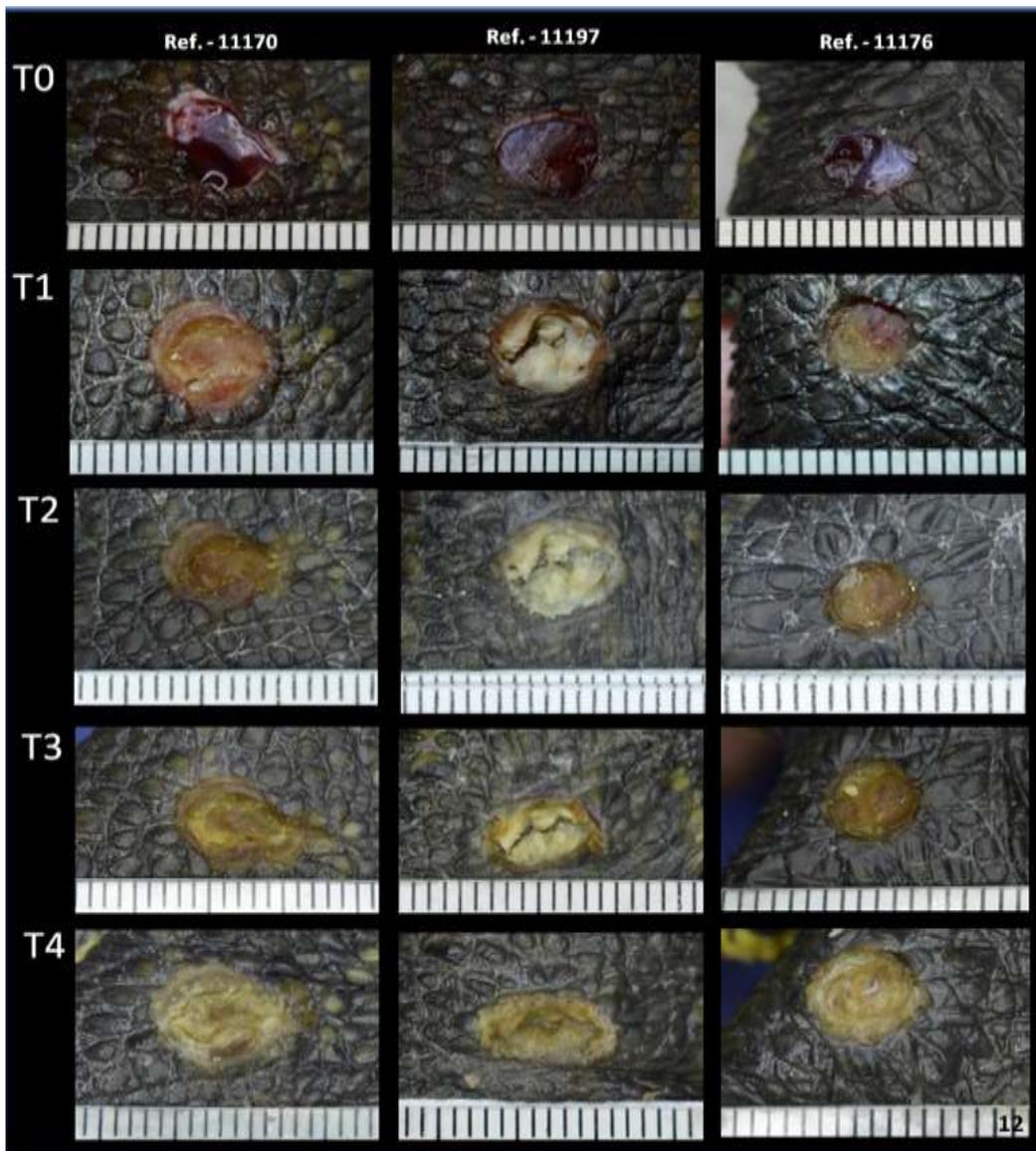
La aplicación tópica de insulina se asoció con diferencias estadísticamente significativas, con recuentos medios estadísticamente superiores de heterófilos,

macrófagos y fibroblastos, mientras que el recuento de linfocitos fue estadísticamente inferior a los 28 días (Grafica 6). En el día 2, el número medio de heterófilos era similar en ambos grupos, pero mientras que el grupo control mostró un rápido descenso durante los siguientes días, en los grupos de insulina el número de heterófilos se mantuvo sin cambios durante la primera semana de curación y las diferencias en la media de cuentas fueron altamente significativo en el día 7 ( $P < 0,0001$ ). Después de esta primera semana, la densidad de heterófilos evolucionó de manera similar en ambos grupos.

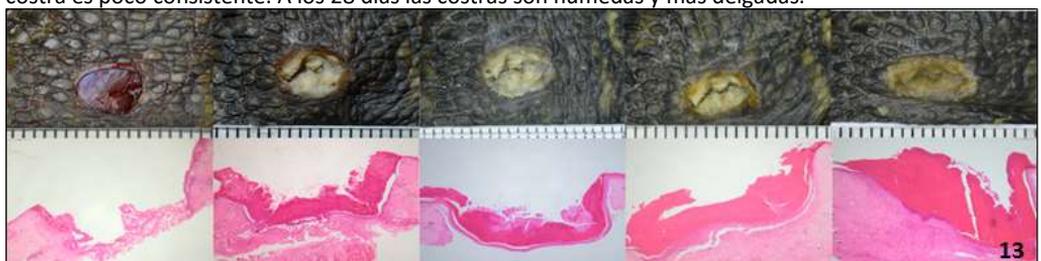
El efecto de la insulina se acentúa especialmente en los recuentos de macrófagos. La aplicación de insulina se asoció con un número significativamente mayor de macrófagos durante las dos primeras semanas de cicatrización de la herida que alcanzan las mayores diferencias en el tiempo de control de 7 días ( $P = 0,0002$ ).



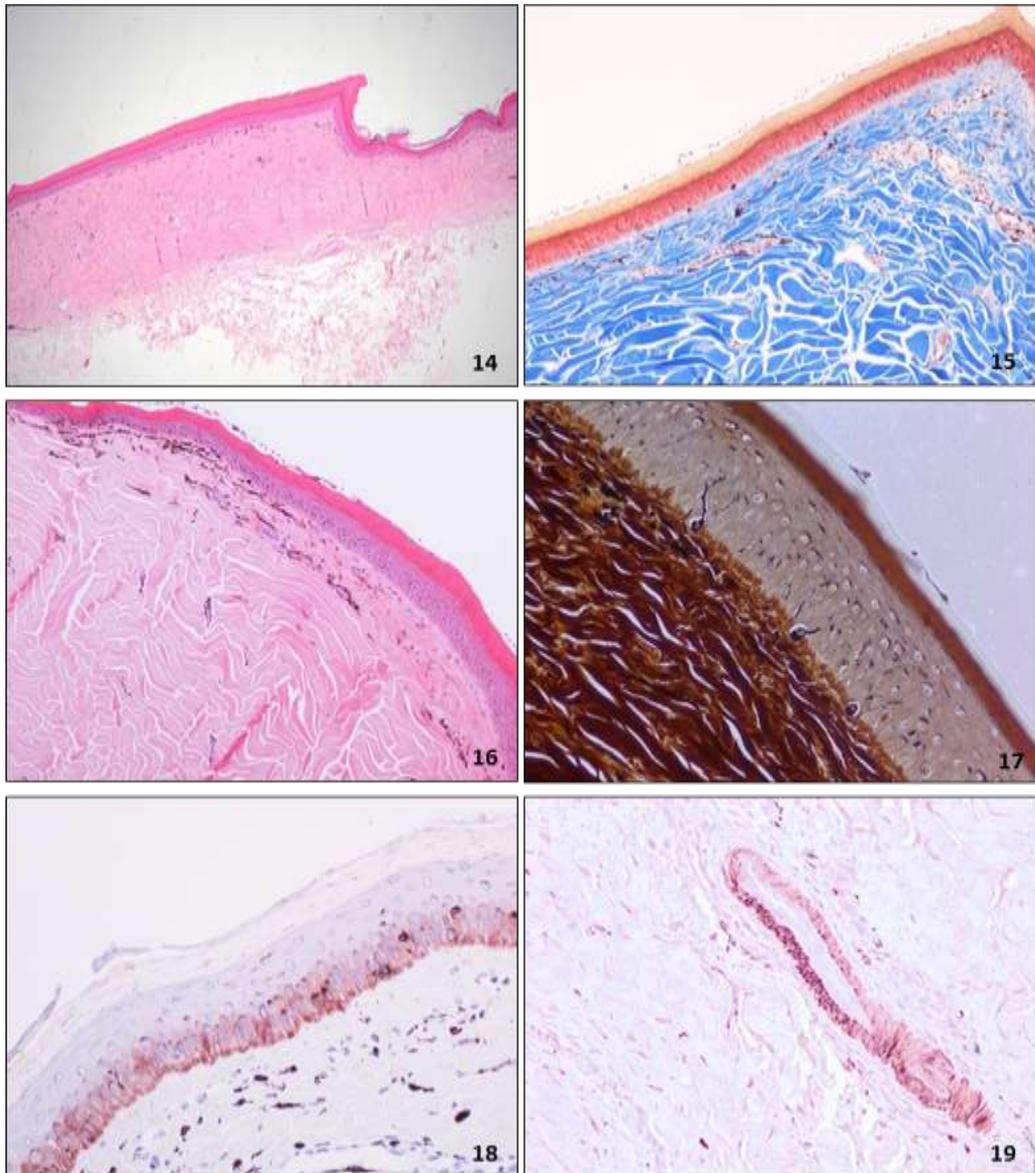
Grafica 6: La media de los recuentos de células inflamatorias en cada punto de tiempo de 2 a 28 días después de la creación de la herida. Las barras verticales representan la desviación estándar. Diferencias estadísticamente significativas a partir del día 2: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  (prueba de Kruskal-Wallis con la prueba de comparación múltiple de Dunn).



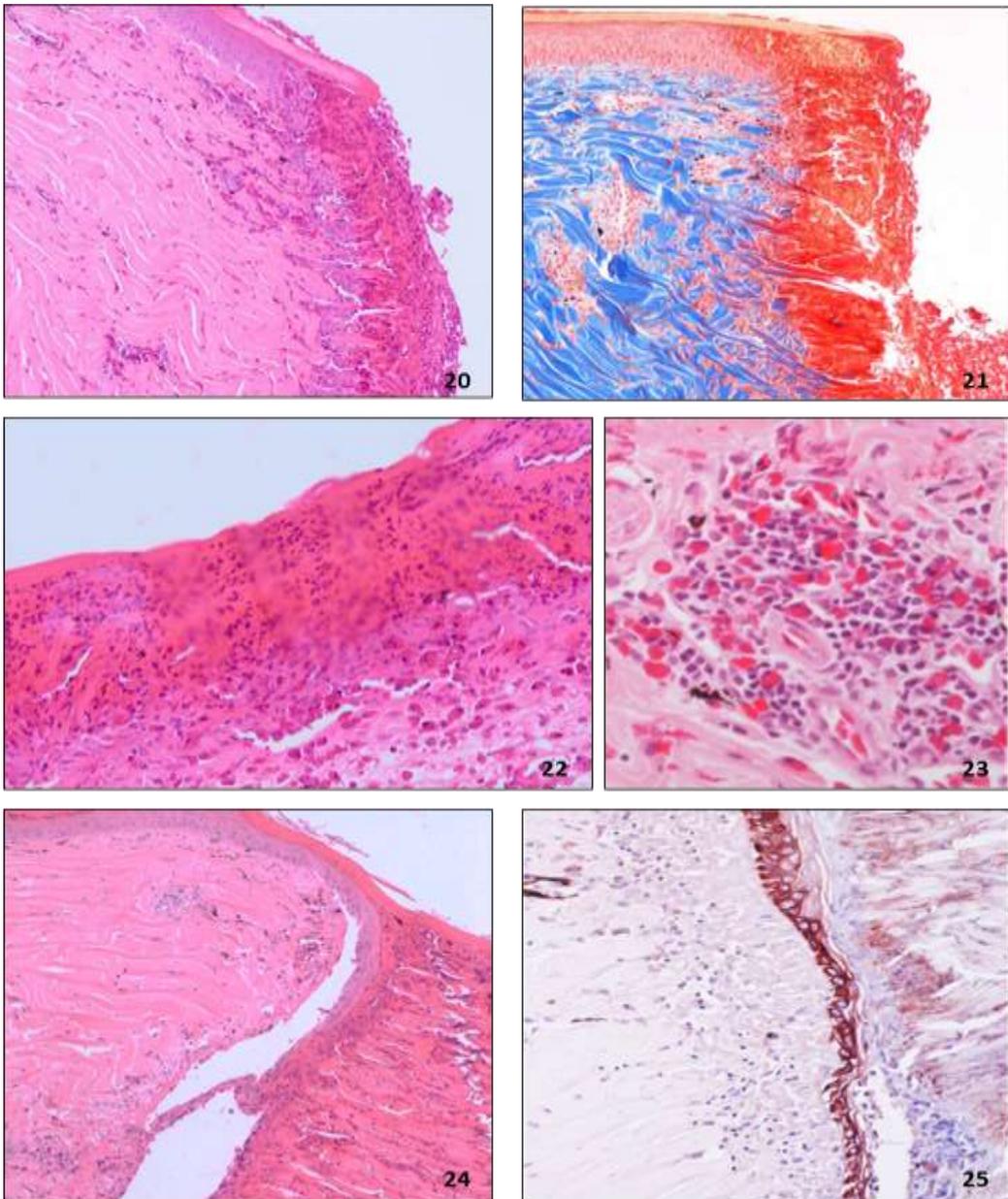
**Figura 12.** Evolución macroscópica de las lesiones hasta los 28 días en 3 animales. La retracción de la herida es limitada, la formación de costra es lenta en todos los animales y en las 2 primeras tortugas la costra es poco consistente. A los 28 días las costras son húmedas y más delgadas.



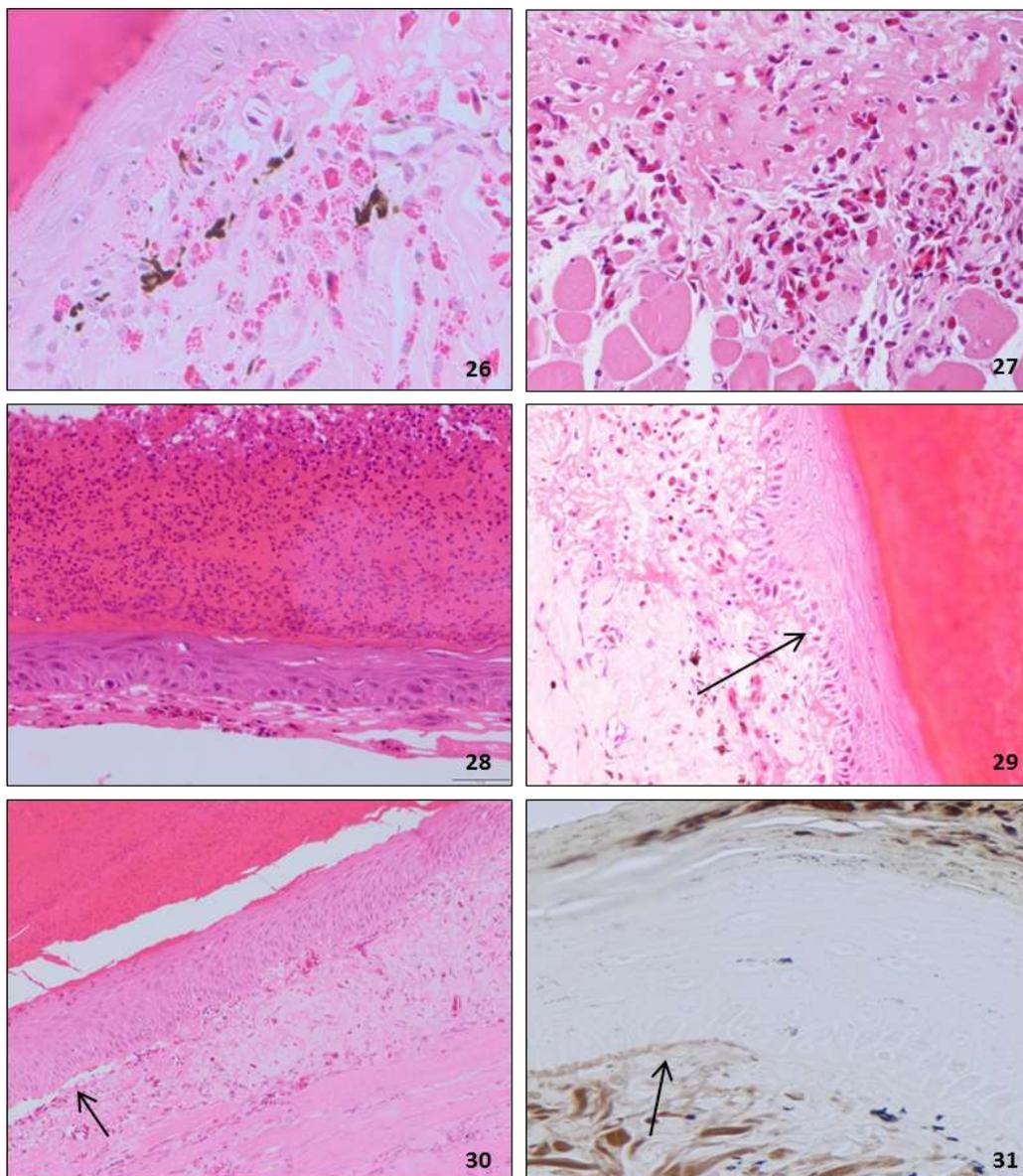
**Figura 13.** Correlación macro y microscópica de la cicatrización en una misma herida a los 0, 7, 14, 21 y 28 días.



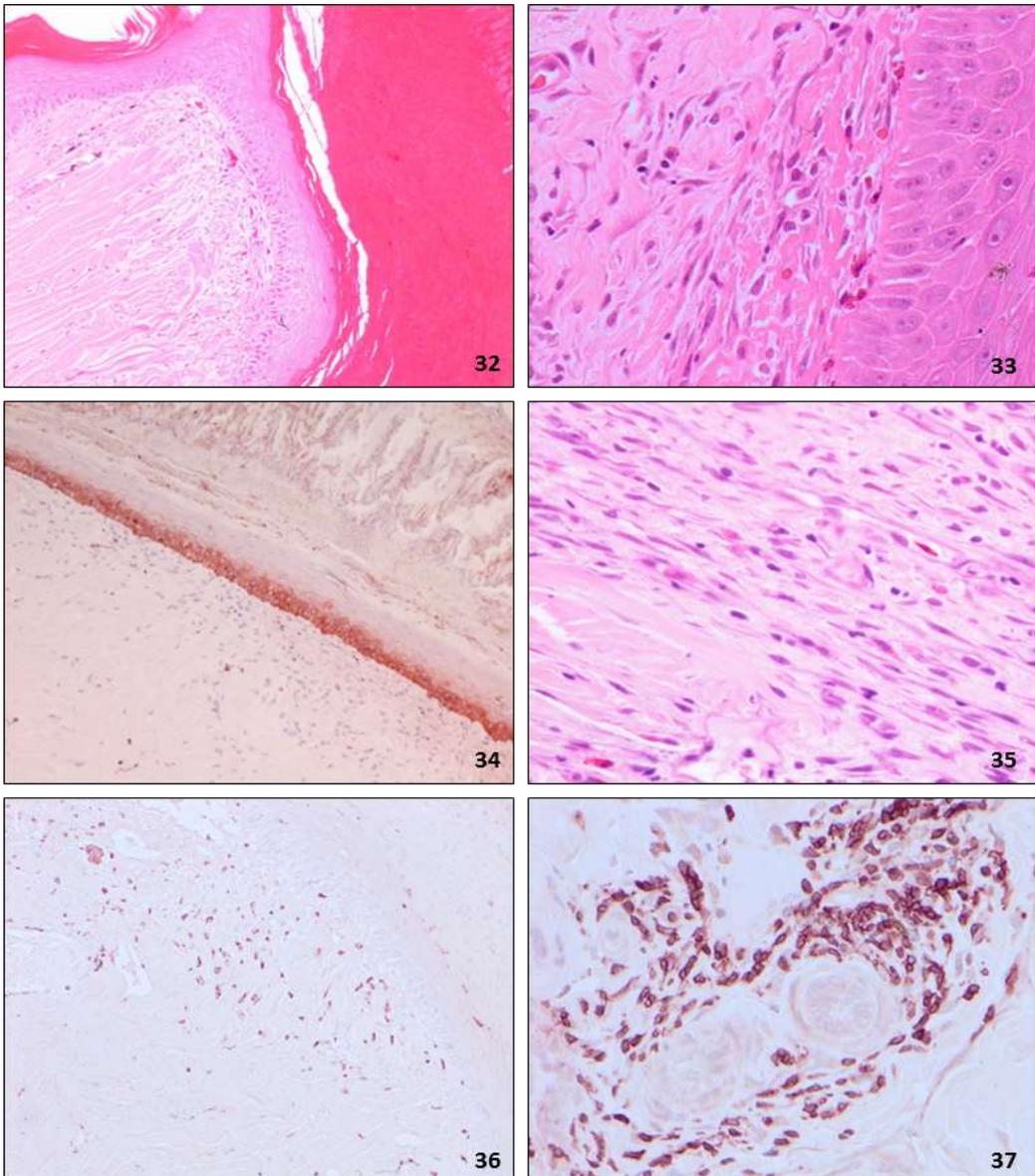
**Figuras 14 a 19.** Piel normal de la zona dorsal de las extremidades posteriores de *Trachemys scripta elegans*. **Figura 14.** La epidermis es regular y presenta invaginaciones hacia la dermis que producen el efecto óptico de escamas. La unión dermo-epidérmica es lisa y la dermis está formada por gruesas bandas de colágenos dispuestas paralelas a la superficie. **Figura 17.** La zona de membrana basal discurre entre los queratinocitos basales y la dermis. Tinción de Gomori PAMS. **Figura 18.** El anticuerpo AE1/AE3 se expresa de forma intensa y difusa en los queratinocitos basales y suprabasales de la epidermis. **Figura 19.** NCL-MSA reacciona con las fibras lisas de los vasos y fibroblastos-fibroangioblastos. Método ABC.



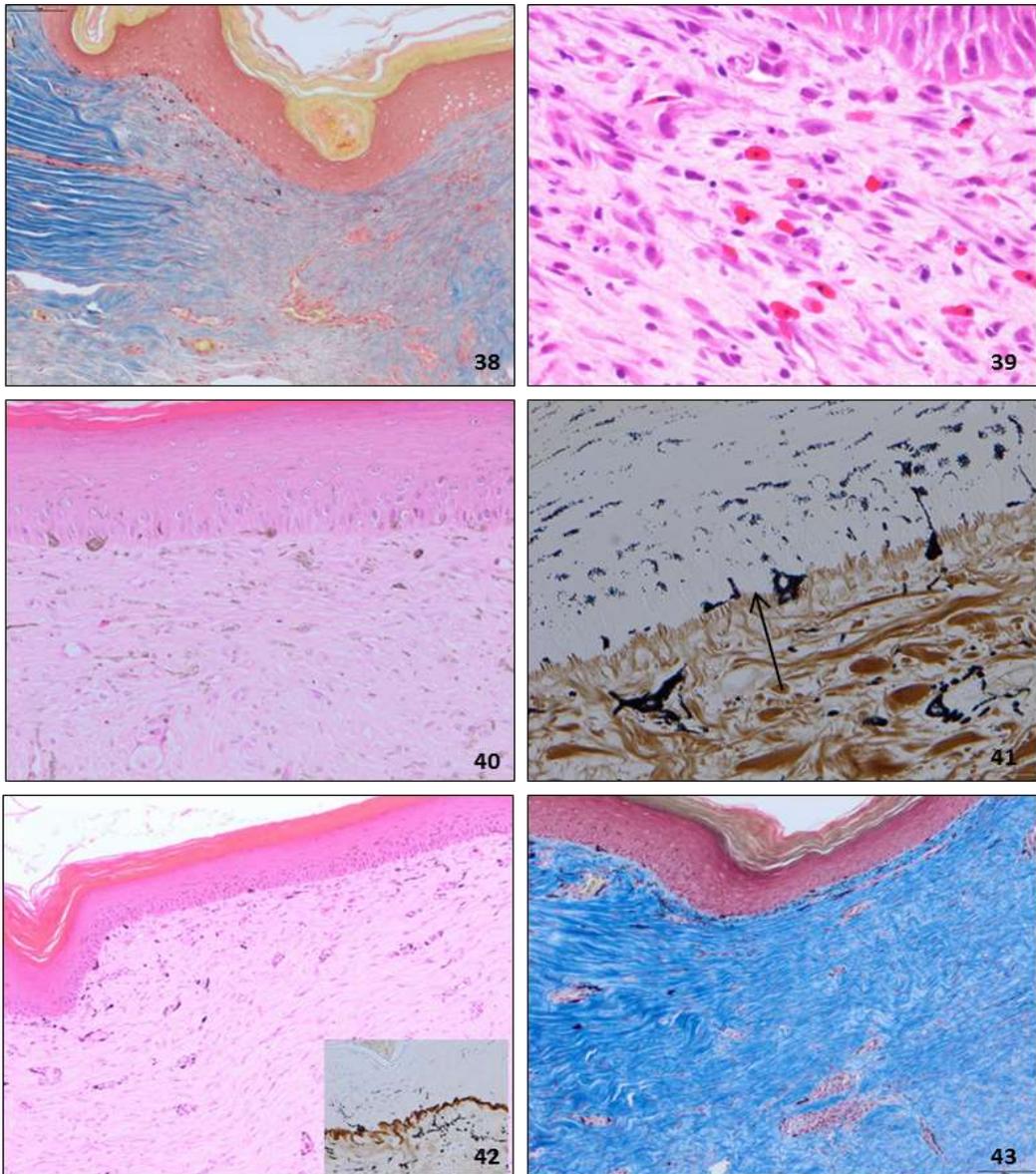
**Figuras 20 y 21.** Cicatrización a los 2 días de inducción de las heridas. Los bordes laterales están demarcados por una banda de exudado serofibrinoso, eritrocitos y heterófilos. H&E. Las porciones libres de las fibras de colágeno aparecen embebidas por el exudado y forman parte de la costra incipiente Tricrómico de Masson. **Figura 22.** Lecho de la herida con el exudado celular y plasmático formando la costra incipiente. **Figura 23.** En los márgenes de la lesión se presenta un infiltrado perivascular de heterófilos y algunos linfocitos pequeños. H&E. **Figura 24.** Cicatrización a los 7 días de inducción de la herida. El nuevo epitelio cubre el lateral de las heridas. **Figura 25.** Con el anticuerpo AE1/AE3 se aprecian el avance de los queratinocitos cubriendo la superficie entre el exudado de la dermis y la costra. Método ABC.



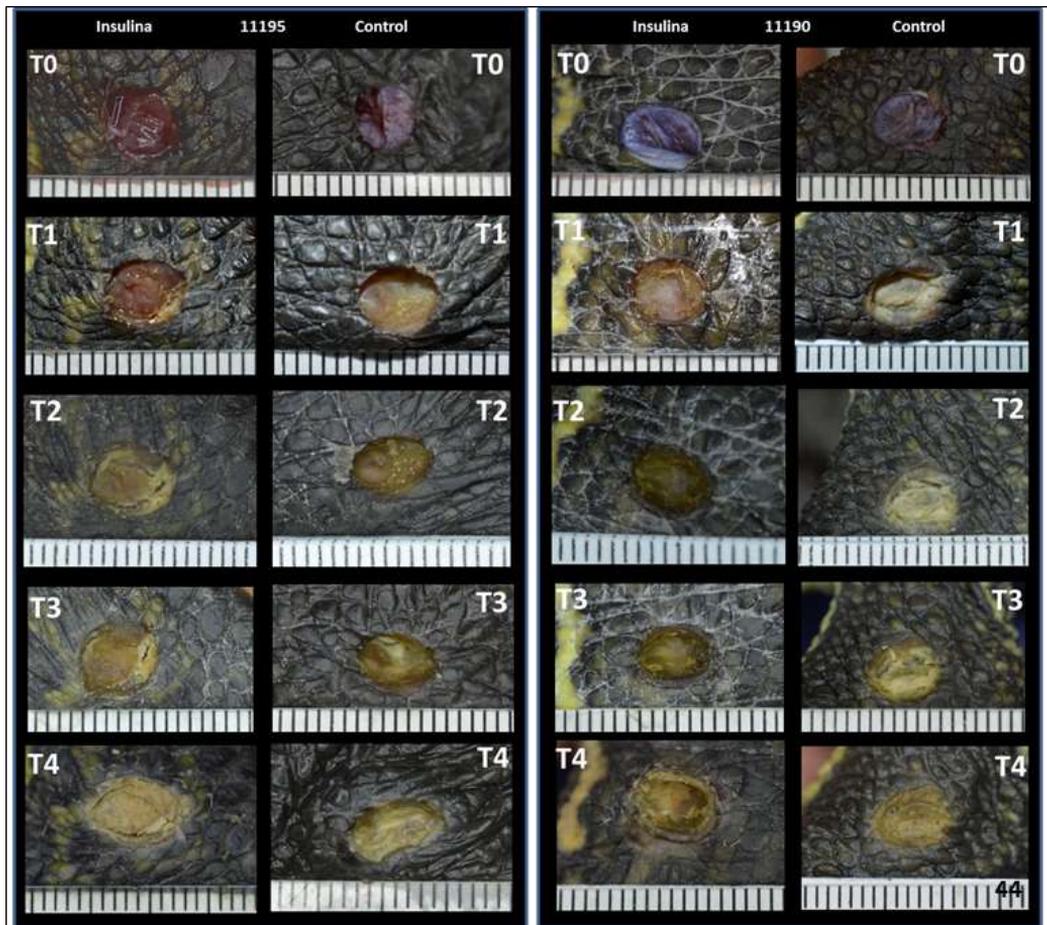
**Figura 26.** Cicatrización a los 7 días de inducción de las heridas. Detalle del borde lateral con numerosos heterófilos en la zona de formación de la membrana basal. H&E. **Figura 27.** Detalle del lecho a los 7 días, sin epitelio y cubierto de abundante exudado plasmático y celular. **Figuras 28 y 29.** Cicatrización de la herida a los 14 días. La epidermis cubre toda la superficie del lecho pero la unión dermo-epidérmica es muy frágil y se desprende durante el procesado de la biopsia. En la figura 29 se observa el margen de una herida con epidermis bien diferenciada y la zona de membrana basal más definida (flecha) con exudado celular y plasmático. H&E. **Figura 30.** Cicatrización a los 21 días de inducir la herida. El nuevo epitelio está bien diferenciado, sigue cubierto por una costra y el tejido de granulación es todavía muy activo en muchas zonas y se producen desprendimientos (flecha). H&E. **Figura. 31.** Detalle de la unión dermo-epidérmica en el borde superior de la herida donde la membrana basal regenerada es fina y escasamente teñida respecto a la de la piel no afectada (flecha). Tinción de Gomori PAMS.



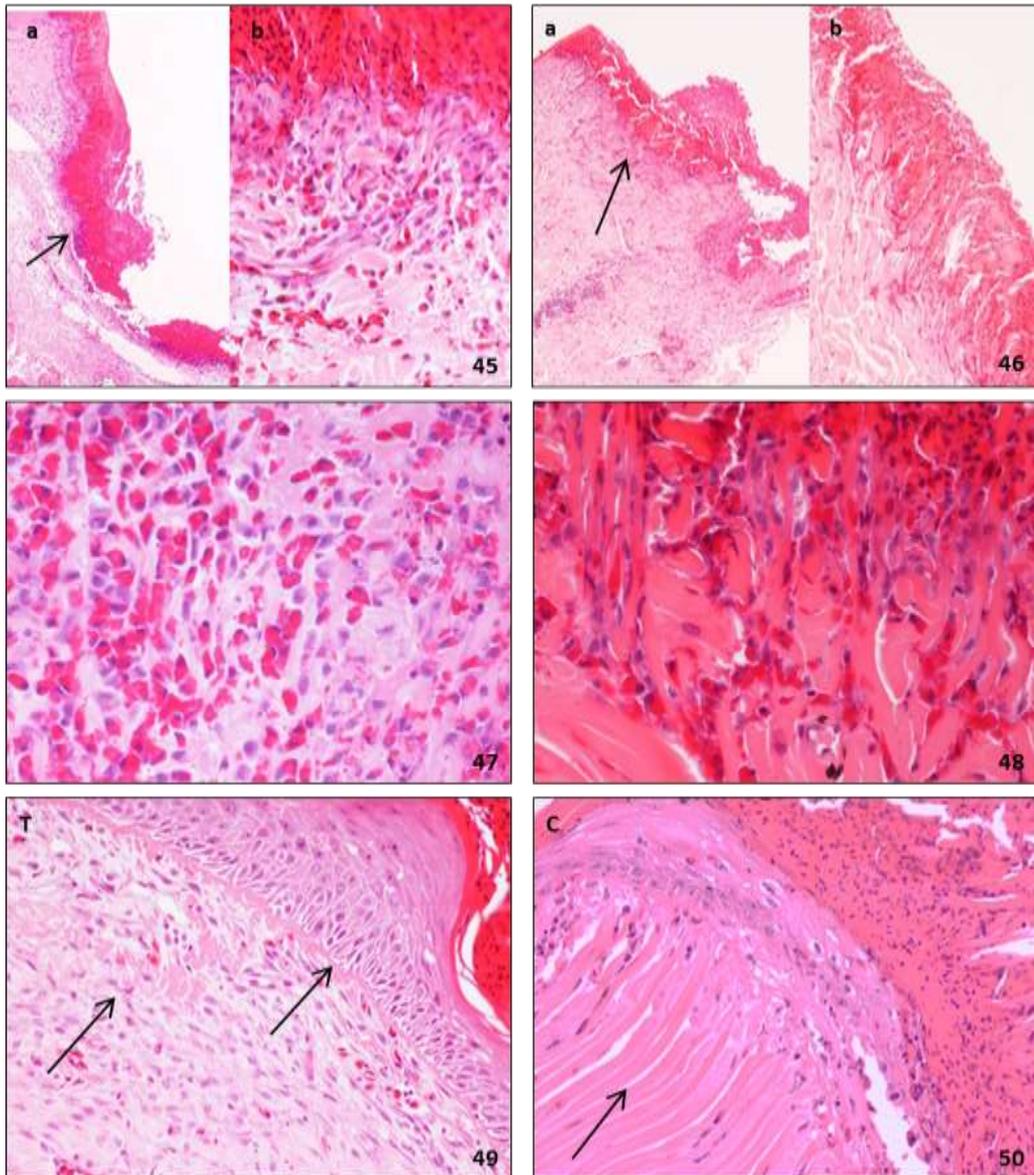
**Figuras 32 a 37.** Cicatrización a los 28 días de inducción de las heridas. Borde lateral. La epidermis tiene una diferenciación similar a la epidermis normal adyacente y persiste la costra y tejido de granulación activo. H&E. **Figura 34.** Inmunorreacción intensa de los queratinocitos basales y suprabasales en el lecho de la herida. H&E. **Figura 35.** Tejido de granulación con abundantes fibroblastos y algunas yemas vasculares. H&E. **Figura 36.** Inmunorreacción intensa con el anticuerpo MAC 387 de numerosas células mononucleares, tipo macrófago situadas en el tejido de granulación del lecho de la herida. Método ABC. **Figura 37.** El anticuerpo CD3 muestra intensa inmunorreacción citoplasmática con los linfocitos perivasculares en los márgenes de la herida. Método ABC.



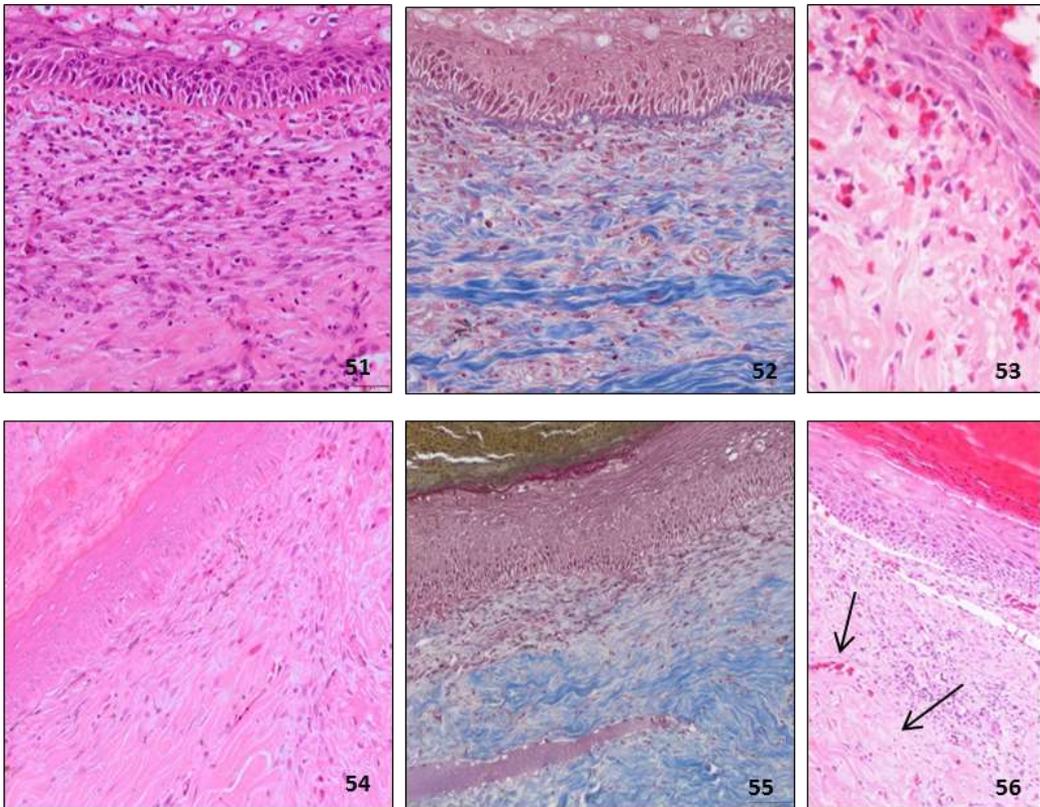
**Figura 38.** Cicatrización a los 42 días de inducción de las heridas. El tejido de granulación tiene mayor cantidad de fibras de colágeno y yemas vasculares. Tricrómico de Masson. **Figura 39.** Algunas heridas todavía presentan zonas de inflamación y tejido de granulación activos. **Figura 40.** Cicatrización a los 60 días de inducción de las heridas. El tejido de granulación con mayor cantidad de fibras de colágeno está en fase de remodelación y se ha repigmentado la zona regenerada. H&E. **Figura 41.** La membrana basal está bien definida y morfológicamente muestra un patrón finamente fibrilar muy cohesionado con los queratinocitos basales (flecha). **Figuras 42 y 43.** Cicatrización a los 135 días. La epidermis es completamente normal y la zona de membrana basal se ha completado (imagen insertada). La remodelación del nuevo tejido conectivo está muy avanzada aunque se aprecian algunas diferencias con respecto a la dermis normal. H&E y Tricrómico de Masson.



**Figura 44.** Aspecto macroscópico de las heridas tratadas con insulina y control en las tortugas nº 11195 y 11190. A la semana de realizar la herida (T1) las heridas tratadas con insulina aparecen más activas, con mayores signos de inflamación. Las costras en las heridas tratadas con insulina son más oscuras, secas y con una superficie más regular. Los bordes de la herida están más elevados en las heridas control, mientras que en las heridas tratadas con insulina el lecho de la herida se eleva antes por una formación más rápida de tejido de granulación. La retracción de la herida fue mayor en las lesiones tratadas con insulina, pero para valorar en esta imagen la retracción de la herida es necesario comparar el tamaño final de cada herida con su tamaño inicial.



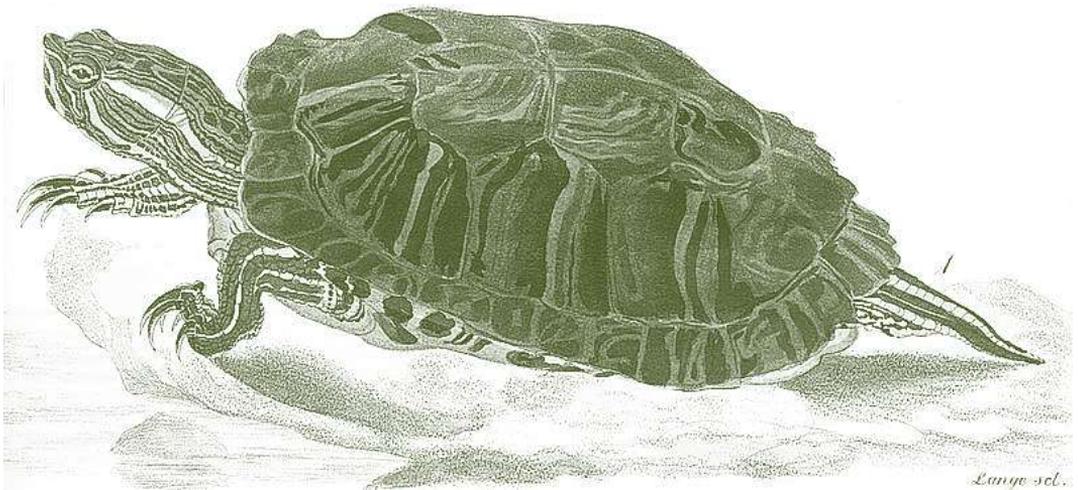
**Cicatrización en heridas tratadas con insulina y controles. Figuras 45 y 46.** A los 2 días los bordes laterales (a) y el lecho (b) de la herida están bien demarcados por una empalizada de heterófilos, y exudado sero-fibrinoso (flechas) **Figuras 47 y 48.** Las heridas tratadas muestra un infiltrado de macrófagos mucho más numeroso que los controles. H&E. **Figuras 49 y 50.** A los 7 de inducción de la herida la zona re-epitelizada es similar pero en las heridas tratadas (T) la epidermis y la zona de membrana basal están más diferenciadas respecto a los controles (C) (flechas); el exudado inflamatorio tiene abundantes macrófagos y heterófilos y el tejido de granulación es más abundante con mayor cantidad de fibroblastos, mientras en los controles es todavía escaso (flecha). H&E.



**Cicatrización en heridas tratadas con insulina y controles. Figuras 51 y 52.** A los 14 días, las heridas tratadas muestran abundante y maduro tejido de granulación con fibroblastos activos, dispuestos en paralelo a la epidermis y hay producción y depósito de fibras de colágeno. H&E y Tricrómico de Masson. **Figura 53.** Las heridas controles tienen escaso tejido de granulación y predominio de exudado células y plasmático (persistencia de fase de inflamación). H&E. **Figuras 54 y 55.** A los 28 días, el tejido de granulación es más maduro, con mayor cantidad de fibras de colágeno remodeladas. H&E y Tricrómico de Masson, respectivamente. **Figura 56.** A los 28 días, las heridas control presentan un tejido de granulación joven coexistiendo con inflamación activa y escasa producción de fibras de colágeno (flechas). H&E.



# Discusión



*"Coincido con Salomón al decir que la sabiduría proviene solamente de Dios."*

*Blaise Pascal, matemático y filósofo (1623-1662).*



## 6. Discusión

### 6.1. Cicatrización por segunda intención

El presente estudio demuestra que la cicatrización por segunda intención en la piel de *Trachemys scripta elegans* expuestas a variaciones diarias en la temperatura ambiente y con acceso libre al agua, avanza lentamente y con un comportamiento indolente. Aunque los mecanismos básicos son esencialmente equivalentes a los descritos en los mamíferos, aves y algunas especies de reptiles, hubo claras diferencias clínicas e histopatológicas. Específicamente, la limitada contracción de la herida; la persistencia de la costra hasta al menos el día 28, a pesar de constatar que la reepitelización era histológicamente completa el día 14 en la mayoría de animales. Además, la inflamación activa se prolongó hasta los 28 días y 42 días, mientras que y la proliferación del tejido conectivo y su remodelación no se produjo de manera clara antes de 42 a 135 días.

Clínicamente, la contracción de la herida cutánea en las tortugas era limitada y no significativa. Después de 28 días la contracción media de la herida fue de menos de 10% de la herida original. Como se ha descrito en las serpientes (Smith y Barker, 1988), las tortugas forman una costra seca y persistente sobre el lecho de la herida y la curación se caracteriza por la epitelización bajo la costra con disminución del espesor de la dermis que se va recuperando lentamente. Las heridas de la piel se redujeron de tamaño durante las tres primeras semanas (T1, T2 y T3) pero desde estos tiempos de control en adelante las heridas aumentaron de tamaño y la mayoría de las heridas todavía tenía una costra superficial seis semanas después de la creación de la herida. La cicatrización de heridas cutáneas circulares en serpientes siguió un patrón similar, ya que en todos los animales, la forma de las heridas no disminuyó, y este hallazgo no estuvo afectado por la temperatura ambiente (Smith y cols., 1988). Al contrario de lo que se ha descrito en dragones barbudos (Keller y cols., 2014), las costras en las tortugas no impedían la visualización de los bordes de la herida, y no hubo en ningún caso que retirar las costras para medir los perímetros. Por tanto, en tortugas el modelo de biopsia de piel con un bisturí circular, puede considerarse un medio adecuado para la evaluación de contracción de la herida sin interferir con su

cicatrización. Debido a que la reducción en la contracción de la herida es lenta y más acentuada durante las primeras semanas, el tamaño (perímetro) de la herida se registró sólo durante las primeras cuatro semanas. La contracción de la herida fue aún más lenta después de este periodo y en nuestra opinión, un seguimiento de cuatro semanas es suficiente para evaluar y comparar los efectos que cualquier intervención terapéutica podría tener sobre la cicatrización de heridas en piel blanda de tortugas.

En los mamíferos la contracción de la herida se produce de una manera centrípeta principalmente debido a la proliferación del tejido de granulación desde los bordes hacia el centro (Swaim, 1980; Scrhemi y cols., 2010). Su eficacia en mamíferos se debe a que existen áreas de piel móvil y músculos cutáneos bien desarrollados. En las tortugas, la falta de contracción de la herida se asemeja a las observaciones en los lagartos que no desarrollan un lecho continuo de tejido de granulación, tienen una piel menos móvil, y carecen de musculatura cutánea (Maderson y Roth, 1972; Keller y cols., 2014). Sin embargo, este lento proceso de contracción de la herida parece ser mayor en las tortugas que en otras especies de reptiles. Este hallazgo podría estar relacionado con la exposición de los animales a las variaciones de la temperatura ambiente, aunque las temperaturas durante el periodo de estudio estuvo siempre dentro del rango metabólico fisiológico de la especie *Trachemys scripta elegans* (McArthur y cols., 2004). El proceso de cicatrización no parece ser igual de lento en todos los reptiles. En dragones barbudos donde se realizaron experimentalmente heridas cutáneas similares, la contracción de la herida alcanzó el 50% de la herida inicial después de solo 17 días; mientras que lagartos arbóreos (*Urosaurus ornatus*), machos sanos, mantenidos a 27°C y donde se practicó una biopsia con sacabocados de 3,5 mm, necesitaron una media de 14,35 días para curar con un tamaño de la herida casi cero después de 20 días (French y cols., 2006; Keller y cols., 2014). Esta tasa de retracción de la herida registrada en este tipo de lagartos es incluso más rápida que la observada en mamíferos. Cuando se utilizaron biopsias por punción con 4 mm de diámetro como modelo de cicatrización de la piel en voluntarios humanos sanos, el tiempo medio para alcanzar el 100% de cierre era de 29,75 días (Hom y cols., 2007). Un factor para explicar la mayor velocidad de cicatrización en lagartos arbóreos frente a otros experimentos puede ser el tamaño de la herida. Así, heridas de mayor tamaño, por ejemplo de 6 mm como las inducidas en nuestro estudio, van asociadas a tiempos de curación más prolongados en todas las especies.

La curación total de la herida se considera que comprende la suma de la contracción y la reepitelización (Bohling y cols., 2004). Clínicamente, podemos considerar una herida curada cuando se desprende la costra y la piel que queda expuesta está

completamente epitelizada, aunque el grosor de la dermis no sea como el original. La escasa contracción encontrada en las tortugas podría contribuir a que los tiempos de cicatrización sean más largos en comparación con otros reptiles, pero aparte de las diferencias entre las especies, otros factores pueden haber contribuido para que la cicatrización de heridas se retrasara en nuestro estudio. Los estudios anteriores sobre la cicatrización de heridas en reptiles mantienen los animales en un hábitat restringido con una temperatura constante que coincide normalmente con la temperatura metabólica óptima de la especie. Por el contrario, en nuestro estudio los animales fueron alojados en instalaciones al aire libre para reproducir las condiciones de vida naturales de las tortugas, como mascotas o en la naturaleza. En consecuencia, las tortugas fueron expuestas a las variaciones diarias de temperatura y humedad, tuvieron libre acceso al agua y al sol. Algunos de estos factores, como por ejemplo la posibilidad de pasar varias horas sumergidas y la exposición a bacterias, pudieron afectar negativamente a la cicatrización pero también nos permitieron valorar de una forma más fidedigna los cambios clínicos e histológicos.

En las serpientes, la curación de heridas en la piel podría acelerarse mediante el mantenimiento de los animales en el extremo superior de su rango de temperatura (Smith y cols., 1988). Temperaturas nocturnas más bajas pueden haber contribuido a la lenta cicatrización de las heridas en tortugas. Además, otras posibles complicaciones como la infección bacteriana y la exposición al agua podrían influir negativamente en el proceso de cicatrización. De hecho, se encontraron colonias bacterianas en algunas de las segundas biopsias recogidas del Grupo 2 que, aunque no invadieron los tejidos de la cicatriz, sugieren la necesidad del uso de antisépticos. Además, la exposición al agua podría haber influido en las características generales de las costras superficiales, ya que, en el último control macroscópico el día 28, todas las costras se encontraban más húmedas y tenían una textura mucoide. Una posible explicación es que los animales pasaran más tiempo en el agua al final del experimento, porque el clima era más cálido al avanzar la primavera. A pesar de que todos los animales cicatrizaron sin complicaciones destacables, en una situación clínica, sería deseable una mayor rapidez de cicatrización. Este largo tiempo de curación y la exposición a posibles complicaciones justifican la búsqueda de tratamientos prácticos para acelerar y mejorar la cicatrización de heridas de la piel en las tortugas.

Nuestros resultados muestran que la cicatrización por segunda intención de heridas en tortugas sigue el mismo patrón de respuesta tisular descrito en otras especies con algunas diferencias relevantes. En primer lugar, la enorme superposición de los

procesos inflamatorios y proliferativos, que se hicieron muy crónicos (algunas heridas sufrieron retrocesos durante la cicatrización por lo menos hasta seis semanas después de la curación). En segundo lugar, el tejido de granulación era escaso o moderado en los bordes laterales y de moderado a abundante en el lecho de la herida. Este hallazgo es contrario a los estudios anteriores en serpientes que describen la curación de heridas a partir de los bordes laterales; y tercero, la ZMB persiste morfológicamente inmadura durante muchas semanas (60 días después de la herida) lo que coincide con la fragilidad de la unión dermo-epidérmica observada en este estudio y explica los desgarros producidos en algunas heridas (Smith y Barker, 1988; Wilmlink y cols., 1999; Bohling y cols., 2004; Baum y Arpey, 2005).

En cuanto a la reepitelización, nuestro estudio mostró resultados similares a los de estudios anteriores en mamíferos (Baum y Arpey, 2005; Kumar y cols., 2010; Schreml y cols., 2010) y otras especies de reptiles (Smith y Barker, 1988); la reepitelización fue completa a partir del día 14, aunque la recuperación del espesor normal de la epidermis y la diferenciación completa de los estratos, no fué evidente antes de los 28 o 42 días de la inducción de la herida. La proliferación y migración de los queratinocitos parecía llevarse a cabo a través de la matriz acidófila formada por el plasma, el exudado de fibrina y probablemente otras proteínas producidas por los fibroblastos como se ha descrito en mamíferos (Baum y Arpey, 2005, Kumar y cols., 2010). Curiosamente, durante la reepitelización observamos que muchos heterófilos estaban situados entre los queratinocitos regenerados y los fibroblastos proliferados que se disponían más en superficie, lo que nos sugirió su participación en el proceso de restitución de la ZMB con un papel de eliminación de restos de exudado (Baum y Arpey, 2005).

La excelente Inmunorreacción de los queratinocitos basales y suprabasales con el anticuerpo AE1/AE3 nos ha permitido poner de relieve las características morfológicas de la regeneración de la epidermis durante la cicatrización de heridas y su utilidad para los estudios de diferentes lesiones de la piel en tortugas.

Durante este experimento, la ZMB permaneció sin una estructura normal en las zonas reepitelizadas (con tinciones de plata y PAS) hasta al menos el día 28 después de la herida; fue a partir de los 60 días cuando observó morfológicamente normal. Estos hallazgos podrían justificar el desprendimiento fácil que se produjo de la unión dermo-epidérmica regeneradas durante los 28 días de inducción de las heridas. La persistencia de tejido de granulación activo en esa zona de los márgenes puede estar relacionada con la lenta maduración de la ZMB; hay que recordar que en la formación

de la MB participan tanto los queratinocitos como los fibroblastos de la dermis y precisamente la zona fibrosa de la lámina sub-basal depende del colágeno tipo VII producido por una población de fibroblastos estrechamente yuxtapuestos a los queratinocitos basales. Aunque la ZMB es una estructura crítica entre la epidermis y la dermis, en la mayoría de estudios sobre cicatrización no se atiende de manera específica a formación y maduración durante el proceso (Maderson y Roth, 1972; Smith y Barker, 1988; Wilmlink, 1999; Bohling y cols., 2004; Baum y Arpey, 2005; Schreml y cols., 2010; Mauldin y Peters-Kennedy, 2015). Consideramos que son necesarios más estudios para caracterizar mejor esta compleja estructura de la piel en reptiles y su papel en el anclaje de la epidermis a la dermis durante el proceso de curación.

La respuesta inflamatoria y la proliferación de tejido conjuntivo, se evaluaron morfológica y cuantitativamente durante el proceso de cicatrización. Nuestros datos de análisis morfométrico muestran que en su dinámica reproducen el patrón clásico de la migración celular secuencial documentado en los seres humanos, pero más prolongado en el tiempo (Baum y Arpey, 2005; Schreml y cols., 2010). En las heridas de pacientes humanos con cicatrización por segunda intención, los recuentos de neutrófilos, macrófagos y linfocitos suelen alcanzar su máximo a los 2, 3 y 5 días respectivamente (Park y Barbul, 2004). En las tortugas se produce una secuencia temporal parecida pero mucho más retrasada; así, los heterófilos, linfocitos y macrófagos alcanzaron su punto máximo a los 2, 7 y 14 días, respectivamente. Otra diferencia relevante cuando se compara la cicatrización por segunda intención de heridas en seres humanos y en tortugas fue que los macrófagos no fueron las células predominantes. En los seres humanos, los macrófagos, a partir de los 2 días, juegan un papel crítico en la cicatrización de heridas y más específicamente en la cicatrización por segunda intención. Estas células constituyen la población predominante antes de la migración de fibroblastos y su proliferación en el tejido de granulación que será clave en la contracción de la herida (Park y Barbul, 2004). Según nuestros resultados, la discreta presencia de macrófagos en las fases iniciales y durante la cicatrización podría estar relacionada con la tardía aparición del tejido de granulación en las heridas y la lentitud en la reparación y retracción.

Histológicamente se han encontrado diferencias entre este estudio y otros previos similares. Los heterófilos fueron las principales células tempranas del exudado inflamatorio; aunque en menor número persistieron en las heridas hasta etapas muy tardías, lo que está de acuerdo con estudios previos en reptiles (Smith y Barker, 1988; Mitchell y Diaz-Figueroa, 2004). El papel de los heterófilos en la cicatrización de

heridas de reptil es poco conocido. En cocodrilos americanos se ha considerado que desempeñan un papel similar al de los neutrófilos en los mamíferos, proporcionando una barrera contra la invasión bacteriana local en lugar de influir activamente en el progreso de la reparación tisular (Simpson y Ross, 1972; Mateo y cols., 1984). Nuestros resultados mostrarían que los heterófilos no sólo eran la población más abundante de células inflamatorias con funciones defensivas antimicrobianas, sino también la de intervenir en la unión dermo-epidérmica durante el proceso de reepitelización, sugiriendo que podrían tener un papel importante en la restauración de la ZMB, tal vez en la limpieza de exudado seroso-fibrinoso y de restos celulares de la zona de anclaje. Los neutrófilos y los macrófagos contribuyen a la proliferación y migración de otras células inflamatorias y mesenquimales a través de citocinas y liberación de los factores de crecimiento (Baum y Arpey, 2005; Schreml y cols., 2010).

Los monocitos/macrófagos estuvieron presentes desde las primeras etapas hasta el día 42 en un número similar; disminuyeron luego progresivamente hasta el día 60. La asociación de los macrófagos con áreas de abundante exudado fibrinoso y con restos de células confirma su papel como fagocitos, al igual que en los mamíferos y serpientes, jugando un papel importante en el desbridamiento de heridas y en la fibroplasia (Smith y Barker, 1988; Baum y Arpey, 2005; Schreml y cols., 2010). En los mamíferos, los macrófagos tienden a alcanzar su punto máximo en número a las 48-72 horas, y son los que permanecen más tiempo (días o semanas) y participan de una manera más compleja en la cicatrización de heridas (Baum y Arpey, 2005). Según nuestros resultados, pueden desempeñar un papel similar en la cicatrización de heridas en las tortugas. En el estudio inmunohistoquímico, el Ac MAC 387, utilizado habitualmente como un marcador de histiocítico/macrófagos, nos ayudó a identificar los macrófagos en el exudado inflamatorio, por lo que debería ser considerado de gran utilidad en los estudios de cicatrización futuros y para caracterizar cualquier proceso inflamatorio de la piel de tortugas.

Los fibroblastos y angioblastos, como principales componentes del tejido de granulación, estaban presentes tanto en el lecho de la herida como en los bordes laterales; en este estudio, en la mayoría de las heridas el tejido de granulación fue más prominente en el lecho que en los laterales, contrariamente a lo que se ha descrito anteriormente en lagartos, serpientes y es más parecido a los hallazgos en mamíferos (Maderson y Roth, 1972; Swaim, 1980; Smith y Barker, 1988; Bohling y cols., 2004; Baum y Arpey, 2005; Schreml y cols., 2010; Keller y cols., 2014). Considerando que estos estudios concluyeron que los bordes laterales juegan el papel principal en la cicatrización de heridas en reptiles y mamíferos, nuestros resultados

muestran que el lecho de la herida contribuyó al menos igualmente a la curación. Los angioblastos y brotes vasculares eran escasos en el proceso de proliferación. El Factor VIII fue útil para inmunotinción de células endoteliales de los capilares y algunas células mesenquimales fusiformes en el tejido de granulación.

Los linfocitos fueron el tipo celular predominante del infiltrado perivascular desde el día 7 hasta el día 42 o 60 pero eran escasos a moderados en el tejido de granulación; además, la mayoría eran CD3 + (linfocitos T). El papel de los linfocitos T en la cicatrización de heridas ha sido bien estudiado en mamíferos y los resultados de estos estudios indican que ejercen un efecto regulador en la intensidad de la inflamación asociada a la herida y en la proliferación de los queratinocitos (Baum y Arpey, 2005; Schreml y cols., 2010). En los reptiles, se sabe poco acerca de su papel; un estudio describió que los granulomas linfoides perivasculares estaban presentes brevemente al principio del proceso de curación en las serpientes mantenidas a 21°C y 30°C. Esto parece corresponder a las "células mononucleares basófilas" perivasculares descritas en la respuesta inflamatoria de caimanes y a los linfocitos perivasculares descritos en pollos (Carlson y Allen, 1970; Mateo y cols., 1984). Los trombocitos no se pudieron evaluar en este estudio. En las tortugas parece que desempeñan una función similar a las plaquetas de mamíferos, incluyendo su papel en la hemostasia y la cicatrización de heridas. Su acción es principalmente en las primeras 24 horas después de la lesión (fase de la hemostasia), por esta razón no se observaron morfológicamente en nuestro estudio histológico (Raskin, 2000; Park y Barbul, 2004).

Del estudio inmunohistoquímico el aspecto más importante que queremos destacar fue el encontrar reactividad cruzada de 7 los 15 anticuerpos testados con las células tejidos equivalentes de las tortugas; esto nos ha permitido caracterizar mejor la reepitelización, algunas de las células inflamatorias y las yemas vasculares durante el proceso de cicatrización por segunda intención en *Trachemys scripta elegans*. Los anticuerpos AE1/AE3, CD3 y MAC 387 mostraron una excelente inmunoreacción con queratinocitos de la capa basal y espinosa, linfocitos T y macrófagos, respectivamente. El anticuerpo AE3 (otro marcador de queratinocitos) había demostrado reactividad cruzada en estudios previos de lagartos y tortugas, aunque a pesar de búsquedas bibliográficas repetidas, no hemos podido encontrar información sobre resultados previos con los anticuerpos ensayados aquí (Alibardi y cols., 2004). El presente análisis demostró la utilidad de estos marcadores celulares para el estudio morfológico de la cicatrización de heridas, y que podrían ser una herramienta potencial para estudios futuros no sólo en la cicatrización de heridas, sino también

para caracterizar mejor microscópicamente lesiones en enfermedades cutáneas de las tortugas y otros reptiles.

## **6.2. Efectos de la aplicación tópica de insulina**

La aplicación tópica de insulina influencia significativamente la curación de heridas por segunda intención en la piel de las tortugas. En el estudio previo descrito en la primera parte de este documento, se describió cómo la cicatrización cutánea por segunda intención de heridas en las tortugas sanas de la especie *Trachemys scripta elegans* expuestas a las variaciones diarias de la temperatura ambiente, progresa lentamente y con un comportamiento indolente. En este estudio posterior, la administración diaria durante una semana de insulina tópica resultó en una mayor velocidad de retracción de la herida y aumento del número de heterófilos, macrófagos y fibroblastos en diferentes momentos a lo largo del proceso de cicatrización, junto con una disminución significativa de los linfocitos a los 28 días de realizar la herida. La formación de la costra que cubría las heridas y los aspectos macroscópicos de las heridas se consideraron mejores clínicamente a pesar de que esta observación es de carácter subjetivo. En resumen, nuestros resultados indican que la insulina tópica modificó la respuesta inflamatoria y que mejora la curación de heridas por segunda intención en la piel blanda de las tortugas.

La insulina es un polipéptido altamente conservado filogenéticamente en todos los vertebrados, incluyendo reptiles. Los antisueros específicos para la insulina porcina se han utilizado con éxito para identificar las células  $\beta$  de tortugas por inmunohistoquímica (Pérez-Tomas y cols., 1989) y para medir las concentraciones de insulina en extractos de páncreas de tortuga por radioinmunoensayo (Gapp y Polak, 1990). Esta homología entre la insulina de vertebrados nos permitió emplear la insulina porcina para el presente estudio, ya que está aprobada para uso veterinario, es fácilmente disponible en la mayoría de los países y no presenta un elevado coste en comparación con otros factores de crecimiento, como los factores de crecimiento recombinantes empleados en medicina humana.

La insulina regula una variedad de procesos biológicos, incluyendo el recambio proteico, el transporte de glucosa, la hemodinámica, y el metabolismo de ácidos grasos. Su efecto general es anabólico, favoreciendo la síntesis y formación de tejidos. También disminuye las perturbaciones metabólicas desencadenadas después de lesiones como traumatismos y quemaduras. El resultado es un perfil beneficioso de

efectos anabólicos y anti catabólicos incluyendo mejora de la pérdida del músculo esquelético (Madibally y cols., 2003).

Dependiendo de su concentración, la cantidad de insulina tópica puede tener efectos sistémicos. Estudios previos han puesto de manifiesto los beneficios de tratamiento tópico de la insulina en las lesiones de mamíferos sanos y diabéticos (Madibally y cols., 2003; Apikoglu-Rabus y cols., 2009; Chen y cols., 2012a; Azevedo y cols., 2015), pero la concentración de insulina utilizado ha sido variable. En las ratas, un estudio ensayó diferentes concentraciones de insulina y determinó que las dosis que indujeron el mejor efecto en la curación de la herida eran 0,5 UI y 1,0 UI/100 g. La dosis de 1,0 UI/100 g, en algunos animales, indujo alteraciones de la glucemia. Por lo tanto, se utilizó una crema con una concentración de 0,5 UI/100 g para todos los experimentos (Azevedo y cols., 2015). Sin embargo, otro estudio en ratas también usa tópicamente insulina humana regular Humulin® (Eli Lilly Turquía, Estambul, Turquía) pero en este caso a una concentración mucho mayor de 100 UI/mL, administrada sin excipientes, y sin que aparecieran efectos sistémico a nivel sistémico (Apikoglu-Rabus y cols., 2009). El uso de vehículos que mejoran la absorción de la insulina y proporcionan tiempos de contacto más largos puede explicar las notables diferencias en las dosis de insulina entre los estudios. En el presente estudio, elegimos glicerol como vehículo, ya que es soluble con la insulina acuosa, higroscópico, cosméticamente aceptable y tiene un alto índice de viscosidad, lo que facilita su permanencia en la herida.

En experimentos preliminares, investigamos si la insulina tópica, a diferentes dosis, era capaz de inducir cambios en la glucemia de las tortugas. Utilizamos diferentes concentraciones de insulina y se encontró que concentraciones de 5 UI/mL administrados por una semana no modificaban las curvas de glucemia en los animales tratados respecto a un grupo control. Tampoco encontramos incrementos de peso significativos en los animales tratados, por lo que podemos concluir que la insulina porcina, aplicada según el protocolo descrito, no tiene efectos sistémicos sobre el metabolismo del animal. Es posible que podamos usar concentraciones mayores y que estas mayores concentraciones mejoren la respuesta clínica a la insulina. Teniendo en cuenta las diferencias significativas encontradas en nuestro trabajo, podemos concluir por ahora, que una solución con esta concentración tiene un efecto local positivo. Una aplicación diaria durante la primera semana de cicatrización se consideró práctica y apropiada, ya que se produce la reacción inflamatoria rápidamente después de la lesión y porque la cicatrización de heridas de la piel blanda

de tortugas se caracteriza por la epitelización bajo una costra a que impide una aplicación de insulina más prolongada.

La aplicación de la insulina tópica induce diferencias estadísticamente significativas mayores en los recuentos de heterófilos, macrófagos y fibroblastos, mientras que a los 28 días produjo una densidad significativamente menor de linfocitos en el infiltrado inflamatorio. Estos cambios demuestran que la insulina tópica tiene la capacidad de modificar la respuesta inflamatoria de la piel de las tortugas después de la lesión. Estos hallazgos están de acuerdo con estudios anteriores en mamíferos no diabéticos (Kassen y Trau, 2007; Apikoglu-Rabus y cols., 2009; Azevedo y cols., 2015).

El mecanismo por el cual la insulina ejerce su efecto no se entiende completamente. Los investigadores han demostrado que la insulina tópica mejora la reparación de tejidos a través de estímulos en la vía de señalización de la migración de queratinocitos (Liu y cols., 2009). Lima y cols., (2012) confirmaron que la insulina puede estimular una variedad de funciones celulares importantes en la reparación tisular. También se sabe que la insulina puede estimular la síntesis de colágeno en fibroblastos de la piel (Chaiken y cols., 1986). Así, Pellegrinelli y cols. (2001) informaron de la presencia de receptores de insulina en los queratinocitos de los folículos pilosos, e identificaron vías por las cuales la insulina puede promover el crecimiento de estos queratinocitos en los folículos. También se ha demostrado que los queratinocitos humanos son dependientes de la insulina para su crecimiento. Experimentos *in vitro* sugieren que los factores de crecimiento tales como la insulina pueden actuar como atrayentes quimiotácticos y mitógenos para las células implicadas en la cicatrización de heridas, y que estos factores de crecimiento pueden estimular la angiogénesis, la formación de la matriz extracelular y la degradación y liberación de citoquinas (Ando y Jensen, 1993; Apikoglu-Rabus y cols., 2009).

La cicatrización de heridas es un proceso dinámico y complejo, como la reparación de tejidos que implican eventos pleiotrópicos moleculares y celulares (Qiao y cols., 2011). La inflamación es esencial en las primeras fases de la cicatrización de heridas. Sin embargo, la persistencia de la inflamación conduce a la inhibición de la curación en las fases posteriores (Wilmink y cols., 1999). En el presente estudio, la insulina tópica aumentó significativamente el número de heterófilos en el día 7 pero los recuentos de células fueron posteriormente similares. El número de heterófilos cayó cuando se suspendió la insulina tópica y este hallazgo puede indicar que la administración de insulina por un periodo más largo dará lugar a la inflamación prolongada y ser perjudicial para el proceso de cicatrización de la herida. En contraste

con esta observación en tortugas, en otro estudio Chen y cols. (2012b) demostraron que una aplicación tópica de insulina sobre heridas a dosis bajas durante tres días suprime la infiltración de los neutrófilos. Además, la insulina mejoró las funciones celulares de los neutrófilos en el área de la herida. El tiempo de curación de las heridas tratadas con insulina se redujo significativamente en comparación con las heridas tratadas con solución salina. En nuestro estudio hemos observado el mantenimiento de heterófilos durante el período de siete días de la aplicación de insulina, pero con una mejora en la calidad de la respuesta inflamatoria y esto sugeriría que heterófilos en los reptiles, a pesar de que tienen una función similar a los neutrófilos en los mamíferos (Campbell, 2006), tienen unas características diferentes en el proceso de la respuesta inflamatoria.

El efecto de la insulina tópica fue especialmente marcado sobre la infiltración de macrófagos. En los días 2, 7 y 14 el número medio de macrófagos fue significativamente mayor. Estos cambios indican que la insulina tópica aceleró la curación de la herida en tortugas. Chen y cols. (2012a) encontraron que la insulina indujo un aumento de la infiltración de macrófagos notablemente en los primeros 3 días después de la herida. El número de macrófagos en el día 2 de las heridas de tratamiento con insulina era casi el mismo que el día 3 de las heridas de control, lo que sugiere la infiltración avanzada de macrófagos inducida por la insulina. Los resultados de este estudio indican que la insulina promueve la cicatrización de heridas mediante la regulación de la respuesta inflamatoria de la herida, específicamente la cantidad y la función de los macrófagos. Por lo tanto, el tratamiento tópico de insulina puede resultar ser una terapia eficaz para la cicatrización de heridas. Una respuesta similar se observó en el presente estudio sobre las tortugas.

El aumento de macrófagos que se infiltran y salen de la zona de la herida inducidos por la insulina puede ser un factor importante que contribuye al incremento de la curación de heridas. Los estudios *in vitro* demostraron la insulina facilitado la quimiotaxis de monocitos/macrófagos, pinocitosis/fagocitosis y la secreción de mediadores inflamatorios (Chen y cols., 2012a). Las citoquinas con la capacidad de activar macrófagos, tales como IL1b (interleucina 1 beta) y MALP-2 (lipopeptideo activador de monocitos 2), se han utilizado con éxito para promover el cierre de heridas (Maruyama y cols., 2007; Kumar y cols., 2010). En comparación con estas citoquinas, el tratamiento con insulina es mucho menos costoso, más fácilmente disponible y se ha usado durante casi cien años sin ningún efecto secundario.

Otro efecto importante de la insulina tópica fue el aumento medio de recuentos de los fibroblastos. En general, los factores de crecimiento son polipéptidos que pueden definirse como agentes que promueven la proliferación celular y el metabolismo a través de la interacción con los receptores específicos unidos a la membrana celular. Además, estas proteínas pueden inducir la migración de células en el espacio de la herida, que sirve como quimioatrayentes para reclutar células importantes, tales como leucocitos y fibroblastos en el área herida (Kiritsy y Lynch, 1993). Así que, estos trabajos han comprobado que la insulina tópica actúa de manera similar en la estimulación de los fibroblastos de la piel y en la síntesis de colágeno.

En los anfibios (*Ambystoma mexicanum*) se mostró que la insulina puede estimular la captación de sulfato y el crecimiento del cartílago como en los mamíferos (Schneider y Hanke, 1996). También se ha observado una cicatrización más rápida y una mayor resistencia a la tracción de la herida en ratas tratadas con insulina tópica. El análisis histológico de tejido de la herida reveló una aparición precoz de las fibras de colágeno con una morfología más compacta, densa y bien orientadas en comparación con los animales de control (Hrynyk y Neufeld, 2014). Nuestros resultados también demuestran que en las tortugas, la insulina tópica aumentó el número de fibroblastos y este efecto podría ser el principal contribuyente a explicar una mayor retracción de la herida y una cicatrización más rápida observada en los animales tratados.

La retracción de la herida es un componente importante en la cicatrización por segunda intención, y la característica fundamental para la esta retracción o contracción es la calidad del tejido de granulación (Swaim, 2001; Sardari y cols., 2006). En nuestro estudio, la retracción de la herida fue significativamente mayor a los 28 días en las heridas tratadas con insulina. Este es un hallazgo muy notable puesto que la contracción de la herida era muy limitada en el grupo de control, como es característico en los reptiles. La curación se caracterizó por una epitelización bajo la costra con la disminución en el espesor de la dermis que lentamente aumentó su grosor hasta rellenar el defecto de la piel y producirse la caída espontánea de la costra. Esta mejor contracción de la herida, clínica y estadísticamente relevante, podría explicarse por la capacidad de la insulina tópica para modular la respuesta inflamatoria con aumento de la infiltración de macrófagos, tejido de granulación y la deposición de colágeno (Azevedo y cols., 2015). En cobayas sanas, la crema tópica de insulina aumentó la contracción en quemaduras de segundo grado experimentalmente inducidas. La contracción de la herida es una etapa crítica en la curación de la úlcera crónica (Kassem y Trau, 2007) y la insulina tópica puede ser útil en reptiles, así como es en mamíferos en el tratamiento de heridas crónicas.

En nuestro estudio, se encontró que la administración de insulina tópica mejora la cicatrización de heridas, acortando el tiempo necesario para la epitelización completa en el grupo tratado. Los hallazgos histológicos de un mayor número de fibras de colágeno en el grupo tratado con insulina apoyaron los resultados morfométricos de recuentos celulares. Esto está de acuerdo con otros estudios en que se utilizó la insulina tópica para mejorar la cicatrización de heridas, pues puede afectar los miofibroblastos (Kassem y Trau, 2007) y provocar un aumento de la deposición de colágeno (Madibally y cols., 2003).

En un estudio sobre los efectos de la insulina tópica en la curación de heridas que se llevó a cabo en cultivos de células de la piel humana, Liu y cols. (2009) observaron que las heridas de piel en las ratas tratadas por vía tópica con insulina curaban más rápido, que las células superficiales de la epidermis cubrirán la herida más rápidamente, y las células de la dermis reconstruirán los vasos sanguíneos más rápidamente. También se demostró que la insulina tópica estimuló la proliferación y migración de queratinocitos y la migración de las células endoteliales microvasculares. Esta mejora del proceso de curación también se observó en la piel de las tortugas tratados con insulina tópica.

Estudios preclínicos también han llegado a la conclusión de que los factores de crecimiento pueden mejorar la cicatrización de heridas; sin embargo, en muchos casos, los efectos fueron clínicamente irrelevantes. Por ejemplo, EGF recombinante aplicado tópicamente redujo el tiempo para completar la reepitelización sólo en 1,5 días en injertos cutáneos de pacientes humanos (Kiritsy y Lynch, 1993). Coleman y cols. (1991) informaron que no hubo diferencias estadísticas entre 10 mg/mL de EGF en una crema de sulfadiazina de plata y la crema sola, en la curación de heridas quirúrgicamente inducidas en voluntarios humanos sanos.

El presente estudio fue diseñado como un estudio controlado y el perímetro de la herida se midió a ciegas por dos investigadores. El tamaño de la muestra proporcionó suficiente poder estadístico para detectar diferencias en la contracción media de la herida de alrededor del 18% o mayor; un tamaño de muestra más grande podría haber proporcionado más potencia estadística, pero diferencias cuantitativamente menores carecen de relevancia clínica. Al día 28 la retracción de la herida en el grupo tratado insulina fue 24,26% mayor que en el grupo control. Una diferencia mayor después de 28 días hubiera sido deseable pero en nuestra opinión es lo suficientemente grande como para considerar la insulina tópica potencialmente útil, sola o combinada con otros factores de crecimiento, en el tratamiento de heridas de

reptiles. Consideramos por tanto justificado realizar estudios similares en casos clínicos con heridas no inducidas experimentalmente.

En definitiva, hemos encontrado que la aplicación tópica de insulina mejoró la cicatrización por segunda intención en heridas de piel blanda de tortugas. Los resultados indicaron que la insulina promueve la curación mediante la regulación de la respuesta inflamatoria de la herida, específicamente la cantidad y la función de macrófagos, heterófilos y fibroblastos. Por lo tanto, el tratamiento tópico de la insulina puede ser una buena opción para la mala cicatrización de heridas, además de ser la terapia de bajo costo para su uso en lesiones en las tortugas.

### **6.3. Limitaciones**

Debido a su duración, este estudio trató de abordar la curación de la piel en las condiciones ambientales habituales de las tortugas, pero este enfoque presenta varias limitaciones. Los animales fueron expuestos a temperaturas variables, tuvieron libre acceso al agua y el tiempo que las tortugas pasaron sumergidas no fue registrado. Aunque el estudio se llevó a cabo en primavera, cuando las tortugas eran metabólicamente más activas, las variaciones en la temperatura y la exposición al agua pueden haber extendido el proceso de cicatrización debido a que la curación en los reptiles es muy dependiente de la temperatura. Estas diferencias son importantes al comparar nuestros resultados con los estudios publicados previamente que utilizan especies de reptiles terrestres mantenidas a temperatura controlada.

Los anestésicos locales y fármacos anti-inflamatorios no esteroideos no se administraron por temor a que podrían interferir con la reacción inflamatoria durante la cicatrización. Los analgésicos narcóticos podrían haber sido utilizados ya que son menos propensos a interferir con la cicatrización de heridas, pero, pueden causar depresión respiratoria. Así que, como después de recuperarse de la anestesia general, los animales no mostraron signos de dolor o cambios de comportamiento en los días a partir de entonces se optó por la no utilización de estos fármacos, a pesar de las consideraciones éticas acerca del bienestar de los animales.

Finalmente, una debilidad del estudio de la aplicación tópica de insulina es su condición preclínica; por razones prácticas, no pudimos incluir animales enfermos o con heridas no-experimentales. En las heridas de la piel de reptiles, el beneficio potencial de insulina u otros factores de crecimiento no se ha investigado antes y por

lo tanto, un estudio preclínico era necesario antes de determinar la utilidad real de la insulina tópica en ensayos clínicos.

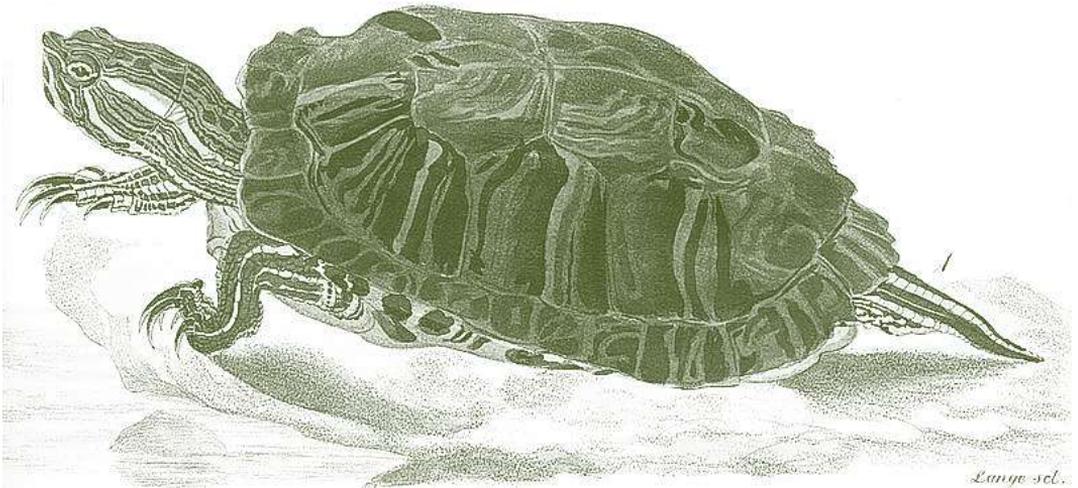
#### **6.4. Perspectivas**

Se necesitan estudios adicionales sobre la cicatrización de las heridas en tortugas para definir con mayor precisión los mecanismos celulares y moleculares involucrados teniendo en cuenta el complejo sistema de regulación de este proceso fisiológico.

Serían convenientes más estudios para probar la eficacia de la insulina tópica en otras especies de reptiles, así como ensayos clínicos en individuos con heridas crónicas.



# Publicaciones



*"Cada persona debe trabajar para su mejora y, al mismo tiempo, participar en la responsabilidad colectiva de toda la humanidad."*

*Marie Curie, química y física (1867-1934).*



## 7. Publicaciones

### 7.1. Artículos en revistas científicas derivados de esta tesis doctoral

Negrini J, Ginel PJ, Novales M, Guerra R, Mozos E. **Clinical and histological findings of cutaneous wound healing in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta elegans*) housed in unheated outdoor enclosures.** *Veterinary Dermatology* 2016, DOI: 10.1111/vde.12346.

Negrini J, Mozos E, Escamilla A, Lucena R, Guerra R, Ginel PJ. **Effects of Topical Insulin on Second-Intention Wound Healing in the Red-Eared Slider Turtle (*Trachemys scripta elegans*).** *Veterinary Research Communications* (en revisión).

### 7.2. Comunicaciones en congresos derivadas de esta tesis doctoral

Negrini J, Mozos E, Pérez J, Escamilla A, Guerra R, Ginel PJ. **Efecto de la aplicación tópica de insulina en la cicatrización por segunda intención en la piel de tortugas: estudio morfométrico.** Presentado como comunicación tipo póster, en el XXVIII Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria, celebrado en Córdoba, España, 8 a 10 de junio de 2016

Negrini J, Ginel PJ, Guerra R, Hormigo MA, Zafra R, Mozos E. **Efecto del aceite ozonizado tópico sobre la cicatrización por segunda intención en piel blanda de tortugas.** Presentado como comunicación tipo póster, en el IX Southern European Veterinary Conference, celebrado en Barcelona, España, 15 a 17 de octubre de 2015.

Negrini J, Ginel PJ, Escamilla A, Guerra R, Ruiz J, Mozos E. **Análisis inmunohistoquímico de la piel normal de tortugas y durante la cicatrización experimental.** Presentado como comunicación tipo póster, en el XXVII Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria, celebrado en Barcelona, España, 17 a 19 de junio de 2015.

Negrini J, Ginel PJ, Guerra R, Pérez J, Ruiz J, Mozos E. **Efecto de la aplicación tópica de insulina en la cicatrización de heridas de piel en tortugas.** Presentado como comunicación tipo póster, en el XXVI Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria, celebrado en Zaragoza, España, 18 a 20 de junio de 2014.

Negrini J, Ginel PJ, Mozos E. **Estudio de la cicatrización en la piel de quelonios: efectos de la aplicación tópica de insulina y de aceite ozonizado.** Presentado como comunicación tipo oral, en el IV Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba, celebrado en Córdoba, España, de 18 a 19 de noviembre de 2014.

Negrini J, Ginel PJ, Guerra R, Blanco B, Mozos E. **Efectos de la insulina tópica sobre la cicatrización de heridas en tortugas.** Presentado como comunicación tipo oral, en el X Congreso Andaluz de Veterinarios Especialistas en Animales de Compañía, celebrado en Córdoba, España, 7 a 8 de noviembre de 2014.

Negrini J, Ginel PJ, Guerra R, Ruiz J, Zafra R, Mozos E. **Estudio de la cicatrización en piel de tortugas.** Presentado como comunicación tipo póster, en el XXV Reunión da Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria, celebrado en Toledo, España, 19 a 21 de junio de 2013.

# Veterinary Dermatology

Vet Dermatol 2016

DOI: 10.1111/Adv.12346

## Clinical and histological findings of cutaneous wound healing in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta elegans*) housed in unheated outdoor enclosures

Joao Negrini\*†, Pedro J. Ginel‡, Manuel Novales‡, Rafael Guerra§ and Elena Mozos\*

\*Department of Comparative Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Campus de Rabanales, 14014 Córdoba, Spain.

†Medicina Veterinária, Federal University of Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária, S/n Campo Grande, MS 79070-900, Brazil.

‡Department of Animal Medicine & Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Campus de Rabanales, 14014 Córdoba, Spain.

§Zoological Garden of Córdoba, Avenida de Linneo, 14071 Córdoba, Spain.

Correspondence: Elena Mozos, Department of Comparative Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Campus de Rabanales, 14014 Córdoba, Spain. E-mail: an1momo@uco.es

**Background** – Cutaneous wounds are common in chelonians. The clinical and histological features of wound healing in these species are not well described and this prevents evaluation of new therapies.

**Objectives** – To describe clinical and histopathological features of cutaneous wound healing in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta elegans*).

**Animals** – Twenty four healthy adult females housed in outdoor facilities with free access to water and exposed to daily variations in temperature.

**Methods** – Full thickness 6 mm skin biopsy punch wounds were created in the rear limbs. The turtles were assigned to Group 1 ( $n = 12$  for clinical evaluation) and Group 2 ( $n = 12$  for microscopic study). Group 1 was photographed on Day 1 and weekly, until 28 days post wounding. Wound retraction was expressed as the percentage of perimeter reduction. For Group 2, three skin wounds were sampled at 2, 7, 14, 21, 28, 42, 60 and 135 days post wounding for histological study. The avidin-biotin-peroxidase (ABC) staining method was used to evaluate five commercial antibodies.

**Results** – Wound contraction was limited; crust persisted at least 28 days. Re-epithelialization was complete by Day 14 in many animals; active inflammation persisted until 28 days; connective tissue re-constitution and remodelling was achieved from 42 to 135 days. Antibodies AE1/AE3, Factor VIII, MAC 387, CD3 and NCL-MSA showed cross reactivity with the cell counterpart in turtle tissues.

**Conclusions and clinical importance** – Second intention wound healing progressed slowly and with an indolent behaviour. Microscopically there was marked overlapping of the inflammatory and proliferative phases over a long time period.

### Introduction

Little is known about cutaneous wound healing in reptiles, especially in chelonians for which previous reports have studied epidermal structure and wounds of the shell.<sup>1–4</sup> This lack of knowledge contrasts with the high clinical prevalence of soft skin wounds in chelonians held in captivity. As in other reptiles, turtles are prone to wounds caused by traumatic injuries such as abrasions, thermal burns; bites from cage mates or rodents; and surgical procedures.<sup>5,6</sup> These skin wounds, especially in the case of aquatic turtles, often heal insidiously and when the repair process is unable to restore anatomic and

functional integrity in an appropriate length of time, wounds become chronic, increasing the risk for more serious complications.<sup>7</sup>

Although any clinical intervention should be based on a thorough understanding of reptile wound healing, our current knowledge is based mostly on data extrapolated from endothermic vertebrates. Cutaneous wound healing is an extraordinarily well-regulated, complex cellular and molecular process which has been artificially compartmentalized into three continuous and overlapping phases: inflammation, proliferation and remodelling (maturation).<sup>8–10</sup> Although these basic mechanisms are phylogenetically well preserved, many studies have reported differences between species, individuals and even between anatomical locations within the same individual, demonstrating that considerable heterogeneity exists in wound healing.<sup>8,11,12</sup> This heterogeneity is clinically relevant because it has a significant effect over important variables such as inflammatory response, wound contraction, healing time and potential complications.<sup>11,13,14</sup> Another important clinical consideration is that the scarce publications studying skin

Accepted 18 April 2016

**Sources of Funding:** Research presented here was supported by funding from the CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel), Brazil – process number 1339/3-3 and by the research groups PAIDI AGR 262 and BIO 307, Junta de Andalucía, Spain.

**Conflict of Interest:** No conflicts of interest have been declared.

© 2016 ESVD and ACVD, *Veterinary Dermatology*

1

Negrini et al.

wound healing in reptiles kept the animals in restricted habitats with a constant ambient temperature, and not keeping the natural environment and metabolic conditions of the reptiles.<sup>5,6,15</sup>

The aim of this work was to characterize the clinical and histopathological aspects of cutaneous wound healing in *Trachemys scripta elegans* (red-eared slider) exposed to uncontrolled daily variations in ambient temperature in an aquatic environment. Understanding the basic mechanisms and stages of wound healing and establishing quantitative parameters, will be the foundation of further studies evaluating new therapies in the management of soft skin wounds in chelonians.

## Materials and methods

### Animals

Twenty four adult female turtles (weight range 1.2–2.5 kg) were used. All animals were deemed healthy based upon physical examination, packed cell volume and faecal flotation analysis. Turtles were identified with microchip and were housed outdoor in six vivaria (four animals in each) with an area of 3 m<sup>2</sup>; every vivarium included a plastic pool (800 L capacity). Water was changed daily and came from the public water service; main parameters for water quality were pH 7.72, nitrites 0.023 mg/L, ammonia 0.266 mg/L, aluminium <180 µg/L and combined chlorine 0.86 mg/L, with negative bacterial counts for *Escherichia coli*, coliforms and aerobic bacteria at 22°C. Physicochemical and microbiological controls were carried out twice a month. All animals had free access to a sunbathing area and were fed ad libitum with a commercial diet (Aquatic Turtle Monster Diet, Zeigler Bros Inc., Gardners, PA, USA).

After a period of 2 weeks for adaptation, the turtles were assigned to two groups of the same size (n = 12). Group 1 was used to assess clinical features and wound retraction; in Group 2, used for the microscopic study, three wounds from different animals were sampled at 2, 7, 14, 21, 28, 42, 60 and 135 days post wounding (dpw). Both groups were exposed to an appropriate temperature range (ATR) (Figure S1), and humidity, 48–55%, that corresponded with spring season in the study laboratory's geographical location (37°52'45.4"N and 4°46'49.2"W).<sup>16</sup> This season was considered adequate because turtles were coming out of hibernation, the weather conditions were warm and their metabolism was activated. All experimental procedures were conducted in accordance with the European guidelines for proper use and care of experimental animals and were approved by the Committee of Animal Ethics of our institution (reference 2168/2013.03.21).

### Skin wound biopsy

The animals were anaesthetized with ketamine (20 mg/kg intramuscularly (i.m.)) (Imalgene® 100 mg/mL, Merial, Barcelona, Spain) and detomidine (0.5 mg/kg (i.m.)) (Domosedan® 10 mg/mL, Lab. Esteve, Barcelona, Spain) both injected into the front legs. Without previous disinfection, one 6 mm diameter wound was made symmetrically on the dorsal aspect of each rear limb using a disposable circular scalpel. In Group 2, 24 wounds were sampled (6 mm diameter) under general anaesthesia using a disposable circular scalpel. After every biopsy procedure, the animals were housed in individual terrariums at room temperature for approximately 12 h. Following this recovery period, the animals did not show signs of discomfort and were returned to their vivaria. Local anaesthesia and post biopsy analgesia or anti-inflammatory therapies were not administered, to avoid their impact on wound healing. All skin biopsy samples obtained at wound induction time were fixed in 10% neutral buffered formalin for 16–20 h, paraffin-embedded, stained according to routine histological procedures and used as controls. Haemorrhage was minimal in all turtles and controlled with digital pressure.

2

### Clinical evaluation of wound healing

Clinical evaluation of wound retraction and overall healing process was performed in 24 wounds (Group 1). Wounds were photographed on Day 1 and weekly until 28 dpw (time points T0–T4) using a macro lens (Nikon AF-S DX 40 mm). Rulers were held close to the wound as a reference to correct for variations in focus distance. After this 4 week period, image analysis software (Analysing digital imaging: <http://sew.global-systems-science.org/software>, Accessed May 9, 2016; Global System Science: University of California, Berkeley, CA, USA) was used to measure wound perimeter at each time point. Wound retraction was expressed as the percentage of perimeter reduction from the initial wound (T0) until 28 dpw (T4). Other measurements, including area and diameter, were recorded and provided comparable information. The photographs were evaluated by two observers blind for animal and time point of each wound. The correlation coefficient between observers was 0.98 and 0.97 as calculated from 20 repeated measures of wound perimeter and area, respectively.

### Histology

Samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, then cut across into two halves and paraffin-embedded according to routine procedures. Four to five micrometre thick serial sections were obtained from each block. Sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E), periodic acid Schiff (PAS), methenamine silver staining (Gomori PAMSI), Masson's trichrome (TM) and Fraser-Lendrum (FL) to visualize the basement membrane zone (BMZ) and precisely identify fibrous tissue proliferation/remodeling and fibrin exudate, respectively. Systematic microscopic evaluation included re-epithelialization, BMZ formation, and dermal and subcutis morphological changes during the onset, progression and resolution of the inflammatory and regeneration events.

### Immunohistochemistry

Previous immunohistochemical (IHC) analyses carried out on skin samples of different species of lizards and turtles with a panel of commercial antibodies (data not shown), led us to use five Abs in this experiment to better characterize re-epithelialization and the inflammatory response.<sup>17,18</sup> Selected antibodies were AE1/AE3 (anti-human pankeratin marker), MAC 387 (anti-human macrophage/leukocytic antigen), CD3 (anti-human T-lymphocyte antigen), Factor VIII (anti-human endothelial cells and platelets antigen) and NCL-MSA (anti-human  $\alpha$ -smooth muscle actin antigen). The avidin-biotin-peroxidase (ABC) method was used.<sup>19</sup> Details of the method and immunoreaction patterns are shown in Table 1.

Briefly, 4–5 µm thick wax-embedded sections were mounted on resin-coated slides, deparaffinized in xylene and rehydrated in graded alcohols. Antigen retrieval was undertaken by treating sections with pronase 0.75% in phosphate buffered saline (PBS) for 10 min at room temperature or with citric acid 0.01 mol/L, pH 6 in a microwave oven (650 W) for 2 min, and then at low setting (150 W) for 5 min. Between all steps sections were rinsed in 0.01 mol/L PBS pH 7.2. Endogenous peroxidase was inactivated by incubation in 3% methanol peroxide for 30 min and nonspecific binding of the secondary antibody was blocked by incubation with 10% normal goat serum for 10 min at room temperature. Sections were then incubated with the primary antiserum overnight in a humidified chamber at 4°C, or 3 h at room temperature (Table 1), followed by incubation with link serum (polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulin or monoclonal goat anti-mouse immunoglobulin, Dako, Denmark A/S, Glostrup, Denmark) at the specific dilution (1:50 or 1:200) for 30 min, and followed avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) kit (Vector Laboratories Inc; Burlingame, CA, USA) each for 60 min at room temperature and in the dark. The chromogen used was Vector® NovaRED Substrate (Vector Laboratories Inc). The slides were counterstained with haematoxylin, dehydrated and cover-slipped. Positivity was demonstrated as brown cytoplasmic or plasmatic membrane staining. Normal skin and lymph node of dogs were used as positive control. For negative controls, the antibody diluent was applied instead of the primary antibodies.

© 2016 ESVD and ACVD, Veterinary Dermatology

## Cutaneous wound healing in turtles

**Table 1.** Antibodies and procedures used for the immunohistochemical study of cutaneous wounds in red-eared slider turtles

Antibody	Clone	Specificity	Pretreatment	Dilution	Incubation
Cytokeratins*	AE1/AE3	Keratins subfamily A and B/simple and stratified epithelium	Pronase <sup>†</sup>	1:100	Overnight
Anti-Human Von Willebrand Factor (Factor VIII)*	Polyclonal	Endothelial cells, megakaryocytes and platelets	Microwave <sup>‡</sup>	1:100	3 h at room temperature
Myeloid/ Histiocyte Antigen* CD 3 <sup>§</sup>	MAC 387	Monocytes and granulocytes	Pronase	1:100	3 h at room temperature
NCL-MSA <sup>¶</sup>	LN 10	Lymphocytes	Pronase	1:200	Overnight
	HHF 35	Smooth muscle	Pronase	1:200	Overnight

\*Dako; Glostrup, Denmark A/S

<sup>†</sup>Incubation in pronase 0.75% in PBS for 10 min at room temperature.<sup>‡</sup>Incubation in citric acid 0.01 mol/L, pH 6 in a microwave oven (650 W) for 2 min, and then at low setting (150 W) for 5 min.<sup>¶</sup>Leica Biosystems; Milton Keynes, UK.**Morphometric analysis**

For the morphometric analysis, three nonsequential sections (H&E stained) from each of the three wound biopsies taken at 2, 7, 14, 28, 42 and 60 dpw were used. At 21 dpw no morphometric evaluation was made because changes were not significant compared to samples from 14 dpw. Likewise at the end of the study (135 dpw), the morphometric analysis was considered irrelevant because the reparative tissue was composed basically of fibroblasts. From each section, three high magnification fields (HMF) at the lateral and bed wound edges were photographed; for each control point, inflammatory cells (heterophils, macrophages, lymphocytes and fibroblasts) were scored by two observers. The presence of bacterial colonies in the crust was recorded. The scores were averaged and any discrepancy higher than 2–3 cells was re-evaluated by the two observers at a consensus meeting. The morphometric analysis was performed with the program Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics; Silver Spring, MD, USA).

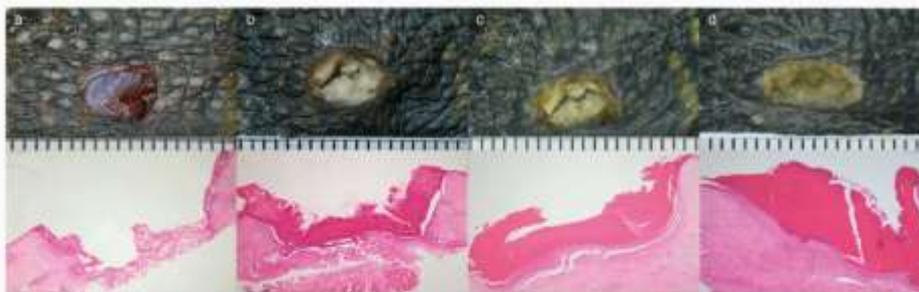
**Statistical analyses**

The distribution of the variable in all data columns was analysed by the Kolmogorov-Smirnov test. Because cell counts were not normally distributed, the nonparametric Kruskal-Wallis test and the Dunn's post-test for multiple comparisons were used to compare the number of heterophils, macrophages, lymphocytes and fibroblasts at each control point. A value of  $P < 0.05$  was considered significant. The Grubbs' test was used to detect significant outliers. Statistical calculations were performed using the Prism 5.04 software for windows (GraphPad Software Inc; San Diego, CA, USA).

**Results****Evaluation of clinical wound healing**

The behaviour and general physical condition of the animals were not affected by the wounds or any other procedure of the experimental design. The biopsy method of full-thickness punch wounds produced well-delimited circular wounds exposing the subcutaneous tissue and the superficial skeletal muscle. This method was selected to describe acute second intention skin healing in turtles because the model is minimally invasive, technically straightforward, reproducible, easy to follow-up over time and has been used previously in different species including reptiles.<sup>9,20,21</sup> Clinically, the main variable assessed was the rate of wound contraction because this is a numerical variable suitable to evaluate treatment efficacy and, because it changes more rapidly during the first weeks of cicatrization, allows for shorter therapeutic trials.

Immediately after wounding, the areas were covered gradually with serous or serous-haemorrhagic fluid; haemorrhages were rare (Figure 1a). At 7 dpw the crusts were thin and translucent and did not fill the skin defect, so that the wound edges looked steep. When the wound bed was already covered, the material forming the crust



**Figure 1.** (a–d) Gross (upper panels) and microscopic (lower panels) sequence of skin healing in red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). Clinical photographs illustrating the same wound from days 0 to 28 (internal scale in millimetres): (a) clinical aspect of the wound after performing the biopsy; (b) at 7 days post wounding (dpw) the crust is white, thin and with an irregular surface; (c) at 21 dpw wound retraction is more accentuated and the crust looks darker and with a less irregular surface but remains friable and fragile; (d) at 28 dpw wound size is unchanged or even increased and the crust looks more humid and darker. Microscopic appearance: low-magnification histological photographs correspond to time-matched wounds of different turtles: (a) at 2 dpw an incipient crust is covering the wound edges; (b) at 7 dpw, a serous-cellular crust covers the wound; re-epithelialization is partial; (c) and (d) at 21 and 28 dpw (respectively) large crusts persist over the new epidermis. Haematoxylin and eosin.

Negrini et al.

was depressed at the centre and fragile with wide transversal fissures. These crusts were whitish, especially at their centres but still hyperaemic closer to the wound edges. Crusts looked humid with a friable and irregular surface (Figure 1b). In several wounds the crusts were drier, with a smoother surface, and were darker and reddish due to the haemorrhage post biopsy.

At 14 dpw, all wounds were covered by complete crusts with variable appearance. Some of the crusts were dark yellow, drier, with a regular surface and well adhered to the wound edges. However, in most wounds, crusts were whitish, humid, with a friable oedematous texture; the surface was irregular and had a central fissure. In general, crusts were thicker than 7 days before and were progressively filling up the wound bed.

At 21 dpw, wound healing had progressed slowly without significant changes compared with the previous week. All wounds remained covered by crusts that were thicker and lighter in colour. The adherence and consistency of the crusts remained the same but had a more irregular surface and still looked friable and thin, and showed wide fissures that exposed the wound bed. Most crusts had turned to a light yellow colour (Figure 1c).

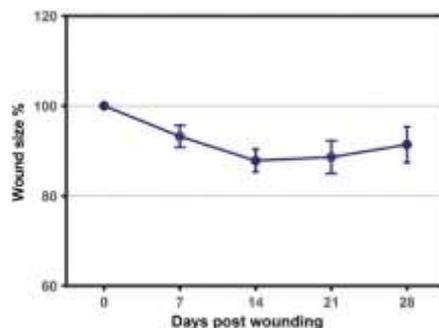
At 28 dpw, all crusts displayed more homogeneous features than in the previous time controls. In general, crust surfaces were now more irregular, with a mucoid texture and their colour had converted to a light yellow. Most crusts were now level with the wound edges and they looked less firm and thick (Figure 1d).

Wound contraction was slow and very heterogeneous among animals; whereas some wounds had a size equivalent to 68.76% of baseline after a week, in others size had increased to 116.4% compared to the initial wound. At 28 dpw the average size of the wounds was only slightly lower than the initial, with a mean wound size of 91.41% baseline (Figure 2). This value represented a mean wound reduction after 28 days of just 8.59%. In spite of this slow wound contraction, wound healing progressed evenly in all animals. Time to crust peeling off was variable, but in all animals it took more than 6 weeks, revealing a variable, depigmented but normal epithelium with a reduced dermal thickness.

### Microscopic findings

#### Normal skin features

A total of 48 initial biopsies from groups 1 and 2 were evaluated histologically to describe healthy skin and to be used as internal controls. All samples were characterized



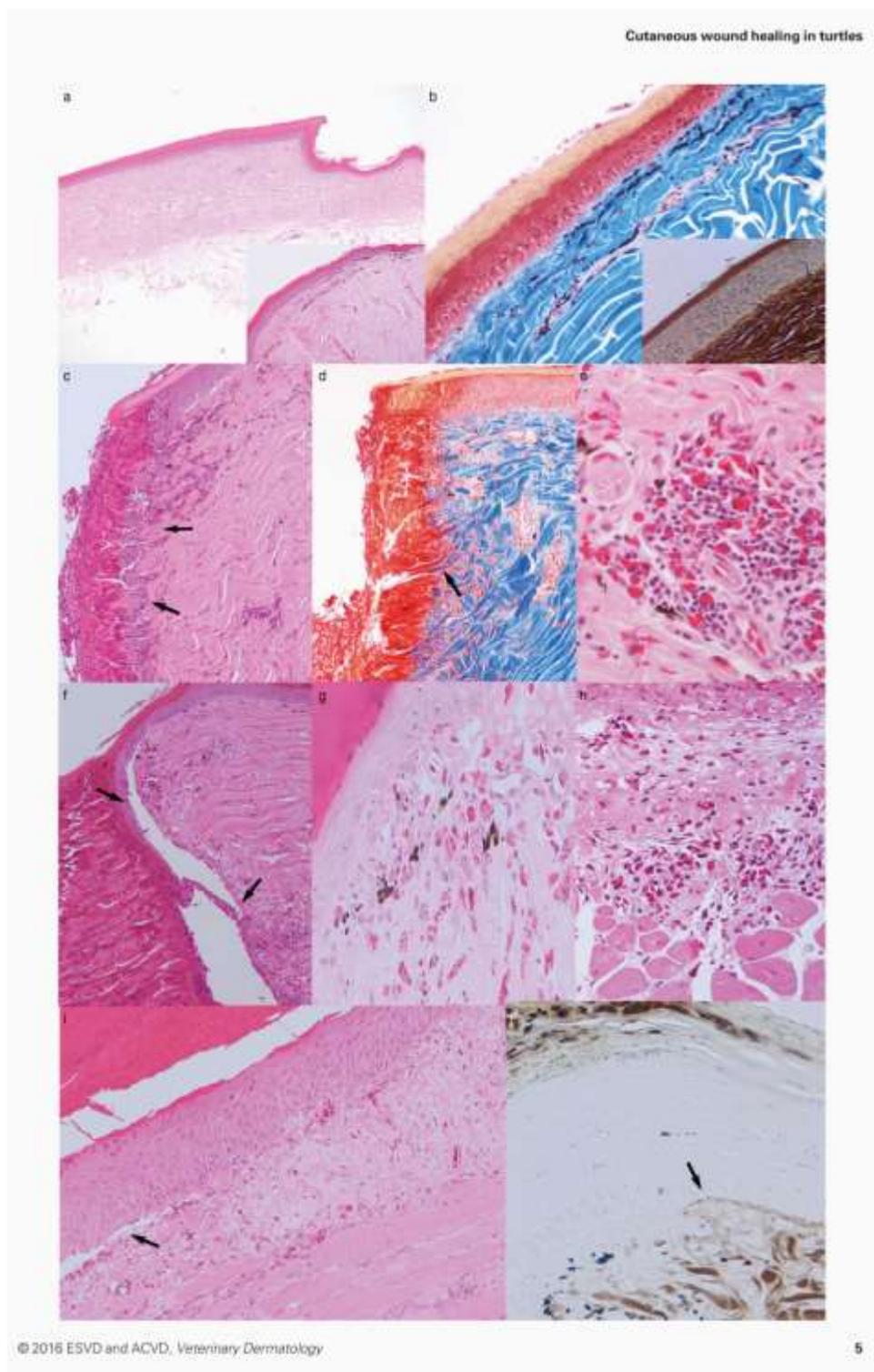
**Figure 2.** Weekly mean wound size expressed as a percentage of the initial wound circumference. Vertical bars represent standard error of the mean.

by a regular, moderately thick epidermis set over a thin dermis (Figure 3a,b); the subcutis was very scant and the biopsies easily included the outer muscle fibres. The dermo-epidermal junction was smooth and the BMZ ran parallel to the skin surface. The epidermis consisted of about 12–25 cellular layers differentiated into three strata: stratum germinativum (one layer), stratum spinosum or suprabasal (4–10 layers) and stratum corneum (8–16 layers). The dermis was very poor in cells and was composed mainly of regular thick collagen bands arranged parallel to the epidermal surface and embedded in scant ground substance. Fibroblasts were scarce and scattered throughout the collagen bands; when present, low numbers of mononuclear, lymphoid and histiocytic cells were observed. Melanocytes were variable in number according to the turtles' pigmentation pattern and regularly located in the outer dermis, around dermal vessels as well as within the basal layer of the epidermis. The dermo-epidermal union was defined by an inconspicuous BMZ when stained with H&E; however, it was visible as a faint homogeneous or fibrillar acidophilic band using PAS, and a brown to black band using methenamine silver stain (Figure 3b, inset). A delicate, often inconspicuous, network of capillaries and small arterioles was disposed in the outer and inner dermis parallel to the epidermis (Figure 3a,b); the lymphatic network also appeared as a delicate network of thin vessels of wide and irregular lumens arranged close to the blood network; the subcutis was thin and composed of scarce fibrocytes and collagen fibres.

**Figure 3.** (a–j) Control and wound healing of red-eared slider turtles *Trachemys scripta elegans*. Control skin: (a) The epidermis invagination into the dermis produces the gross scale effect. Inset: High magnification view; the dermo-epidermal junction is smooth and dermis is poor in cells and devoid of glands. Haematoxylin and eosin (H&E). (b) Detail of epidermal strata and dermal collagen bands disposed parallel to the surface. Mason's trichrome stain. Inset: Detail of dermo-epidermal junction; a thin, brownish basal membrane runs between the basal keratinocytes and the dermis. Methenamine silver staining; Gomori-PAMS stain. Wound at 2 days post wounding (dpw): (c) The wound edges are demarcated by a thin palisade of serous-fibrous, erythrocytes and cellular exudate (arrow). H&E. (d) The free end of the collagen bands appears as acidophilic strips embedded in the incipient crust (arrow). Mason's trichrome. (e) Perivascular heterophilic cuff with some small lymphocytes. H&E. Wound at 7 dpw: (f) A new epidermis is covering the lateral edge of the wound, but is partially detached from the dermis (arrow). H&E. (g) Detail of the basement membrane zone (BMZ) showing numerous heterophils between the epidermis and the granulomatous tissue. H&E. (h) The wound bed is infiltrated by abundant plasma and cellular exudate. H&E. Wound at 21 dpw: (i) New epidermis has all strata differentiated but detachments from the dermis are present (arrow). H&E. (j) Detail of the upper edge of the wound. Note that the BMZ appears as a thin and poorly stained band compared with the marginal zone (arrow). Methenamine silver staining; Gomori-PAMS.

4

© 2016 ESVD and ACVD, *Veterinary Dermatology*



Negrini *et al.**Wound healing histological features*

At 2 dpw, the three wounds sampled showed the surface covered by a thin layer of exudate composed of plasma, fibrin, numerous intact or degenerated heterophils, erythrocytes and some cell debris (Figure 3c). At the wound edge, the free ends of collagen fibres were degenerated and infiltrated by mild fibrinous exudate, abundant heterophils, often degranulated and occasional macrophages that defined a thin wound margin (Figure 3d). At the perilesional dermis and subcutis, the main morphological changes were moderate acute hyperaemia, discrete interstitial oedema and prominent perivascular heterophil cuffs with a scarce or moderate number of small lymphocytes (Figure 3e). The basal keratinocytes located at the edges of the epidermis showed discrete proliferative changes but true re-epithelialization was not appreciated at this time point and the BMZ appeared neatly cut into the edge (Figure 3c,d).

At 7 dpw, the three wounds showed the surface covered by a serous-cellular crust composed of a dense acidophilic, proteinaceous exudate of plasma and fibrin with numerous intact or degenerated heterophils, erythrocytes and cell debris. Degenerated fragments of collagen bundles appeared embedded at the lateral aspects of the crusts. A variable number of coccus-like bacterial colonies were present within the crusts but not within the dermis. A new epidermis with a characteristic wedge shape (basal and suprabasal strata, 2–10 layers thick) covered the outer half of the lateral wound edges under the crusts (Figures 3f and 5b), but the wound bed remained with no epithelium and occupied by abundant inflammatory exudate composed of plasma, numerous heterophils, some macrophages and few fibroblasts or angioblasts cells (Figure 3h). The BMZ was poorly defined and consisted of a thin and intermittent band; detachments of the new epidermis were observed in two of the three wounds (Figure 3f). The wound edges were infiltrated by abundant plasma, heterophils, macrophages and few lymphocytes. Plasma cells were very scarce. At this time, the inflammatory infiltrate in the wound bed was similar but much more abundant than those of the wound sides (Figure 3h). Interestingly, we often observed heterophils located just beneath the basal keratinocytes of the new epidermis where the BMZ was forming and active fibroblasts were closely located (Figure 3g).

At 14 dpw, the wound surface was still covered by a crust similar to that at 7 dpw. Keratinocyte proliferation was most advanced and re-epithelialization was completed in two wounds, but in one biopsy the wound bed persisted uncovered. The new epidermis was thicker (8–12 layers) and the basal and spinous strata were better differentiated, but the corneum stratum was inconspicuous especially at the wound bed. At this time, the BMZ was observed as a poorly stained band with methenamine silver technique; the BMZ was more regular in the outer lateral edges than in the wound bed, but in two samples the epidermis became detached from the dermis in deep zones. As at 7 dpw, many heterophils were located just beneath the basal keratinocytes of the new epidermis where the BMZ was forming. The granulation tissue had a variable number of heterophils, macrophages and fibroblasts; angioblasts and vascular buds were

observed throughout the wound edges but were most abundant at the wound bed. Lymphocytic infiltrate was most abundant at the perilesional dermis with a predominating perivascular pattern.

At 21 dpw, the wound surface was covered by a crust with abundant cell debris. Re-epithelialization was completed but the new epidermis showed variable hyperplasia among turtles. The basal membrane was more complete but still weak especially at the outer edges (Figure 3i,j). Proliferation of dermal melanocytes was observed.

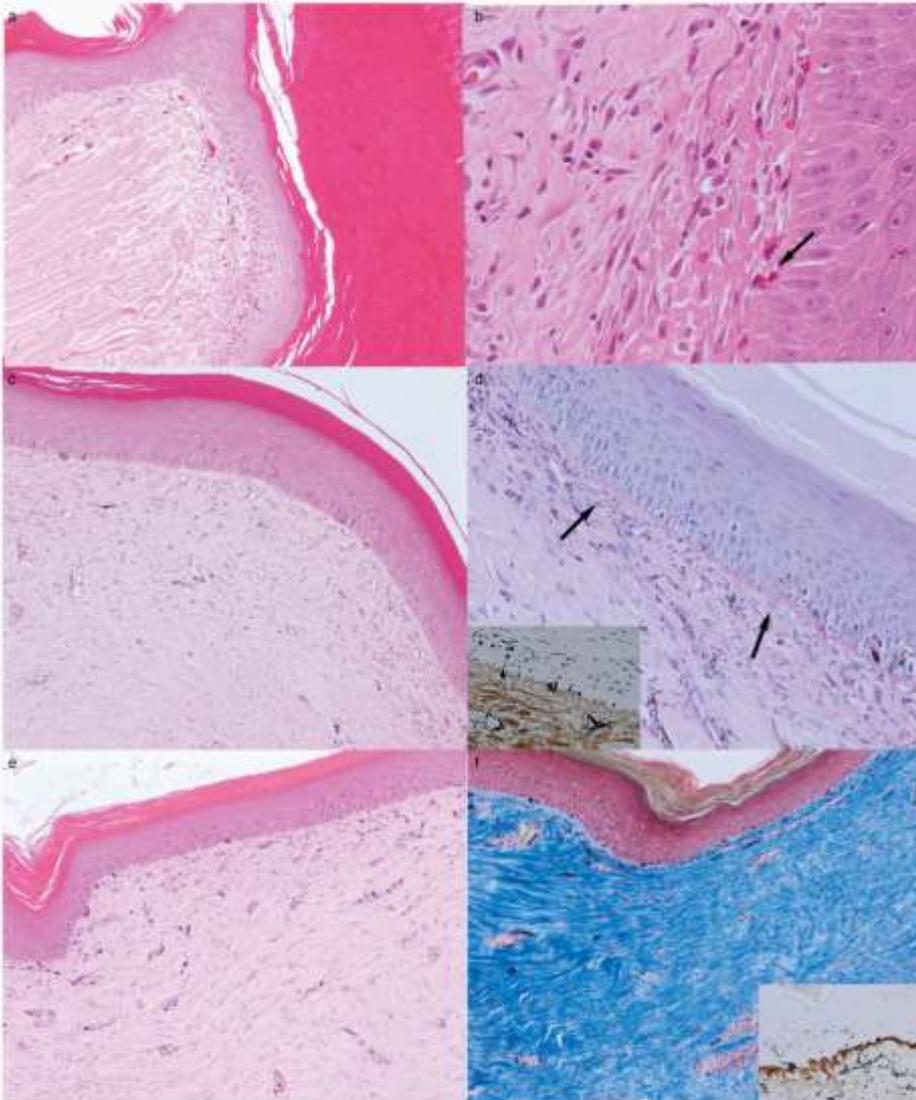
At 28 dpw, the wound surface was still covered by dense crusts composed mainly of cellular debris. Bacterial colonies were also observed throughout the crust. At this time, the new epidermis (more than 15 layers thick) showed all the strata defined and mild to moderate focal hyperplasia (Figure 4a). The granulation tissue was abundant throughout the wound and was composed of numerous active fibroblasts, angioblasts, macrophages and scarce heterophils. A variable quantity of collagen fibres, haphazardly synthesized and arranged (represented the main feature of reparation in the wound area). In one sample, the granulation tissue was more immature showing similar characteristics to samples at 21 dpw (Figure 4b); in the lateral edges of the wound the collagen bands were often but not always arranged parallel to the epidermis; in the wound bed the organization was less evident. Repigmentation was minimal and progressed from the lateral edges.

At 42 dpw, the crust was not observed over the epidermis that appeared mildly hyperplastic but with well-defined strata like normal epidermis. Under the epidermis, the granulation tissue appeared with abundant fibroblasts and collagen fibres, and occasional foci of macrophages and lymphocytes. Remodelling of the new connective tissue was moderate and progressed from the lateral edges of the wound bed (Figure 3d). At this time, focal infiltrates of active fibroblasts, lymphocytes and vascular buds were still present at the wound bed, confirming that total healing had not been achieved. Repigmentation progressed clearly in a centripetal way, both in the epidermis and dermis.

At 60 dpw, the epidermis was morphologically normal (Figure 4c,d) or moderately hyperplastic. The dermis was occupied by mostly remodelled connective tissue. The number of fibroblasts had decreased in relation to the previous time point and the collagen fibres were frequently arranged parallel to the epidermis; nonetheless, the regenerated tissue could be distinguished from the adjacent normal dermis. Few numbers of mononuclear cells and mature vascular vessels were still present. The BMZ was well defined and morphologically showed a fibrillar regular pattern like the control skin (Figure 4d, inset).

At 135 dpw, the epidermis showed all strata well defined and the BMZ was morphologically normal (Figure 4e,f, inset, respectively). The main change from 60 dpw was the advanced remodelling of the new connective tissue. The collagen bundles were thicker than in previous stages, like normal skin, but not yet identical (Figure 4f).

## Cutaneous wound healing in turtles



**Figure 4.** (a-f) Wound healing in *Trachemys scripta elegans*. Wound at 28 days post wounding (dpw): (a) Lateral wound edge. The new epidermis shows similar differentiation to the adjacent normal epidermis and a persistent crust is observed. Haematoxylin and eosin (H&E). (b) Detail of dermo-epidermal union showing many fibroblasts parallel to the epidermis and heterophils at the basement membrane zone (BMZ) (arrow). H&E. Wound at 60 dpw: (c) The epidermis is morphologically normal to hyperplastic. H&E. (d) A remodelled connective tissue and the collagen fibres are frequently arranged parallel to the epidermis. Period acid Schiff. Inset: The BMZ is well defined and morphologically shows a fibrillar regular pattern (arrows) PAS. Inset: methenamine silver staining: Gomori PAMSI. Wound at 135 dpw: (e and f) The epidermis is completely normal with all strata well defined. The collagen bundles are thicker than in previous stages and remodelling is most advanced, like normal skin. H&E and Masson's trichrome, respectively. Inset: Methenamine silver staining: Gomori PAMSI.

#### Immunohistochemical results

Antibodies AE1/AE3, Factor VIII, MAC 387, CD3 and NCL-MSA showed the same cross-reactivity in turtles

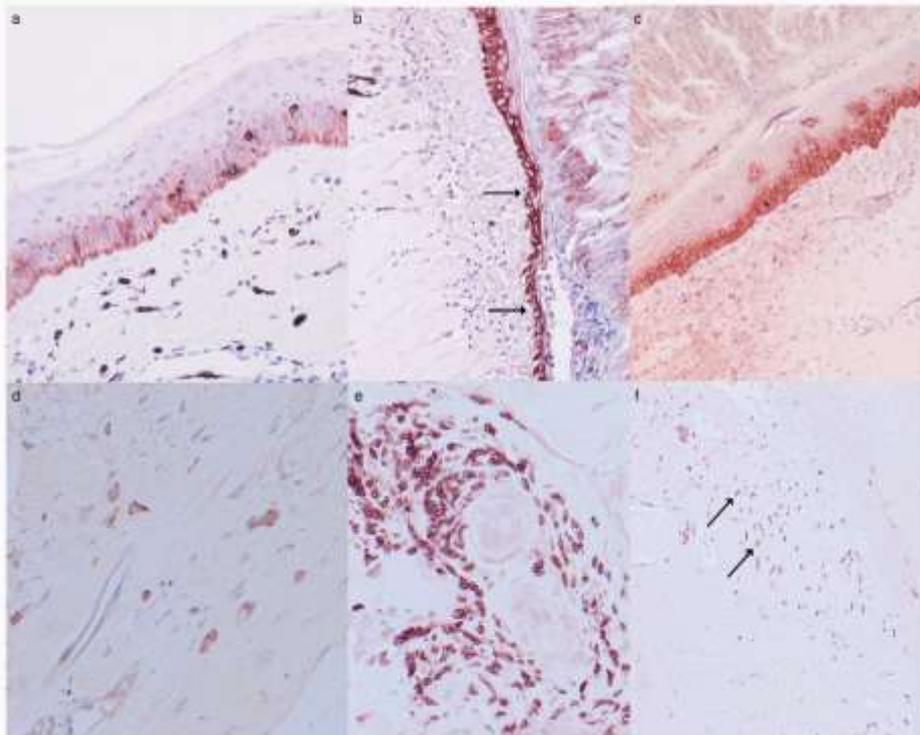
as in the equivalent dog or human cells. Pankeratins AE1/AE3 showed a diffuse, moderate to strong, cytoplasmic reaction with the basal and suprabasal

Negrini et al.

keratinocytes both in normal and re-epithelialized epidermis (Figure 5a,b,c); the corneum stratum did not stain. Factor VIII showed a granular or diffuse, moderate or weak cytoplasmic immunostaining of endothelial cells and some fusiform cells of the granulation tissue (Figure 5d); moderate reaction was observed in the erythrocyte membrane. MAC 387 showed moderate-to-strong diffuse cytoplasmic immunoreactivity with numerous macrophages of the inflammatory exudate (Figure 5e); some fusiform cells (fibroblasts) and endothelial cells of the granulation tissue also reacted with this Ab. CD3 showed an intense-to-moderate membranous staining reaction with numerous small lymphocytes in the inflammatory exudate (Figure 5f). With NCL-MSA Ab, granular moderate or weak cytoplasmic immunostaining on fusiform cells (such as angioblasts or fibroblasts) and endothelial cells was observed.

#### Morphometric analysis

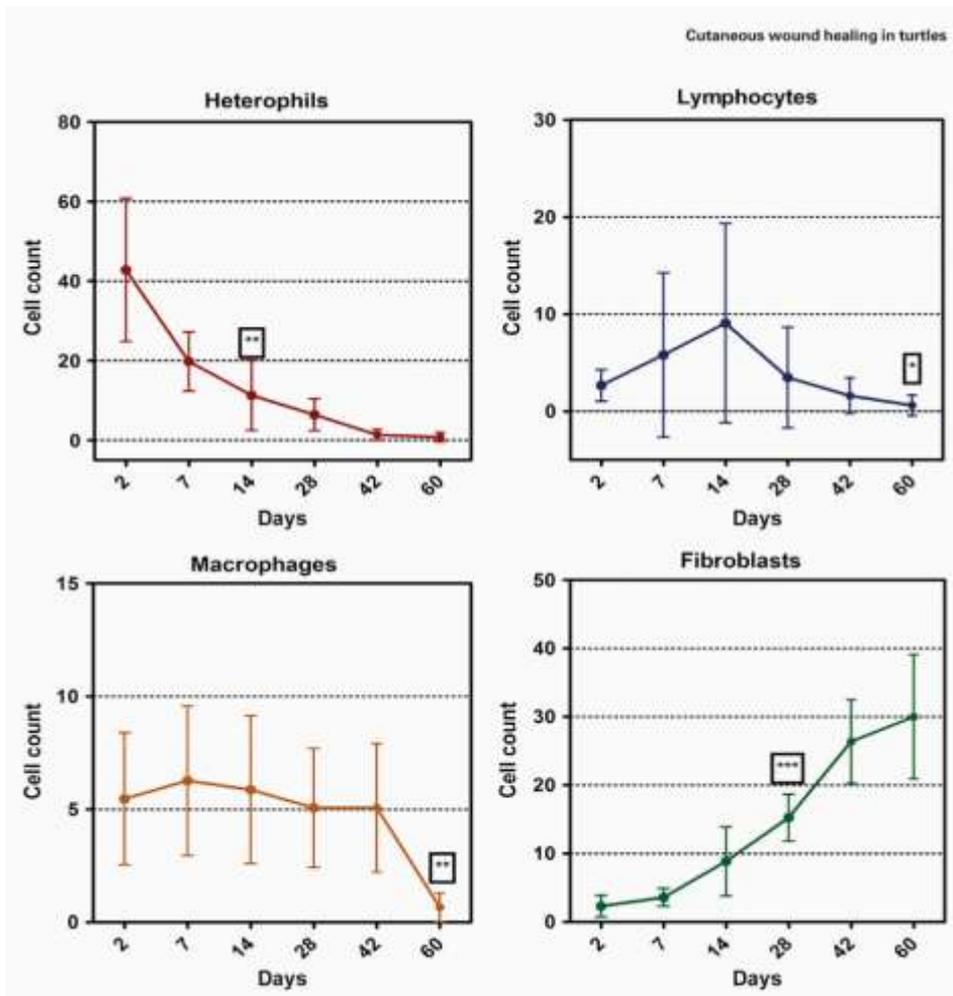
The evolution of the inflammatory cell subpopulations from days 2 to 60 did not follow an even trajectory in all cell types (Figure 6). The number of heterophils reached its highest mean value,  $42.8 \pm 17.99$  cells/HMF (mean  $\pm$  SD), at 2 dpw and decreased steadily along the following control times with a statistically significant reduction ( $P < 0.01$ ) at 14 dpw ( $11.27 \pm 8.81$  cells/HMF). Differences among animals, especially at 2 dpw, were marked, as denoted by the high standard deviation. In contrast with the heterophil curve, the mean number of lymphocytes was lower at 2 dpw and peaked at 14 dpw ( $9.06 \pm 10.27$ ). Data dispersion was very high and differences from 2 dpw became statistically significant at 60 dpw ( $P < 0.05$ ). The cell counts of macrophages were very stable from 2 dpw ( $5.47 \pm 2.92$  cells/HMF) until 42 dpw ( $5.06 \pm 2.84$  cells/HMF), and mean counts drew a flat curve. In a similar way to lymphocyte



**Figure 5.** (a-f) Wound healing of *Trachemys scripta elegans*: Immunohistochemical results (a) AE1/AE3 expression in control skin: intense and diffuse cytoplasmic immunostaining of basal and suprabasal keratinocytes. Reactivity progressively decreases towards the surface. (b) Healing at 7 days post-wounding (dpw): AE1/AE3 reacted strongly with the regenerate keratinocytes at the lateral wound-edge (arrows). (c) Healing at 28 dpw: AE1/AE3 immunoreaction of basal and suprabasal keratinocytes. (d) Granulation tissue: Expression of Von Willebrand factor: diffuse or granular cytoplasmic reaction is observed in numerous endothelial and fibroblasts-angioblasts cells. (e) Perivascular infiltrate: Expression of CD3: strong membrane cytoplasmic immunoreaction in the majority of lymphocytes. (f) Wound bed: Expression of MAC 387: numerous large mononuclear cells, macrophage type, show an intense diffuse reaction throughout the granulation tissue (arrows). ABC method. Haematoxylin counterstaining.

8

© 2016 ESVD and ACVD, Veterinary Dermatology



**Figure 6.** Mean counts of inflammatory cells at each time point from 2 to 60 days post wounding (dpw). Vertical bars represent standard deviation. Statistically significant differences from 2 dpw: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  (Kruskal-Wallis test with Dunn's Multiple Comparison Test).

counts, differences from 2 dpw became statistically significant by 60 dpw ( $P < 0.001$ ). Finally, the number of fibroblasts increased slowly from 2 dpw ( $2.33 \pm 1.58$  cells/HMF) to 60 dpw ( $30.0 \pm 9.08$  cells/HMF), and differences were statistically significant at 28 dpw ( $P < 0.001$ ).

## Discussion

The current study demonstrates that cutaneous second intention wound healing in *Trachemys scripta elegans* exposed to uncontrolled daily variations in ambient temperature and free access to water, progressed slowly and with an indolent behaviour. Although basic mechanisms are essentially equivalent to those described in mammals, birds and some reptile species, there were significant

clinical and histopathological differences. Specifically, wound contraction was limited; the crust persisted at least until 28 dpw, in spite of the finding that re-epithelialization was histologically complete from 14 dpw in many animals. Also, active inflammation extended up to 28 dpw (or beyond) and connective tissue restoration and remodelling was achieved from 42 to 135 dpw.

Clinically, cutaneous wound contraction in turtles was limited and nonsignificant. At 28 dpw the mean wound contraction was less than 10% of the original wound. As has been described in snakes, turtles formed a persistent dried crust over the wound bed and healing was characterized by epithelialization under the crust that decreased in thickness as the dermis filled the skin defect.<sup>5</sup> This result was correlated with the microscopic findings discussed later on. Skin wounds decreased in size during

Negrini et al.

the first 3 weeks (T1, T2 and T3 measurements), but from these time points onwards, wounds increased in size and most wounds still had a surface crust 6 weeks after wound creation. Healing of cutaneous circular wounds in snakes followed a similar pattern, because in all animals the shape of wounds did not decrease and this finding was not affected by ambient temperature.<sup>22</sup> Contrary to what has been described in bearded dragons, crusts in turtles did not prevent visualization of the wound edges and there was no need to remove the crusts to measure the wound perimeter.<sup>15</sup> So the skin biopsy punch model was considered an appropriate mean of assessing wound contraction without interfering with wound healing. Because of this reduced wound contraction, the wound size was recorded only during the first 4 weeks when differences were more easily seen. Thereafter, wound contraction was even slower and this initial period of 4 weeks is considered long enough to assess the effects that any therapeutic intervention might have on wound healing.

In mammals, cutaneous wound contraction occurs primarily due to the proliferation of the granulation tissue from the wound edges toward the centre.<sup>8,23</sup> This motion is probably centred in the granulation tissue. Its effectiveness in mammals is the result of the large areas of mobile skin and well-developed cutaneous muscles. In turtles, the lack of wound contraction resembles observations in lizards which, as in turtles, do not develop a continuous bed of granulation tissue, have less mobile skin and lack cutaneous muscles.<sup>15,24</sup> However, this slow process of wound contraction seemed to be greater in turtles than in other species of reptiles. This finding could be related to exposure of animals to variations in ambient temperatures, although in the present study temperatures were always within the range of physiological activity of *Trachemys scripta elegans*.<sup>16</sup> Bearded dragons with similar cutaneous wounds demonstrated 50% closure after 17 days; whereas tree lizards (*Urosaurus ornatus*) healthy males, maintained at 27°C and receiving a 3.5 mm punch biopsy, took a mean of 14.35 days to heal and the wound size was almost zero after 20 days.<sup>19,20</sup> This rate of wound closure reported in lizards is faster than that observed in mammals. When 4 mm punch biopsies were used as a model of acute skin healing in healthy human volunteers the average time to achieve 100% closure was 29.75 days.<sup>21</sup>

Total wound healing is considered to be the sum of contraction and epithelialization.<sup>14</sup> The scant wound contraction found in turtles could contribute to longer cicatrization times compared with other reptiles, but apart from differences between species, other factors may have contributed to delayed wound healing in our study. Previous reports about wound healing in reptiles maintained the animals in a restricted habitat with fixed temperatures, whereas in our study animals were housed in outdoor facilities to reproduce real living conditions for turtles, as pets or in the wild. Accordingly, the turtles were exposed to daily variations in temperature and humidity, had free access to water and sunbathing. In snakes, healing of skin wounds could be accelerated by holding the reptiles at the upper end of their temperature range.<sup>22</sup> Lower night temperatures may have contributed to

slower wound healing. Also, other potential complications such as bacterial infection, interaction with other individuals and exposure to water could have negatively influenced the cicatrization process. Indeed, bacterial colonies were found microscopically in some of the second biopsies collected from Group 2, thus stressing the need for the use of antiseptics. Also, exposure to water could have influenced the gross features of the surface crusts because, at the last control on 28 dpw, all crusts became more humid and had a mucoid texture. One explanation is that animals spent more time in the water at the end of the experiment because the weather was warmer. This long healing time and exposure to potential complications justify the search for practical treatments to speed up and improve the cicatrization of skin wounds in turtles.

Our results showed that second intention wound healing followed the same tissue response pattern described in others species but with relevant differences. First, was the enormous overlap of the inflammatory and proliferative events, which became highly chronic (some wounds waxed and waned during healing at least until 6 weeks post wounding). Second, the granulation tissue was scarce or moderate at the lateral edges and moderate-to-abundant at the wound bed.<sup>5,8,13,14</sup> this finding is contrary to previous studies in snakes that described wound healing from the lateral edges. Third, the BMZ is morphologically immature during many weeks (60 dpw) which coincides with the fragility of the dermo-epidermal union observed in this study.<sup>5</sup>

Regarding re-epithelialization, the present study showed similar results to previous studies, in which re-epithelialization was complete by 14 dpw, although total layer differentiation, regarding epidermis thickness and strata differentiation, was not evident before 28 or 42 dpw.<sup>5,8</sup> The migration of keratinocytes seemed to take place across an acidophilic matrix formed by plasma and fibrin exudate, and probably other proteins produced by fibroblasts. Interestingly, during re-epithelialization, we also observed many heterophils closely located between keratinocytes and the fibroblasts disposed parallel to the surface, suggesting their participation in the process of BMZ production.<sup>8</sup> Immunostaining with AE1/AE3 Ab highlighted the morphological features of epidermal regeneration in wound healing.

During the experiment, the BMZ appeared poorly defined using silver and PAS stains up to 28 dpw; it was most mature or morphologically normal at 60 and 135 dpw. These features could justify the easy detachment of the regenerated epidermis from the subjacent dermis at 7, 14, 21 and also 28 dpw. The persistence of active granulation tissue in the wound edges could be related to the slow BMZ maturation; the sub-basal lamina fibrous zone depends on type VII collagen produced by a population of fibroblasts closely juxtaposed to basal keratinocytes. To the best of the author's knowledge, although the BMZ represents a critical structure between the mature epidermis and dermis, it is either poorly or not documented as present during wound healing.<sup>5,8,9,13,14,24,25</sup> Further studies are necessary to better characterize this complex structure in reptile skin and its role in anchoring the epidermis to the dermis during the healing process.

## Cutaneous wound healing in turtles

Concerning the inflammatory response and connective tissue proliferation, the main cells of the inflammatory response were assessed quantitatively during the cicatrization process. Our data showed that their dynamics reproduced the classic pattern of sequential cell migration reported in humans, but with longer time spans.<sup>8,9</sup> In human second intention wound healing, cell counts for neutrophils, macrophages and lymphocytes reach their maximum after approximately 2, 3 and 5 days, respectively.<sup>26</sup> By contrast, the same temporal sequence normally occurs in turtles later; heterophils, macrophages and lymphocytes peaked after 2, 7 and 14 dpw. Another relevant difference when comparing second intention wound healing in humans and in turtles was that heterophils and not macrophages were the predominant cells. In humans, macrophages play a critical role in wound healing and, more specifically, in second intention wounds. These cells constitute the predominant population before fibroblast migration and replication, and the granulation tissue they form plays a key role in wound contraction, a major component of second intention wound healing.<sup>26</sup>

Histologically we have found differences between this study and others. Heterophils were the main early cells of the inflammatory exudate; they persisted in the wound until later stages, in keeping with previous studies.<sup>5,6</sup> The role of heterophils in reptilian wound healing is poorly understood. In American alligators, it has been considered that they play a similar role to that of polymorphonuclear leucocytes in mammals, providing a local barrier against bacterial invasion rather than actively influencing the progress of repair.<sup>27,28</sup> Our results show that the heterophils were not only the most prevalent inflammatory cells, but also the closest to the dermo-epidermal union during the re-epithelialization process, which suggests that they could play an important role in restoring the BMZ (perhaps in clearing serous-fibrinous exudate and cell debris from the anchoring zone). Neutrophils and macrophages contribute to the proliferation and migration of other inflammatory and mesenchymal cells via cytokines and growth factor release.<sup>8</sup>

Monocytes/macrophages were present from early stages until 42 dpw in similar numbers; they progressively decreased until 60 dpw. The association of macrophages with areas of abundant fibrinous exudate and cell debris confirms their role as phagocytes as in mammals and snakes, playing an important part in wound debridement and fibroplasia.<sup>5-8,9</sup> In mammals, macrophages tend to peak in number at 48–72 h and remain longer (days to weeks), participating in a more complex way in wound healing.<sup>8</sup> We think that they may play similar roles in reptile wound healing. In the immunohistochemical study, MAC 387 was found to be useful as a histiocytic/macrophage marker to help characterize macrophages in the inflammatory exudate.

Fibroblasts and angioblasts, as the main components of the granulation tissue, were present both in the wound bed and lateral edges; nonetheless, in many samples granulation tissue was most prominent at the wound bed, contrary to what has been described previously in lizards and snakes, but more similar to mammals.<sup>5,8,9,14,15,23,24</sup> Although those studies concluded that the lateral edges play the main role in reptile wound healing, our results

document that the wound bed contributed at least equally to healing. Angioblasts and vascular buds were scarce in the proliferative process. Factor VIII was useful to immunostain endothelial cells of capillaries and some fusiform mesenchymal cells in the granulation tissue.

Lymphocytes were observed as the main cell of the perivascular infiltrate from 7 to 42 or 60 dpw, but they were scarce-to-moderate at the granulation tissue; moreover, the majority of lymphocytes were CD3+ (T lymphocytes). The role of T lymphocytes in wound healing has been widely studied in mammals and indicates a regulatory effect in wound strength and keratinocyte proliferation.<sup>8,9</sup> In reptiles, little is known about their role; one study described that perivascular lymphoid cuffs were briefly present early in the healing process in snakes held at 21 and 30°C. This seems to correspond to the perivascular "basophilic mononuclear cells" described in the inflammatory response of alligators and to the perivascular lymphocytes described in chickens.<sup>27,28</sup> Thrombocytes could not be evaluated. In turtles, they have a similar function to the mammalian platelets, including a role in haemostasis and wound healing. Their action is mainly in the first 24 h post-injury (haemostasis phase), for this reason they were not seen in our histological study.<sup>26,30</sup>

The most important immunohistochemical feature of this study was that there appeared to be cross-reactivity of five antibodies with the equivalent tissue cells of turtles; that allowed us to better characterize re-epithelialization, the inflammatory cells and vascular buds during wound healing. Antibodies AE1/AE3, CD3 and MAC 387 showed excellent immunostaining with keratinocytes of the basal and spinous layers, T lymphocytes and macrophages, respectively. In a previous study, the keratinocyte marker AE3 showed cross-reactivity in lizard and turtle skins.<sup>1</sup> To the best of our knowledge, the AE1/AE3 keratinocyte marker and the rest of the antibodies used in this study have not been tested before.<sup>1</sup> The present analysis demonstrated the usefulness of these cellular markers for the morphological study of wound healing and that they could be a potential tool for further studies not only in wound healing, but also to better characterize histopathological lesions in turtles.

Because of its duration, the present study tried to address skin healing under the normal environmental conditions encountered by the turtles, but this approach introduced several limitations. Animals were exposed to uncontrolled temperatures, had free access to water and the durations of time that the turtles spent immersed were not recorded. Although the study was carried out in spring, when the turtles are more active metabolically, the variations in temperature and the exposure to water may have extended the cicatrization process because reptile healing is highly dependent on temperature. These differences are important when comparing our results with previous available reports that have used terrestrial reptile species maintained at controlled temperatures. Local anaesthetics and nonsteroidal anti-inflammatory drugs were not administered for fear that they could interfere with the inflammatory reaction during healing. Narcotic analgesics could have been used because they are less likely to interfere with wound healing, but, after recovering from the general anaesthesia, animals did not

Negri et al.

exhibit signs of pain or behavioural changes in the subsequent days.

In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first study on the morphological characterization of 6 mm cutaneous biopsy wound healing in turtles, or even in reptiles, exposed to daily variations in ambient temperature and free access to water. Wound healing evolved slowly with an indolent behaviour and there were significant clinical and histopathological differences compared with mammals, birds and other reptile species. Nonetheless, wounds were clinically healed by 42 dpw; accordingly, releasing turtles back to their habitat after biopsy collection would be justified because prognosis for subsequent healing is good. Additional studies of turtle cutaneous wound healing are needed to more accurately define the cellular and molecular mechanisms involved in the complex regulatory system of this physiological process. Also, an investigation of therapeutic interventions to improve wound healing in turtles would be justified. The model presented here may be useful to evaluate wound treatments in the future, allowing meaningful comparisons between different therapies.

### Acknowledgements

The authors thank the Zoological Garden of Córdoba (Spain) for their facilities and all the staff for their support in carrying out this work.

### References

- Alibardi L, Sponzi E, Toni M. Differentiation of the epidermis in turtles: an immunocytochemical, autoradiographic and electrophoretic analysis. *Acta Histochem* 2004; 106: 379-395.
- Norton TM. Chelonians: emergency and critical care. *Semin Avian Exot Pet Med* 2005; 14: 100-130.
- Vella D. Management of freshwater turtle shell injuries. *Lab Anim (NY)* 2009; 38: 13-14.
- Nagashima H, Shibata M, Taniguchi M et al. Comparative study of the shell development of hard- and soft-shelled turtles. *J Anat* 2014; 225: 60-70.
- Smith DA, Barker IK. Healing of cutaneous wound in the common garter snake. *Can J Vet Res* 1988; 52: 111-119.
- Mitchell MA, Diaz-Figueroa A. Wound management in reptiles. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 2004; 7: 123-140.
- McArthur S, Meyer J, Inna C. Anatomy and physiology. In: MacArthur S, Wilkinson R, Meyer J, eds. *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*. Oxford: Blackwell Publishing, 2004; 36-37.
- Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg* 2005; 31: 674-686.
- Schraml S, Seemies RM, Prandt L et al. Wound healing in the 21st century. *J Am Acad Dermatol* 2010; 63: 888-881.
- Reike JM, Song H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res* 2012; 49: 35-43.
- Martson M, Vijaño J, Lappala P et al. Cranio-caudal differences in granulation tissue formation: an experimental study in the rat. *Wound Repair Regen* 1999; 7: 119-126.
- Nayak BS, Ramdeen R, Adogwa A et al. Wound-healing potential of an ethanol extract of *Carica papaya* (Caricaceae) seeds. *Int Wound J* 2012; 9: 650-655.
- Wilmink JM, Van Weeren PR, Stoik PW et al. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. *Equine Vet J* 1999; 31: 61-67.
- Bohling MW, Henderson RA, Swai SF et al. Cutaneous wound healing in the cat: a macroscopic description and comparison

with cutaneous wound healing in the dog. *Vet Surg* 2004; 33: 579-587.

- Keller KA, Paul-Murphy J, Weber S III et al. Assessment of platelet-derived growth factor using a splinted full thickness dermal wound model in bearded dragons (*Pogona vitticeps*). *J Zoo Wildl Med* 2014; 45: 866-874.
- McArthur S, Barrows M. General care of chelonians. In: MacArthur S, Wilkinson R, Meyer J, eds. *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*. Oxford: Blackwell Publishing, 2004; 93-99.
- Jiménez CR, Pérez-Ecija RA, Jover A et al. Immunohistochemical study of normal tissues of lizards. In: *Proceedings of the 14th National Congress of the Spanish Society of Histology and 2nd International Congress of Histology and Tissue Engineering* 2007; S104 (Abstract).
- Negrini J, Ginel PJ, Mazos E et al. Immunohistochemical study of the skin of the turtles and the experimental healing. In: *Proceedings of the 27th Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria*. Barcelona, Spain 2015; 102. Available at: <http://www.uco.es/grupos/seap/2015/actas2015.pdf> [in Spanish]. Accessed Feb 24, 2016.
- Pérez J, Day MJ, Martín NP et al. Immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate associated with feline cutaneous squamous cell carcinomas and precancerous lesions (actinic keratosis). *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 69: 33-45.
- French SS, Matt KS, Moore MC. The effects of stress on wound healing in male tree lizards (*Urosaurus ornatus*). *Gen Comp Endocrinol* 2006; 145: 128-132.
- Horn DB, Linzie BM, Huang TC. The healing effects of autologous platelet gel on acute human skin wounds. *Arch Facial Plast Surg* 2007; 9: 174-183.
- Smith DA, Barker IK, Allen OB. The effect of ambient temperature and type of wound on healing of cutaneous wounds in the common garter snake (*Thamnophis sirtalis*). *Can J Vet Res* 1988; 52: 120-126.
- Swain SF. *Surgery of Traumatized Skin: Management and Reconstruction in the Dog and Cat*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1980; 70-116.
- Madsen PFA, Roth SI. A histological study of the early stages of cutaneous wound healing in lizards: *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Zool* 1972; 180: 175-186.
- Mauldin EA, Peters-Kennedy J. Skin and appendages. In: Maxie MG, ed. *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. Volume 1, 6th edition. St. Louis, MI: Elsevier, 2015; 513-514.
- Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg* 2004; 187: 11S-16S.
- Mateo MR, Roberts ED, Enright FM. Inflammation induced by subcutaneous turpentine inoculation of young American alligators (*Alligator mississippiensis*). *Am J Vet Res* 1984; 45: 1870-1875.
- Simpson DM, Ross R. The neutrophilic leukocyte in wound repair: A study with antineutrophil serum. *J Clin Invest* 1972; 51: 2009-2023.
- Carlson HC, Allen JR. The acute inflammatory reaction in chicken skin: blood cellular response. *Avian Dis* 1970; 14: 817-833.
- Raskin RE. Reptilian complete blood count. In: Fudge AM, ed. *Laboratory Medicine - Avian and Exotic Pets*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 2000; 195-196.

### Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** Maximal and minimum air temperatures registered daily at the turtle premises during the study period, 20 April to 5 August 2013. Data logger was placed 1 m above ground (Digital thermometer MicroLite USB data loggers LITE 5032P, Fourtec-Fourier Technology, USA).

© 2016 ESVd and ACVD, *Veterinary Dermatology*

## Cutaneous wound healing in turtles

**Resumé**

**Contexte** – Les plaies cutanées sont fréquentes chez les chéloniens. Les critères cliniques et histologiques de la cicatrisation des plaies dans ces espèces ne sont pas bien décrites, empêchant l'évaluation de nouveaux traitements.

**Objectifs** – Décrire les critères cliniques et histopathologiques de la cicatrisation des plaies cutanées chez la tortue à oreilles rouges (*Trachemys scripta elegans*).

**Sujets** – Vingt-quatre femelles adultes vivant en extérieur, avec accès libre à l'eau et exposées à des variations de température quotidiennes.

**Méthodes** – Des biopsies punch de 6mm d'épaisseur ont été réalisées dans les membres postérieurs. Les tortues étaient assignées au groupe 1 (n = 12 pour évaluation clinique) et au groupe 2 (n = 12 pour étude microscopique). Le groupe 1 a été photographié à jour 1 et chaque semaine jusqu'à 28 jours après cicatrisation. La rétraction cicatricielle était exprimée par le pourcentage de la réduction du périmètre. Pour le groupe 2, trois plaies cutanées ont été prélevées à jours 2, 7, 14, 21, 28, 42, 60 and 135 après cicatrisation pour étude histopathologique. La méthode de coloration ABC (avidin-biotin-peroxidase) a été utilisée pour évaluer cinq anticorps commerciaux.

**Résultats** – La contraction de plaie était limitée; les croûtes ont persisté au moins 28 jours. La ré-épithélialisation était complète à jour 14 pour la plupart des animaux; une inflammation active a persisté jusqu'à 28 jours; la reconstitution et le remaniement des tissus conjonctifs ont été atteint entre les jours 42 à 135. AE1/AE3, Factor VIII, MAC 387, CD3 et NCL-MSA ont montré une réactivité croisée avec leur équivalent cellulaires dans les tissus de tortues.

**Conclusions et importance clinique** – Une cicatrisation de seconde intention a progressé lentement et de façon indolente. Microscopiquement, il y avait une superposition marquée entre les phases inflammatoires et prolifératives sur une longue période.

**Resumen**

**Introducción** – las heridas cutáneas son comunes en quelonios. Las características clínicas e histológicas de la cicatrización de heridas en estas especies no están bien descritas, lo cual dificulta evaluación de nuevas terapias.

**Objetivos** – describir las características clínicas e histopatológicas de la cicatrización de heridas en la tortuga acuática de orejas rojas (*Trachemys scripta elegans*).

**Animales** – 24 hembras adultas sanas alojadas en el exterior con acceso libre a agua y expuestas diariamente a variaciones de temperatura.

**Métodos** – biopsias de tipo punch del grosor completo de la piel de 6 mm fueron obtenidas de los miembros posteriores. Las tortugas fueron asignadas al grupo uno (n = 12 para evaluación clínica) y grupo dos (n = 12 para estudio microscópico). El grupo uno fue fotografiado en el día uno y semanalmente, hasta los 28 días tras la producción de heridas. La retracción de heridas fue expresada como el porcentaje de la reducción del perímetro. Para el grupo dos, se obtuvieron muestras de tres heridas de la piel en los días dos, 7, 14, 21, 28, 42, 60 y 135 tras la producción de heridas para estudio histológico. La tinción de avidina-biotina-peroxidasa (ABC) fue utilizada para evaluar cinco anticuerpos comerciales.

**Resultados** – la retracción de heridas fue limitada; las costras persistieron al menos durante 28 días. La re-epitelización fue completa en el día 14 en muchos animales; la inflamación activa persistió hasta el día 28; la reconstitución y remodelación del tejido conectivo se obtuvo entre los días 42 a 135. Los anticuerpos a AE1/AE3, Factor VIII, Mac 387, CD3, y NCL-MSA mostraron reactividad cruzada con las correspondientes células equivalentes en los tejidos de tortuga.

**Conclusión e importancia clínica** – la cicatrización por segunda intención progresó lentamente y con un comportamiento indolente. Microscópicamente hubo superposición de las fases inflamatorias y proliferativas durante un largo período de tiempo.

**Zusammenfassung**

**Hintergrund** – Hautwunden kommen bei Chelonia häufig vor. Die klinischen und histologischen Merkmale der Wundheilung bei dieser Spezies sind nicht gut beschrieben und das verhindert die Evaluierung neuer Therapien.

**Ziele** – Die Beschreibung klinischer und histopathologischer Merkmale der kutanen Wundheilung der Rotwangenschmuckschildkröte (*Trachemys scripta elegans*).

**Tiere** – Vierundzwanzig gesunde erwachsene weibliche Tiere, die in Offenstall-Einrichtungen mit freiem Zugang zu Wasser gehalten wurden und die einer täglichen Variation der Temperatur ausgesetzt waren.

**Methoden** – Full-thickness 6mm Hautbiopsie-Wunden wurden an den Hinterbeinen gemacht. Die Schildkröten wurden in Gruppe 1 (n=12 zur klinischen Evaluierung) und Gruppe 2 (n=12 zur mikroskopischen Untersuchung) eingeteilt. Gruppe 1 wurde am Tag 1 und wöchentlich fotografiert, bis zum 28. Tag nach der Verwundung. Die Wundretraktion wurde als Prozentanteil der Reduzierung des Umfangs

Negri et al.

ausgedrückt. Für Gruppe 2 wurden von drei Hautwunden zur histologischen Untersuchung am Tag 2, 7, 14, 21, 28, 42, 60 und 135 nach der Entstehung der Wunden Proben entnommen. Es wurde die Avidin-Biotin-Peroxidase (ABC) Färbetechnik angewendet, um fünf kommerzielle Antikörper zu testen.

**Ergebnisse** – Die Kontraktion der Wunde war limitiert; eine Kruste bestand mindestens 28 Tage lang. Am Tag 14 war die Re-Epithelialisierung bei vielen Tieren komplett; eine aktive Entzündung bestand bis zum 28. Tag; die Restrukturierung und das Remodelling wurde zwischen 42 und 135 Tagen erreicht. AE1/AE3, Faktor VIII, MAC 387, CD3 und NCL-MSA zeigten eine Kreuzreaktivität mit den Counterparts der Zellen im Schildkrötengewebe.

**Schlussfolgerungen und klinische Bedeutung** – Die sekundäre Wundheilung schritt nur langsam voran und zeigte ein indolentes Verhalten. Mikroskopisch bestand über eine lange Zeitphase eine deutliche Überlappung der entzündlichen mit der proliferativen Phase.

#### 要約

**背景** – カメにおいて皮膚の創傷は一時的である。この動物種における創傷治療の臨床的、および組織学的な特徴はよく解明されておらず、それにより新しい治療が評価されずにいる。

**目的** – シシヅミアカミガメ(*Trachemys scripta elegans*)における皮膚創傷治療の臨床的および組織学的な特徴を解明すること。

**供与動物** – 家庭で飼育されており、水へ自由に入ることのできる野外施設で飼育されており、様々な温度環境に日常的にさらされている24頭の健康な成体メス個体。

**方法** – 6mm皮膚生検パンチの厚みの創傷をヒレの後方に作成し、カメをグループ1(臨床的な評価のためのn=12)とグループ2(組織学的な研究のためのn=12)に割り当てた。グループ1は受傷後、1日目および28日目まで毎週写真を撮った。創傷の収縮は外周の減少の割合で示した。グループ2では、組織学的な研究のために受傷後2、7、14、21、28、42、60および135日後に3つの皮膚創傷を採取した。アビジン-ビオチン-ペルオキシド(ABC)染色法を使用して5種類の市販の抗体を評価した。

**結果** – 創傷の収縮は限定的であり、痂皮は最低28日間存在していた。再上皮化は多くの個体で14日までに得られたが、活性化した炎症は28日後まで持続しており、結合組織の再構成およびリモデリングは42-135日までに得られた。AE1/AE3、第VIII因子、MAC 387、CD3およびNCL-MSAはカメの組織における同等の細胞で交叉反応を示した。

**結論および臨床的重要性** – 創傷の二次癒合過程は緩徐で無痛性の早期を示していた。顕微鏡学的に、炎症期間と増殖期間は長期間に渡り、顕著な重複がみられた。

#### 摘要

**背景** – 龟皮肤创伤很常见。这类动物伤口愈合的临床和组织学特征相关资料较少,并且对新疗法缺乏评估。

**目的** – 描述红耳龟(*Trachemys scripta elegans*)皮肤创伤修复过程的临床和组织学特征。

**动物** – 24只健康成年雌性红耳龟,居住在室外设施中,能够自由进入水源,且能够感受每日温度变化。

**方法** – 背部使用活检打孔器进行全层6mm活组织取样。将龟分为第一组(n = 12,进行临床评估)和第二组(n = 12,进行显微镜研究)。第一组,第一天和每周分别进行拍照,直到第28天。以创口周长减少幅度表达创伤的回缩程度。第二组,分别在第2、7、14、21、28、42、60、135天进行三处创伤取样,并进行组织病理学研究。使用抗生物素蛋白-生物素-过氧化生物酶(ABC)染色法评估五种商品化抗体。

**结果** – 创面收缩程度有限;结痂至少附着28天。许多动物在14天内完成上皮再生;活跃的炎症可存在28天;结痂组织重塑需要42-135天。AE1/AE3、因子VIII、MAC 387、CD3 and NCL-MSA显示,龟组织中细胞配对间存在交叉反应。

**总结和临床意义** – 创伤的二期愈合进程较慢,是一种慢性行为。显微镜下观察,长时间处于炎症反应期和增生期。

## Veterinary Research Communications

### Effects of Topical Insulin on Second-Intention Wound Healing in the Red-Eared Slider Turtle (*Trachemys scripta elegans*)

–Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Full Title:	Effects of Topical Insulin on Second-Intention Wound Healing in the Red-Eared Slider Turtle ( <i>Trachemys scripta elegans</i> )
Article Type:	Original Article
Keywords:	Trachemys scripta; Wound healing; Topical insulin; Skin; Reptile
Corresponding Author:	Pedro J Ginel Universidad de Córdoba Córdoba, SPAIN
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidad de Córdoba
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Joao Negrini
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Joao Negrini Elena Mozos Alejandro Escamilla Rosario Lucena Rafael Guerra Pedro J Ginel
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	CAPES Brazil (process 1339/3-3) Prof Joao Negrini
Abstract:	<p>Compared with mammals, wound healing in reptiles is characterized by reduced wound contraction and longer healing times. The aim of this study was to describe the clinical and histopathological effects of topical insulin on second-intention healing of experimentally induced soft skin wounds in <i>Trachemys scripta elegans</i> exposed to daily variations in ambient temperature in an aquatic environment.</p> <p>Forty-four healthy adult females were assigned to two groups: Group 1 (n=24) was used to assess clinical features such as wound retraction; Group 2 (n=20) was used for histological evaluation and morphometric analysis. Topical porcine insulin (5 IU/ml diluted in glycerol) was applied daily one week. For each control time (2, 7, 14, 21 and 28 days post-wounding), inflammatory cells (heterophils, macrophages, lymphocytes and fibroblasts) were scored by two pathologists. Mean wound retraction was greater in the insulin-treated group at each time point and differences were significant at day 28 (P&lt;0.0001). Insulin-treated wounds had significant higher mean counts of heterophils (day 7), macrophages (days 2, 7 and 14) and fibroblasts (days 14 and 21), whereas lymphocyte counts were significantly lower at day 21. These findings demonstrate that topical insulin modifies the inflammatory response of turtle soft skin up-regulating inflammatory cells at early stages and promoting wound healing. Compared with control wounds, differences in wound re-epithelization, collagen synthesis and remodeling of the wound were also present. Topical insulin is a potentially useful therapy in soft skin wounds of turtles and should be evaluated in non-experimental wounds of turtles and other reptiles.</p>

Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aris Systems Corporation

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58

1  
2  
3  
4 **Effects of Topical Insulin on Second-Intention Wound Healing in the**  
5 **Red-Eared Slider Turtle (*Trachemys scripta elegans*)**

8 **Joao Negrini\*§, Elena Mozos\*, Alejandro Escamilla\*, Rosario Lucena†, Rafael**  
9 **Guerra‡, Pedro J. Ginel†**

11 \* Department of Comparative Pathology and †Department of Animal Medicine & Surgery,  
12 Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Campus de Rabanales, 14014,  
13 Córdoba, Spain

14 §Department of Veterinary Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul, Cidade  
15 Universitaria, 79070-900; Campo Grande, Brazil.

16 ‡Zoological Garden of Córdoba, Avenida de Linneo, 14071, Córdoba, Spain.

20 **Corresponding Author:** Prof. Pedro J. Ginel; Department of Animal Medicine &  
21 Surgery; Faculty of Veterinary Medicine; University of Córdoba; Campus de Rabanales  
22 14014; Córdoba, Spain. Tel. 34 957 218713; e-mail: [pginel@uco.es](mailto:pginel@uco.es)

25 **Conflict of interest statement:** The authors declare that they have no conflict of  
26 interest.

29 **Sources of funding**

30 Research presented here was supported by funding from the CAPES (Coordination for  
31 the Improvement of Higher Education Personnel), Brazil – process n° 1339/3-3 and by  
32 the Research Groups of the PAIDI AGR262 and BIO307, Junta de Andalucía, Spain.

35

36 **Abstract:**

37 Compared with mammals, wound healing in reptiles is characterized by reduced wound  
38 contraction and longer healing times. The aim of this study was to describe the clinical  
39 and histopathological effects of topical insulin on second-intention healing of  
40 experimentally induced soft skin wounds in *Trachemys scripta elegans* exposed to daily  
41 variations in ambient temperature in an aquatic environment.

42 Forty-four healthy adult females were assigned to two groups: Group 1 ( $n=24$ ) was used  
43 to assess clinical features such as wound retraction; Group 2 ( $n=20$ ) was used for  
44 histological evaluation and morphometric analysis. Topical porcine insulin (5 IU/ml  
45 diluted in glycerol) was applied daily one week. For each control time (2, 7, 14, 21 and  
46 28 days post-wounding), inflammatory cells (heterophils, macrophages, lymphocytes  
47 and fibroblasts) were scored by two pathologists. Mean wound retraction was greater in  
48 the insulin-treated group at each time point and differences were significant at day 28  
49 ( $P<0.0001$ ). Insulin-treated wounds had significant higher mean counts of heterophils  
50 (day 7), macrophages (days 2, 7 and 14) and fibroblasts (days 14 and 21), whereas  
51 lymphocyte counts were significantly lower at day 21. These findings demonstrate that  
52 topical insulin modifies the inflammatory response of turtle soft skin up-regulating  
53 inflammatory cells at early stages and promoting wound healing. Compared with  
54 control wounds, differences in wound re-epithelization, collagen synthesis and  
55 remodeling of the wound were also present. Topical insulin is a potentially useful  
56 therapy in soft skin wounds of turtles and should be evaluated in non-experimental  
57 wounds of turtles and other reptiles.

58 **Keywords:** *Trachemys scripta*; Wound healing; Topical insulin; Skin; Reptile

59

60 **Introduction**

61 Skin wounds are common in reptiles kept in captivity induced by a variety of causes as  
62 thermal burns, trauma, surgery, improper husbandry, unsanitary conditions, and stress  
63 (Brown and Sleeman 2002; Cooper 2006; Keller et al. 2014). Reptiles heal more slowly  
64 than mammals, with the rate of healing being temperature dependent (Maderson and  
65 Roth 1972; Smith and Barker 1988). This peculiarity makes reptiles prone to secondary  
66 infections, chronic ulcers and prolonged treatment times. Complicated skin wounds  
67 often require second-intention wound healing (Swaim et al. 2001; Sardari et al. 2006),  
68 that in soft skin of reptiles is characterized by reduced wound contraction and longer  
69 healing times than mammals (Smith and Barker 1988; Keller et al. 2014; Negrini et al.  
70 2016). These specific features further compromise wound healing in these species and  
71 prompt the research on practical treatments to increase wound contraction and improve  
72 overall wound healing.

73 Several studies have examined the potential use of growth factors, especially in the field  
74 of wound healing. Unfortunately, the high cost of producing purified growth factors has  
75 prevented their integration into standard therapies. Alternatively, insulin has been  
76 reported to promote wound healing in mammals and, in contrast to other growth factors,

77 is affordable and universally available (Hrynyk and Neufeld 2014; Azevedo et al. 2015).  
78 Some animal models have shown that systemic insulin treatment improves healing of  
79 fractures (Gregory 1965), whereas topical insulin application also promoted healing of  
80 thermal traumas and incision wounds in rats (Hanam et al. 1983; Apikoglu-Rabu et al.  
81 2009; Chen et al. 2012a).

82 Insulin is a peptide hormone and growth factor with several physiological roles. It is  
83 primarily known to maintain glucose blood levels and protein synthesis, but over the  
84 past century it has been demonstrated that insulin also plays a pivotal role in cell  
85 differentiation. These important metabolic and mitogenic effects are mediated through  
86 an insulin receptor that is present in virtually all vertebrate tissues (Kahn 1985; Chen et  
87 al. 2012a). Several studies have confirmed the presence of insulin in the pancreas and  
88 intestine of different species of reptiles including chelonians (Perez-Tomas et al. 1989;  
89 Gapp and Polak 1990; Campbell 2006). The chemical nature of chelonian insulin is not  
90 known but the same antiserum against porcine insulin readily stained  $\beta$  cells in  
91 *Chrysemys* (now named *Trachemys*) and in other chelonians pancreas as well as in  
92 mouse and rat pancreas (Gapp and Polak 1990). However, a review of the literature  
93 demonstrated that, despite evidence of a significant role for topical insulin in the  
94 promotion of wound healing in several animal models, few works have been focused in  
95 reptiles. The red-eared slider is a terrapin widely distributed in North America as a wild  
96 reptile. It is also common in Europe as an imported pet what makes this species suitable  
97 as a model for the study of soft wound healing in chelonians and other reptiles. The aim  
98 of this study was to describe the clinical and histopathological effects of topical porcine  
99 insulin in the second-intention wound healing of experimentally induced soft skin  
100 wounds of *Trachemys scripta elegans* exposed to daily variations in ambient  
101 temperature in an aquatic environment.

102

### 103 **Materials and methods**

#### 104 *Animals*

105 Forty-four adult females of the species *Trachemys scripta elegans* (range of weight 1.2  
106 to 2.3 kg) were used. All animals were deemed healthy based upon physical  
107 examination, packed cell volume, and faecal flotation analysis. Turtles were  
108 individually identified with a microchip and housed outdoor in nine *vivariums* with an  
109 area of 3 m<sup>2</sup>; every *vivarium* included a plastic pool. Water was changed daily and was  
110 obtained from the public water service that carried out physicochemical and  
111 microbiological controls twice monthly. They had free access to a sunbathing area and  
112 were fed *ad libitum* with a commercial diet (Aquatic Turtle Monster Diet, Zeigler Bros,  
113 Inc., Gardners, PA 17324, USA).

114 After a period for adaptation, the animals were assigned to two groups: Group 1, with  
115 24 animals, was used to assess clinical features such as wound retraction; Group 2, with  
116 20 animals, was used for histological evaluation where sets of wounds were biopsied at

117 defined time points along the cicatrization process. Both groups shared the same  
118 premises and climate conditions (temperature range of 9.7 to 40.5°C and humidity 45 –  
119 58%), that were considered adequate to study wound healing because corresponded with  
120 the appropriate temperature range (ATR) for these freshwater turtles (McArthur and  
121 Barrows 2004).

#### 122 *Skin wound biopsy*

123 The animals were anaesthetized with ketamine (20 mg/kg intramuscularly (IM);  
124 Imalgene® 100 mg/ml, Merial, Barcelona, Spain) and detomidine (0.5 mg/kg IM;  
125 Domosedan® 10 mg/ml, Lab. Esteve, Barcelona, Spain) both injected on the front legs.  
126 Without previous disinfection, one wound was made on the dorsal aspect of each rear  
127 limb using a disposable circular scalpel 6 mm in diameter. Wounds were symmetrical  
128 because previous studies in rats have shown differential healing of cutaneous wounds in  
129 the same animal depending on their cranial-caudal location (Martson et al. 1999).

130 After every procedure the animals were housed in individual *terrariums* at room  
131 temperature for approximately 12 hours. Following this recovery period the animals did  
132 not show signs of discomfort and were returned to their *vivarium*. Local anaesthesia and  
133 post biopsy analgesia or anti-inflammatory therapies were not administered, to avoid  
134 their impact on wound healing. Haemorrhage was minimal in all turtles and controlled  
135 with digital pressure. The skin biopsy samples obtained at wound-induction time were  
136 fixed in 10% tamponade formaldehyde during 16 to 20 hours, processed to paraffin-  
137 embedded, stained according to routine histological procedures and used as control of  
138 normal skin.

#### 139 *Insulin treatment*

140 Porcine insulin (Caninsulin® 40 IU/mL, MSD Animal Health, Salamanca, Spain) at 5  
141 IU/ml diluted in glycerol (G5516, Sigma-Aldrich, Inc., Missouri, USA) was  
142 administered 6 hours after the realization of the initial biopsy and daily during the first  
143 week post-injury. The contralateral wound received only topical glycerol. After each  
144 application, the animals were kept out of the water for a period of one hour.

#### 145 *Clinical evaluation of wound healing*

146 Clinical evaluation of wound retraction and overall healing process was performed in 48  
147 wounds from Group 1 (24 insulin-treated and 24 controls). Wounds were photographed  
148 on day 0 and weekly until 28 days post-wound (dpw) (time points T0 to T4) using a  
149 macro lens (Nikon AF-S DX 40 mm). After this four-week period, image analysis  
150 software (Analysing digital imaging; Global System Science; University of California,  
151 USA) was used to measure wound perimeter at each time point. Wound retraction was  
152 expressed as the percentage of perimeter reduction from the initial wound. Other  
153 measurements, such as area and diameter, were evaluated and provided comparable  
154 information. The photographs were examined by two observers, blind for animal and

155 time point of each wound. The correlation coefficient between observers was 0.98 as  
156 calculated from 20 repeated measures of wound perimeter.

#### 157 *Histological study*

158 For microscopic evaluation, a total of 40 wounds (20 insulin-treated and 20 control)  
159 were used from Group 2; 8 wounds, 4 treated and 4 control, selected using a  
160 computational random number generator, were re-biopsied under general anaesthesia at  
161 2, 7, 14, 21 and 28 dpw, using a circular scalpel 8 mm in diameter. Samples were fixed  
162 in 10% tamponade formaldehyde during 16 to 20 hours, then, cut across into two halves  
163 and processed to paraffin-embedded. Four to 5  $\mu$ m thick serial sections were obtained  
164 from each block. Sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and standard  
165 histochemical peryodic acid-Schiff (PAS), methenamine silver staining (Gomori  
166 PAMS), Fraser-Lendrum (FL), and Masson's trichrome (TM), to evaluate the  
167 microscopic features, to stain the basement membrane zone (BMZ) and to identify  
168 accurately fibrin exudates and fibrous tissue during the inflammatory and  
169 proliferation/remodelation stages of healing, respectively. In addition, routine Gram  
170 stain was performed to evaluate bacterial proliferation. Systematic microscopic  
171 evaluation included re-epithelization, BMZ formation, inflammatory and connective  
172 tissue formation and remodelling during the healing process.

#### 173 *Morphometric analysis*

174 For the morphometric analysis, 3 non-sequential sections (HE stained) from each one of  
175 the 8 wound biopsies (4 treated and 4 control) taken at 2, 7, 14, 21 and 28 dpw were  
176 used. From each section, 3 high magnification fields (HMF) at the lateral edges and bed  
177 wound were photographed; thus, for each control point and group, inflammatory cells  
178 (heterophils, macrophages, lymphocytes and fibroblasts) were scored by two  
179 pathologists in 36 photographs. The morphometric analysis was performed with the  
180 software "Image Pro Plus 4.0 software" (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

#### 181 *Statistical analyses*

182 The distribution of the variable in all data columns was analysed by the Kolmogorov-  
183 Smirnov test. Mean wound retraction in both groups, expressed as the percentage of  
184 perimeter reduction from the initial wound, was compared at each time point by an  
185 unpaired t test. As cells counts were not normally distributed, the non-parametric  
186 Kruskal-Wallis test and the Dunn's post-test for multiple comparisons were used to  
187 compare the number of heterophils, macrophages, lymphocytes and fibroblasts at each  
188 time point. A value of  $P < 0.05$  was considered significant. The Grubbs' test was used  
189 to detect significant outliers. After finishing the experiment, we had a 95% power at day  
190 28 to detect differences between means of 18.28% with a significance level (alpha) of  
191 0.05 (two-tailed). Sample power was determined using GraphPad StatMate 2.00 for  
192 Windows. All other statistical calculations and graphics were performed using the Prism  
193 5.04 software for windows (GraphPad Software Inc, San Diego, California).

194

195 **Results**196 *Evaluation of clinical wound healing*

197 The behaviour and general physical condition of the animals were not affected by the  
198 wounds or any other procedure of the experimental design. There were no significant  
199 differences in gained weight between the insulin-treated and control animals within both  
200 groups (data not shown). The biopsy procedure produced well-delimited circular  
201 wounds exposing the subcutaneous tissue and the superficial skeletal muscle (Fig. 1).  
202 Immediately after performing the wound, the area was gradually covered with serous or  
203 serous-haemorrhagic fluid, but haemorrhages were rare. Insulin application caused the  
204 formation of a smooth, waterproof film attached to the edges of the wound.

205 In Group 1 the wounds were readily covered by a crust that persisted along the 28 days  
206 but the macroscopic features of the crusts were clearly different between insulin-treated  
207 and controls wounds (Fig. 1). In the control wounds, crusts were characterized by a  
208 lighter colour and a more irregular surface. Although the crusts covered all the wound  
209 area, most wounds had fissures that exposed the wound bed. Also, the crusts of the  
210 control wounds became progressively more humid and at day 28 presented a mucoid  
211 texture. By contrast, the insulin-treated wounds were characterized by a darker colour, a  
212 more regular surface, and greater consistency manifested by the absence of the crust  
213 fissures that were so common in the control wounds. At day 28 the insulin-treated crusts  
214 had not develop the mucoid texture observed in the control wounds (Fig. 1).

215 Mean wound retraction, estimated by the percentage of perimeter reduction from the  
216 initial wound, was greater in the insulin-treated wounds at every time point (Fig. 2). At  
217 days 7 and 14 wound retraction was similar in both groups and also progressed with a  
218 similar pace but, after this initial phase, the control wounds reversed this tendency at  
219 day 21 and their area slightly increased whereas in the insulin-treated wounds retraction  
220 progressed faster, with a more pronounced downslope so that at day 28, when mean  
221 wound size in the control an insulin-treated wounds were 91.41% and 67.15%  
222 respectively, differences were very significant ( $P < 0.0001$ ) (Table 1).

223 *Microscopic findings*224 *Control skin*

225 Biopsies obtained at wound-induction time were used as internal controls; normal skin  
226 structure consisted in a regularly thick epidermis with about 15-25 keratinocytes layers  
227 differentiated into three strata: stratum germinativum (basal), stratum spinous or  
228 suprabasal and stratum corneum. The dermis was mainly composed by collagen bands  
229 disposed in parallel to the epidermis and embedded in scant ground substance.  
230 Fibroblasts and other resident cells as histiocytes and lymphocytes were scarce or  
231 inconspicuous throughout the collagen bands; melanocytes were variable in number,  
232 arranged according to the turtles' pigmentation pattern, and regularly located in the

233 outer dermis around dermal vessels as well as within the basal keratinocytes. At the  
234 dermo-epidermal junction, a thin and smooth basement membrane zone (BMZ) was  
235 observed as a faint homogeneous or fibrillar acidophilic band using PAS stain and  
236 brown-blackish using methenamine silver stain.

237 *Evaluation of histological wound healing*

238 After 2 dpw, insulin-treated and control wounds showed similar microscopic features;  
239 the wound surface was covered by serous-haemorrhagic exudate composed by plasma,  
240 fibrin, numerous heterophils and erythrocytes. Wound edges of both groups were  
241 infiltrated by a mild to moderate exudate of plasma, fibrin and heterophils, often  
242 degranulated, and variable quantity of macrophages which used to be more abundant  
243 and better defining the wound margins in treated wounds (Figs. 3a to 3d). Inflammatory  
244 infiltrate at the perilesional dermis and subcutis was similar in both groups and  
245 consisted in moderate hyperaemia, oedema and perivascular heterophils cuffs with a  
246 scarce or moderate number of small lymphocytes.

247 At 7 dpw, insulin-treated and control wounds showed their surface covered by a serous-  
248 cellular crust composed by a dense acidophilic proteinaceous exudate of plasma, fibrin  
249 and numerous heterophils, erythrocytes and cell debris. Re-epithelization was quite  
250 similar in both groups, only the upper half of the lateral edges was covered with a new  
251 stratified epithelium under the crust (Figs. 3e and 3f); better differentiation of the  
252 epidermis was found in treated wounds (Fig. 3e). Concurrently with new epidermis  
253 formation, the BMZ was better defined in the treated wounds (Fig. 3e). Besides, in both  
254 groups, the lateral margins and wound bed were occupied by an inflammatory exudate  
255 and granulation tissue that was most abundant in the treated wounds (Figs. 3e and 3f).

256 At 14 dpw, treated and control wounds were covered by a dense crust. Re-epithelization  
257 was complete in the majority of wounds, but in the insulin-treated group the dermo-  
258 epidermal union was firmer and better defined by the BMZ (Figs. 3g to 3i). Treated  
259 wounds showed an abundant granulation tissue under the new epidermis, active  
260 fibroblasts were frequently disposed in parallel to the surface and the BMZ was better  
261 structured than in the control counterparts (Fig. 3g); consequently, detachments of the  
262 new epidermis were observed in the control wounds but were rare in the insulin-treated  
263 wounds (Figs. 3g to 3i). The inflammatory infiltrate was abundant in treated wounds,  
264 both in the lateral edges and in the wound bed and was characterized by a moderate  
265 quantity of plasma and fibrin, fewer heterophils and macrophages and less prominent  
266 lymphocytes. The control group showed a similar cellular infiltrate but with fewer  
267 heterophils, macrophages and fibroblasts.

268 At 21 dpw, all wounds were still covered by an acidophilic crust with abundant cell  
269 debris. The new epidermis was thicker and well differentiated, and showed some degree  
270 of hyperplasia in both insulin-treated and control wounds. The BMZ was more complete  
271 and the granulation tissue was most mature in the insulin-treated wounds. The  
272 inflammatory infiltrate decreased in treated wounds, but lymphocytes and fibroblasts  
273 were increased in the control group.

274 At 28 dpw, insulin-treated wounds showed the margins occupied by mature granulation  
275 tissue characterized by a lower number of active fibroblasts and thicker and more  
276 abundant collagen bands (Fig. 3j ), that were arranged in a pattern resembling the  
277 normal dermal connective tissue. In the control wounds, the granulation tissue was more  
278 cellular and immature, with more fibroblasts and a variable quantity of collagen fibres  
279 (Fig. 3k). Repigmentation was moderated and progressed from the lateral edges. From 7  
280 to 28 dpw the granulation tissue consistently had fewer vascular small blood vessels  
281 (angiogenesis) both in treated and control wounds. Occasional Gram positive  
282 coccaceous bacterial colonies were observed in the surface of the scabs but did not  
283 reach the healing tissue.

#### 284 *Morphometric analysis*

285 The topical application of insulin resulted in statistically significant differences in the  
286 mean counts of heterophils, macrophages, fibroblasts and lymphocyte counts at  
287 different time points along the 2 to 28 days follow up time (Fig. 4). At day 2 the mean  
288 number of heterophils was similar in both groups but the control wounds showed a  
289 rapid decline during the following days, whereas in the insulin-treated wounds the  
290 number of heterophils remained unchanged through the first week of healing and  
291 differences in mean counts were highly significant at day 7 ( $P<0.0001$ ). After this first  
292 week, the density of heterophils evolved similarly in both groups. The effect of insulin  
293 was especially accentuated on the macrophage counts. Insulin application was  
294 associated with significantly higher macrophage mean counts during the first two weeks  
295 of wound healing reaching the highest differences at 7 dpw ( $P=0.0002$ ). Regarding  
296 fibroblast counts, insulin administration was associated with significantly higher mean  
297 counts at day 7 ( $P= 0.025$ ) but especially at day 14 ( $P<0.0001$ ) and 21 ( $P<0.0001$ ).  
298 Finally, lymphocyte mean counts followed a different pattern since the non-treated  
299 wounds showed significantly higher counts at 21 dpw ( $P<0.001$ ) because lymphocyte  
300 density decreased rapidly after 14 dpw in the insulin treated wounds (Fig. 4).

301

#### 302 **Discussion**

303 In a previous study we found that cutaneous second-intention wound healing in healthy  
304 turtles (*Trachemys scripta elegans*) exposed to daily variations in ambient temperature,  
305 progresses slowly and with an indolent behaviour (Negrini et al. 2016). Under equal  
306 conditions, topical insulin significantly modified the inflammatory response and  
307 improved second-intention wound healing of soft skin in turtles. One week  
308 administration of daily topical insulin resulted in higher mean wound retraction and  
309 increased number of heterophils, macrophages and fibroblasts at different times along  
310 the cicatrisation process. Crust formation and macroscopic aspects of the wound were  
311 also improved although this observation has to be considered subjective. Insulin is a  
312 polypeptide highly conserved phylogenetically in all vertebrates including reptiles.  
313 Antisera specific for porcine insulin has been used to identify turtle  $\beta$  cells by  
314 immunohistochemistry (Perez-Tomas et al. 1989) and to measure insulin concentrations

315 in turtle pancreas extracts by radioimmunoassay (Gapp and Polak 1990). This  
316 homology between vertebrate insulin allowed us to choose porcine insulin for the  
317 present study. This type of insulin is licensed for veterinary use, inexpensive and readily  
318 available in most countries.

319 Insulin regulates a variety of biological processes including protein turnover, glucose  
320 transport, hemodynamic, and fatty acid metabolism. The result is a beneficial profile of  
321 anabolic and anticatabolic effects (Greenway et al. 1999; Madibally et al. 2003; Dantzer  
322 and Swanson 2012; Hrynyk and Neufeld 2014). Wound healing is a dynamic and  
323 complex process, as tissue repairing involves pleiotropic molecular and cellular events.  
324 The initial clot serve to stop bleeding and facilitate the migration of inflammatory cells,  
325 which are attracted by growth factors, cytokines and chemokines released into the area.  
326 Subsequent inflammation is essential in the early phases of wound healing; first  
327 neutrophils and later macrophages infiltrate the margins of the incision and release  
328 proteolytic enzymes than serve to clean out debris and proliferating bacteria (Schreml  
329 2010, Qiao et al. 2011). However, the persistence of inflammation leads to delayed  
330 healing in ulterior phases (Wilmink et al.1999). In the current study, topical insulin  
331 induced statistically significant higher mean numbers of heterophils, macrophages and  
332 fibroblasts at several time-points, whereas was associated with a significantly lower  
333 density of lymphocytes at 21 dpw in the inflammatory infiltrate. These findings  
334 demonstrate that topical insulin has the capacity to modify the inflammatory response of  
335 turtle soft skin after injury, in accordance with previous studies in non-diabetic  
336 mammals (Greenway et al. 1999; Madibally et al. 2003; Kassen and Trau 2007;  
337 Apikoglu-Rabus et al. 2009; Hrynyk and Neufeld 2014; Azevedo et al. 2015).

338 In turtles, topical insulin significantly increased the number of heterophils until 7 dpw.  
339 Few studies have investigated the influence of topical insulin on neutrophils during  
340 wound healing. Chen et al. (2012b) reported suppressed infiltration of neutrophils and  
341 decreased healing time in mice wounds treated with topical insulin. These results can be  
342 considered contradictory since early infiltration of neutrophils is an essential first step  
343 of the healing process and the improved healing was attributed to an insulin-induced  
344 increased function of mice neutrophils. Contrastingly we found a higher number of  
345 heterophils during the first 7 dpw coinciding with insulin application, and this increase  
346 in heterophils was associated with higher numbers of macrophages and with faster  
347 wound contraction at 28 dpw. Although reptile heterophils are considered equivalent to  
348 mammals' neutrophils (Campbell 2006), our discrepancies with the report of Chen et al.  
349 (2012b) could be explained by a different cellular response of reptile heterophils to  
350 topical insulin as well as by differences in study design as in mice, neutrophil counts  
351 were determined just during the first 3 days after injury.

352 Previous reports in mammals have demonstrated that macrophages produce several  
353 growth factors and cytokines that stimulate fibroblasts and keratinocytes resulting in  
354 enhanced granulation tissue formation and keratinocyte migration (re-epithelization)  
355 (Schreml et al. 2010). Our results, both for macrophages and fibroblasts, are consistent  
356 with these studies. Chen et al. (2012a) reported that insulin induced a noticeable

357 increased infiltration of macrophages in the first 3 days after wounding, as macrophage  
358 number in the insulin-treated wounds was the same at day 2 as at day 3 in the control  
359 wounds. A similar response was seen in the present study on turtles. The enhanced  
360 macrophage infiltration into the wound area indicates that insulin promotes wound  
361 healing by up-regulating wound inflammatory response, specifically the quantity and  
362 function of macrophages. The effect of topical insulin would be comparable with  
363 cytokines with the ability to activate macrophages, such as interleukin 1 $\beta$  and  
364 macrophage-activating lipopeptide-2, that have been successfully used to promote  
365 wound closure (Maruyama et al. 2007, Kumar et al. 2010).

366 The significant increase in fibroblast mean counts found in turtle insulin-treated wounds  
367 is in agreement with previous findings in mammals (Hanam et al. 1983; Madibally et al.  
368 2003; Apikoglu-Rabus et al. 2009; Azevedo et al. 2015). Faster wound healing and  
369 increased wound tensile strength was observed in rats treated with topical insulin, and  
370 histological analysis of wound tissue revealed an earlier appearance of collagen fibres  
371 with more compact, dense and well-oriented morphology compared with control  
372 animals (Hrynyk and Neufeld 2014). In amphibians (*Ambystoma mexicanum*) it was  
373 shown that insulin can stimulate sulphate uptake and growth of cartilage as in mammals  
374 (Schneider and Hanke 1996). The mechanisms by which insulin exerts these effects are  
375 not fully understood but it is known that insulin can stimulate a variety of cellular  
376 functions important in tissue repair including collagen synthesis in skin fibroblasts  
377 (Chaiken et al. 1986; Lima et al. 2012). In general, growth factors such as insulin can  
378 act as chemoattractants to recruit important cells such as leukocytes and fibroblasts into  
379 the wound area, stimulating angiogenesis, extracellular matrix formation and  
380 degradation, and cytokine release (Kiritsy and Lynch 1993; Apikoglu-Rabu et al. 2009).  
381 On the other hand, re-epithelization was quite similar in both groups, although since 7  
382 dpw insulin-treated wounds showed a better differentiated and defined new stratified  
383 epithelium and BMZ respectively. Previous research in mammals has demonstrated that  
384 topical insulin improves tissue repair through stimulation of keratinocyte migration and  
385 insulin signalling pathways (Ando and Jensen 1993; Liu et al. 2009). In their study, Liu  
386 et al. (2009) observed that the skin wounds of rats treated topically with insulin healed  
387 faster, the surface cells in the epidermis covered the wound more quickly, and the cells  
388 in the dermis rebuilt blood vessels more rapidly. It was also shown that topical insulin  
389 stimulated the proliferation and migration of keratinocytes and the migration of  
390 microvascular endothelial cells.

391 The ability of topical insulin in turtles to increase the number of fibroblasts would be a  
392 major contribution to explain the faster wound retraction observed in treated animals.  
393 Wound contraction is a major component of second-intention wound healing and the  
394 pivotal feature for contraction is granulation tissue formation and remodelling (Swaim  
395 et al. 2001; Sardari et al. 2006; Kassem and Trau 2007). As has been described in  
396 snakes (Smith and Barker 1988), turtles form a persistent dried crust over the wound  
397 bed and healing is characterized by epithelialization under the crust which decreases in  
398 thickness as the dermis fills the skin defect, meanwhile contraction is very limited

399 (Negrini et al. 2016). Thus, the significantly higher wound retraction at day 28 in the  
400 insulin-treated wounds is a remarkable finding that could be explained by the ability of  
401 topical insulin to modulate the inflammatory response increasing macrophage  
402 infiltration, granulation tissue and collagen deposition in turtles as has been described in  
403 mammals (Kassem and Trau 2007; Azevedo et al. 2015). At day 28 mean wound  
404 retraction in the insulin-treated group was 24.26% higher than in the control group. A  
405 greater difference after 28 days would have been desirable but in our opinion is large  
406 enough to consider topical insulin potentially useful, alone or combined with other  
407 growth factors, in the treatment of non-healing wounds of reptiles. One weakness of the  
408 present study was its preclinical condition; for practical reasons we could not include  
409 diseased animals or animals with non-healing wounds. However, as the potential benefit  
410 of insulin or other growth factors has not been investigated before in skin wounds of  
411 reptiles, a preclinical study was necessary before undertaking clinical studies to  
412 determine the real usefulness of topical insulin.

413 Depending on its concentration, the amount of topical insulin may have systemic  
414 effects. Previous studies have revealed the benefits of topical insulin treatment for  
415 injuries to healthy and diabetic mammals (Madibally et al. 2003; Apikoglu-Rabus et al.  
416 2009; Chen et al. 2012a; Azevedo et al. 2015), but the concentrations used have been  
417 variable. In rats, a recent study assayed different concentrations of insulin and  
418 determined that the doses that induced the best effect in wound healing were 0.5 IU and  
419 1.0 IU/100 g. The dose of 1.0 IU/100 g, in some animals, induced alterations in plasma  
420 glucose. Therefore, a cream with a concentration of 0.5 IU/100 g was used for all  
421 experiments (Azevedo et al. 2015). However, another study also in rats used topically  
422 regular Humulin® (Eli Lilly Turkey, Istanbul, Turkey) at a concentration of 100 IU/mL,  
423 without any systemic effect (Apikoglu-Rabus et al. 2009). The use of vehicles that  
424 enhance insulin absorption and provide longer contact times may explain the striking  
425 differences in insulin doses between studies. In the present study, we chose glycerol as  
426 vehicle because it is soluble with aqueous insulin, hygroscopic, cosmetically acceptable  
427 and has a high viscosity index. In preliminary experiments, we tested different  
428 concentrations of insulin and found that, compared with non-treated animals, a  
429 concentration of 5 IU/ml administered for one week improved wound retraction without  
430 influencing plasma glucose concentrations. As a topical solution of this concentration  
431 provided a sufficient local effect, higher concentrations were not assayed. A daily  
432 application during the first week of cicatrization was considered practical and  
433 appropriate since the inflammatory reaction occurs rapidly after the injury and because  
434 turtle soft skin wound healing is characterized by epithelialization under a heavy crust  
435 that prevents a longer insulin application.

436 In conclusion, we found that topical insulin application improved second-intention  
437 wound healing in soft skin of turtles exposed to daily variations of ambient temperature  
438 and in aquatic environment. The results indicated that insulin promotes healing by  
439 regulating wound inflammatory response, specifically the number and activity of  
440 macrophages, heterophils and fibroblasts at early stages of wound healing (0 to 21

441 dpw). Therefore, topical insulin is a potentially useful treatment for poorly healing soft  
442 skin wounds of turtles and should be evaluated in non-experimental wounds of turtles  
443 and other reptiles.

444 All experimental procedures involving animals were conducted in accordance with the  
445 European guidelines for proper use and care of experimental animals and were approved  
446 by the Committee of Animal Ethics of our institution (reference 2168/2013.03.21).

#### 447 **References**

- 448 1. Ando Y, Jensen PJ (1993) Epidermal growth factor and insulin like growth  
449 factor I enhance keratinocyte migration. *J Invest Dermatol* 100:633-639
- 450 2. Apikoglu-Rabus S, Izzettin FV, Turan P, Ercan F (2009) Effect of topical insulin  
451 on cutaneous wound healing in rats with or without acute diabetes. *Clin Exp*  
452 *Dermatol* 35:180-185. doi:10.1111/j.1365-2230.2009.03419.x
- 453 3. Azevedo F, Pessoa A, Moreira G, Dos Santos M, Liberti E, Araujo G, Carvalho  
454 C, Saad M, Lima MH (2015) Effect of topical insulin on second-degree burns in  
455 diabetic rats. *Biol Res Nurs* 1-12. doi: 10.1177/1099800415592175
- 456 4. Brown JD, Sleeman JM (2002) Morbidity and mortality of reptiles admitted to  
457 the wildlife Center of Virginia, 1991 to 2000. *J Wildl Dis* 38:699-705
- 458 5. Campbell TW (2006) Clinical Pathology of Reptiles. In: Mader DR (ed) *Reptile*  
459 *Medicine and Surgery*, 2<sup>nd</sup> edn. Saunders Elsevier, Missouri, pp 453-470
- 460 6. Chaiken RL, Moses AC, Usher P, Flier JS (1986) Insulin stimulation of  
461 aminoisobutyric acid transport in human skin fibroblasts is mediated through  
462 both insulin and type I insulin-like growth factor receptors. *J Clin Endocrinol*  
463 *Metab* 63:1181-1185
- 464 7. Chen X, Liu Y, Zhang X (2012a) Topical insulin application improves healing  
465 by regulating the wound inflammatory response. *Wound Repair Regen* 20:425-  
466 434. doi:10.1111/j.1524-475X.2012.00792.x
- 467 8. Chen X, Zhang X, Liu Y (2012b) Effect of topical insulin application on wound  
468 neutrophil function. *Wounds* 24(7):178-184
- 469 9. Cooper JE (2006) *Dermatology*. In: Mader DR (ed) *Reptile Medicine and*  
470 *Surgery*, 2<sup>nd</sup> edn. Saunders Elsevier, Missouri, pp 196-216
- 471 10. Dantzer B and Swanson EM (2012) Mediation of vertebrate life histories via  
472 insulin-like growth factor-1. *Biol Rew* 87:414-429. doi: 10.1111/j.1469-  
473 185X.2011.00204.x
- 474 11. Gapp DA, Polak JM (1990) Localization of insulin to gastroenteropancreatic  
475 cells in the turtle gastrointestinal tract. *Gen Comp Endocrinol* 78:48-55
- 476 12. Greenway SE, Filler LE, Greenway FL (1999) Topical insulin in wound healing  
477 a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Wound care* 8:526-528
- 478 13. Gregory WB Jr (1965) Effect of insulin on the healing of bone wounds in albino  
479 rats. *J Dent Res* 44:487-492
- 480 14. Hanam SR, Singleton CE, Rudek W (1983) The effect of topical insulin on  
481 infected cutaneous ulcerations in diabetic and nondiabetic mice. *J Foot Surg*  
482 22:298-301

- 483 15. Hrynyk M, Neufeld RJ (2014) Insulin and wound healing. *Burns* 40:1433-1446.  
484 doi.org/10.1016/j.burns.2014.03.020
- 485 16. Kahn CR (1985) The molecular mechanism of insulin action. *Ann Rev Med* 36:  
486 429-451. doi: 10.1146/annurev.me.36.020185.002241
- 487 17. Kassem R, Trau H (2007) The effect of topical insulin on the healing process of  
488 second degree burn in guinea pigs. *J Am Acad Dermatol* 56:AB207
- 489 18. Keller KA, Paul-Murphy J, Weber S, Kass PH, Guzman DS, Park SA,  
490 Raghunathan VK, Gustavsen KA, Murphy CJ (2014) Assessment of platelet-  
491 derived growth factor using a splinted full thickness dermal wound model in  
492 bearded dragons (*Pogona vitticeps*). *J Zoo Wildl Med* 45 (4):866-874
- 493 19. Kiritsy CP, Lynch SE (1993) Role of growth factors in cutaneous wound  
494 healing: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4(5):729-760
- 495 20. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC (2010) Tissue Renewal, Regeneration,  
496 and Repair. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8<sup>th</sup> ed.  
497 Saunders Elsevier, Philadelphia, pp 79-110
- 498 21. Lima MHM, Caricilli AM, Abreu LL, Araujo EP, Pelegrinelli FF, Thirone AC et  
499 al. (2012) Topical insulin accelerates wound healing in diabetes by enhancing  
500 the AKT and ERK pathways: a double-blind placebo-controlled clinical trial.  
501 *Plos ONE* 7(5):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0036974
- 502 22. Liu Y, Petreaca M, Yao M, Martins-Green M (2009) Cell and molecular  
503 mechanism of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing.  
504 *BMC Cell Biol* 10:1. doi:10.1186/1471-2121-10-1
- 505 23. Maderson PFA, Roth SI (1972) A histological study of early stages of cutaneous  
506 wound healing in lizards in vivo and in vitro. *J Exp Zool* 180:175-186
- 507 24. Madibally SV, Solomom V, Mitchell R, Water LV, Yarmush ML, Toner M  
508 (2003) Influence of insulin therapy on burn wound healing in rats. *J Surg Res*  
509 109:92-100. doi:10.1006/jsre.2003.6564
- 510 25. Martson M, Viljanto J, Laippala P, Saukko P (1999) Cranio-caudal differences  
511 in granulation tissue formation: an experimental study in the rat. *Wound Repair*  
512 *Regen* 7:119-126
- 513 26. Maruyama K, Asai J, Li M, Thome T, Losordo DW, D'Amore PA (2007)  
514 Decrease macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel  
515 formation and contribute to impaired diabetic wound healing. *Am J Pathol*  
516 170:1178-1191
- 517 27. McArthur S and Barrows M (2004) General Care of Chelonians. In: MacArthur  
518 S, Wilkinson R, Meyer J. *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*.  
519 Blackwell Publishing, Oxford, pp 87-106
- 520 28. Negrini J, Ginel PJ, Novales M, Guerra R, Mozos E (2016) Clinical and  
521 histological findings of cutaneous wound healing in the red-eared slider turtle  
522 (*Trachemys scripta elegans*) housed in unheated outdoor enclosures. *Vet*  
523 *Dermatol*. doi: 10.1111/vde.12346
- 524 29. Perez-Tomas R, Ballesta J, Pastor LM, Madrid JF, Polak JM (1989)  
525 Comparative immunohistochemical study of the gastroenteropancreatic  
526 endocrine system of three reptiles. *Gen Comp Endocrinol* 76:171-191

- 527 30. Qiao L, Lu SL, Dong JY et al. (2011) Abnormal regulation of neo-  
528 vascularization in deep partial thickness scalds in rats with diabetes mellitus.  
529 Burns 37:1015-1022
- 530 31. Sardari K, Mirshahi A, Maleki M, Aslani MR, Barjasteh MN (2006) Effects of  
531 topical allicin on second-intention wound healing in dogs (histological aspects).  
532 Comp Clin Pathol 15:98-102. doi: 10.1007/s00580-006-0616-4
- 533 32. Schneider A, Hanke W (1996) Influence of insulin-like growth factors and  
534 insulin on the [35 S] sulfate uptake by cartilage of the axolotl (*Ambystoma*  
535 *mexicanum*). Gen Comp Endocrinol 104:92-102
- 536 33. Schreml S, Szcimies RM, Prantl L, Landthaler M, Babilas P (2010) Wound  
537 healing in the 21st century. J Am Acad Dermatol 63:866-881.  
538 doi:10.1016/j.jaad.2009.10.048
- 539 34. Smith DA, Barker IK (1988) Healing of cutaneous wounds in the common  
540 garter snake (*Thamnophis sirtalis*). Can J Vet Res 52:111-119
- 541 35. Swaim SF, Hinkle SH, Bradley DM (2001) Wound contraction: basic and  
542 clinical factors. Compendium 23:20-24
- 543 36. Wilmink JM, Van Weeren PR, Stolk PW, Van Mil FN, Barneveld A (1999)  
544 Differences in second-intention wound healing between horses and ponies:  
545 histological aspects. Equine Vet J 31(1):61-67

546

547 **Legends**

548

549 **Table 1** Descriptive statistics of wound size at each time point expressed as a  
550 percentage of the initial wound circumference. Wound size was registered weekly  
551 during 4 weeks; dpw: days post-wounding

552

553 **Fig. 1** Sequence of clinical photographs illustrating wound retraction and crust  
554 macroscopic features in two representative wounds from each group. Wounds were  
555 recorded and measured digitally every week from day 0 to 28. Upper row corresponds  
556 to control group. Lower row corresponds to insulin-treated group (internal scale in  
557 millimetres)

558

559 **Fig. 2** Evolution of wound retraction during the first 28 days post-injury in the control  
560 and insulin-treated groups. Each point represents mean wound size expressed as a  
561 percentage of the initial wound circumference. Statistically significant differences  
562 between groups: \*\*\*  $P < 0.001$  (unpaired t test)

563

564 **Fig. 3** Red-eared slider turtle skin. Histological evolution of wound healing of insulin-  
565 treated (a,b) and controls (c,d) Lateral and bed edges are demarcated by a palisade of  
566 serous-fibrinous and heterophils exudates (arrows). Macrophages were more numerous  
567 in treated wounds (b). e and f At 7 dpw re-epithelization of the lateral edges is observed  
568 in both group but treated wounds have better differentiated epidermis (e), the BMZ is  
569 better defined (green arrows) and the granulation tissue show higher number of  
570 heterophils, macrophages and fibroblasts than control wounds (f). g At 14 dpw, treated  
571 wounds show abundant and mature granulation tissue characterized by active fibroblasts  
572 disposed parallel to the BMZ (arrows). Moderate quantity of collagen bundles are  
573 present (inset), Haematoxylin-eosin and Masson's trichrome stains. h and i At this time  
574 point, in the control wounds, the granulation tissue is scarce and detachment of the  
575 epidermis is easily observed because the BMZ is most incomplete (arrows),  
576 Haematoxylin-eosin stain. j and k At 28 dpw treated wounds show most abundant  
577 collagen fibers (arrow) and remodeling is the granulation tissue compared with control  
578 wound counterparts (k), Masson's trichrome and Haematoxylin-eosin stains.

579

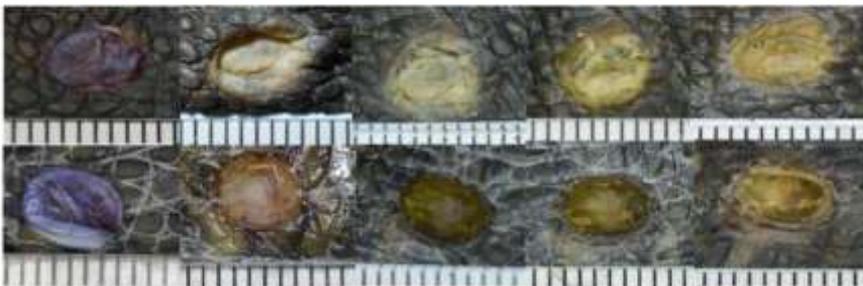
580 **Fig. 4** Mean counts of inflammatory cells at each time point from 2 to 28 days after  
581 wound creation. Vertical bars represent standard deviation. Statistically significant  
582 differences between groups: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  (Kruskal-Wallis test  
583 with Dunn's Multiple Comparison Test)

table

[Click here to download table Table 1.docx](#)

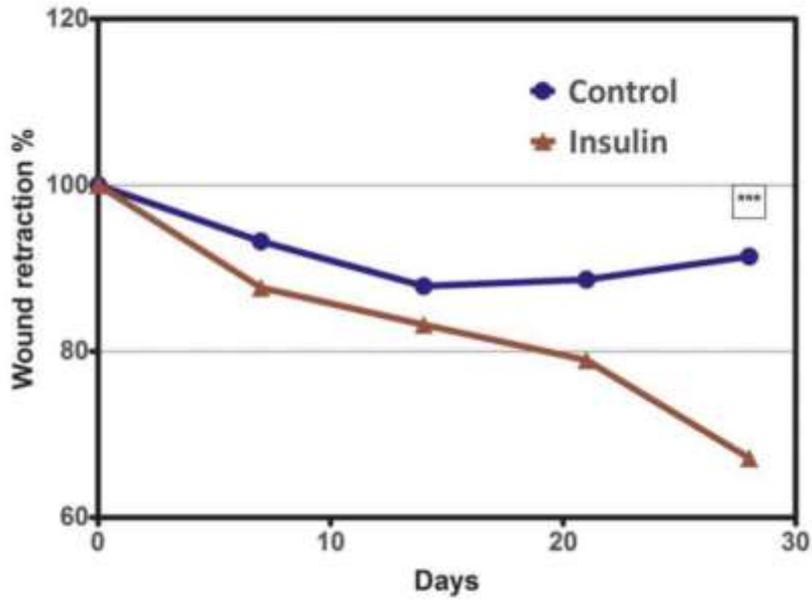
	7 dpw (T1)		14 dpw (T2)		21 dpw (T3)		28 dpw (T4)	
	Control	Insulin	Control	Insulin	Control	Insulin	Control	Insulin
Number of values	24	24	24	24	24	24	24	24
Mean	93.24	87.66	87.84	83.19	88.64	78.93	91.41	67.15
Std. Deviation	11.98	15.76	12.45	15.16	17.75	16.63	19.42	13.89
Std. Error	2.445	3.217	2.542	3.095	3.623	3.395	3.964	2.835
Lower 95% CI of mean	88.16	81.01	82.58	76.79	81.15	71.90	83.21	61.28
Upper 95% CI of mean	98.30	94.32	93.10	89.59	96.13	85.95	99.61	73.01
Minimum	68.76	65.02	59.96	62.42	56.05	57.48	52.56	39.95
25% Percentile	84.09	75.46	78.66	72.32	74.43	67.01	74.37	54.94
Median	96.44	84.13	87.79	80.17	88.27	77.12	98.98	65.48
75% Percentile	101.0	95.64	98.01	89.19	102.1	88.96	104.4	75.60
Maximum	116.4	132.1	113.2	130.5	124.6	119.4	132.1	94.76

colour figure

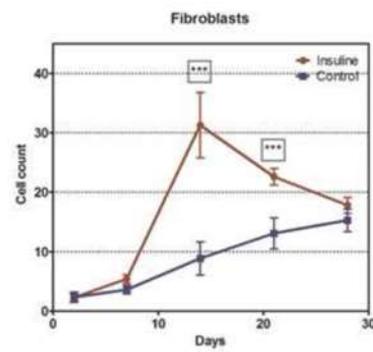
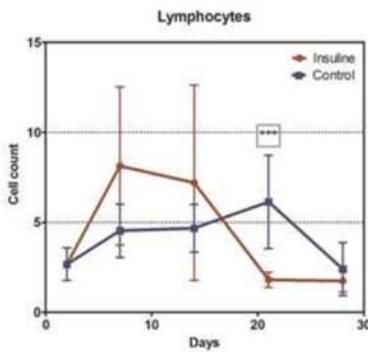
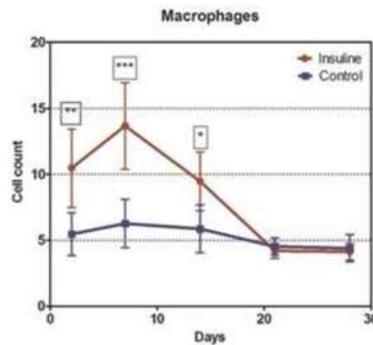
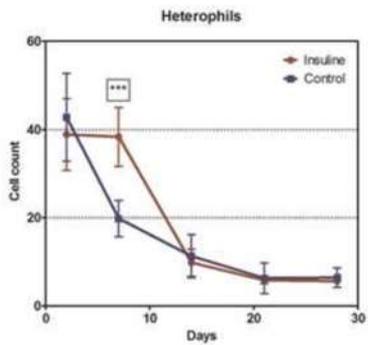
[Click here to download colour figure Fig 1.tif](#)

line figure

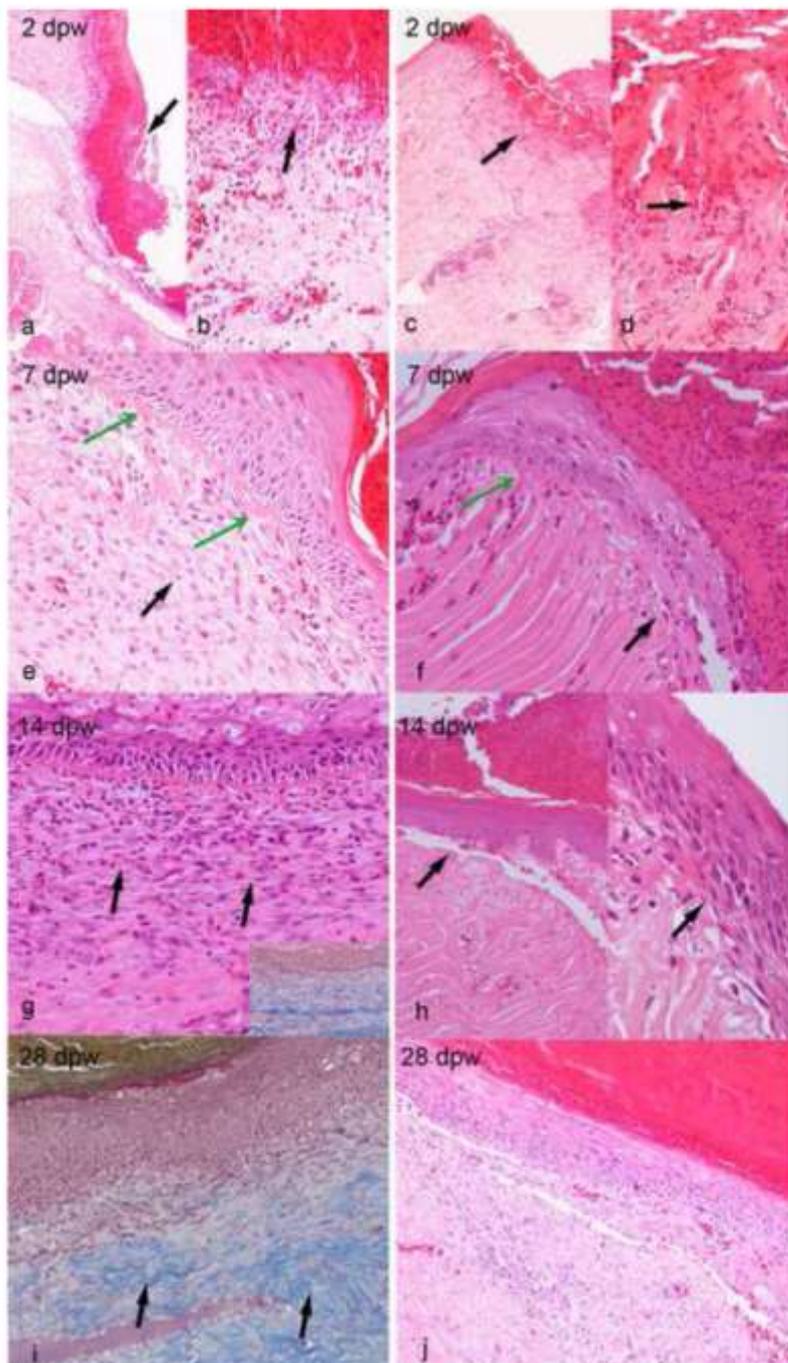
[Click here to download line figure Fig 2.tif](#)



[Click here to download line figure Fig 4.tif](#)

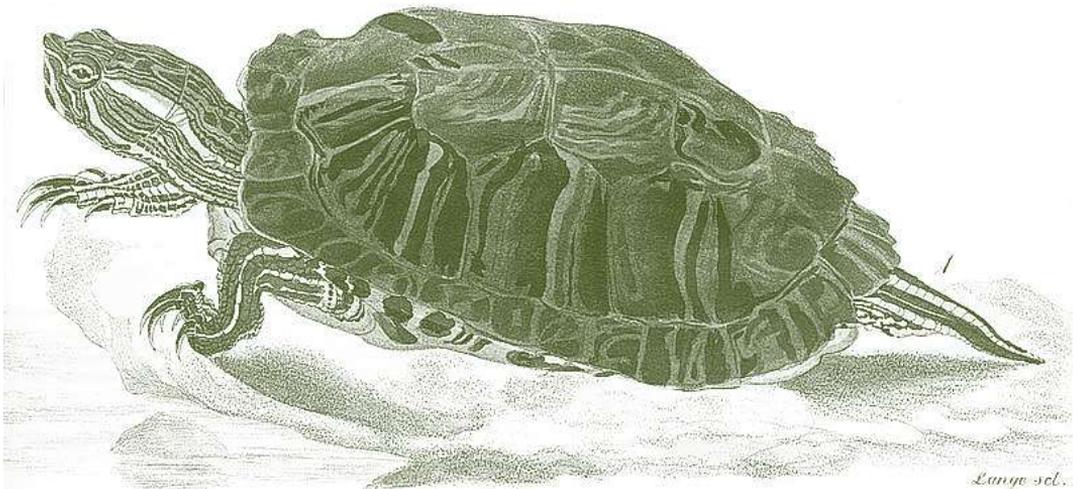


[Click here to download colour figure Fig 3.tif](#)





# Conclusiones



*"Como el hombre ciego no puede concebir los colores, tampoco nosotros llegamos a entender el modo en el que Dios percibe y entiende todas las cosas".*

*Isaac Newton, Matemático y Físico (1642-1727)*



## 8. Conclusiones

**Primera.** La cicatrización por segunda intención en piel de tortugas de la especie *Trachemys scripta elegans*, expuestas a las variaciones diarias de la temperatura ambiente y en un ambiente acuático, se produce de forma lenta e indolente, con tiempos de cicatrización más prolongados que en mamíferos.

**Segunda.** Clínicamente se caracteriza por una retracción no significativa de los bordes de herida y la persistencia de costras irregulares y frágiles sobre la epidermis regenerada hasta el final de las fases de proliferación/remodelación.

**Tercera.** Histológicamente se produce una superposición prolongada de las fases inflamatoria y proliferativa de la cicatrización y la remodelación del tejido conectivo proliferado se produce entre los 42 y 135 días. En el estudio morfométrico, la superposición de estas fases se manifiesta por persistencia, sin cambios significativos, de las poblaciones de células inflamatorias (macrófagos y linfocitos) incluso después de la proliferación significativa de fibroblastos para formar tejido de granulación.

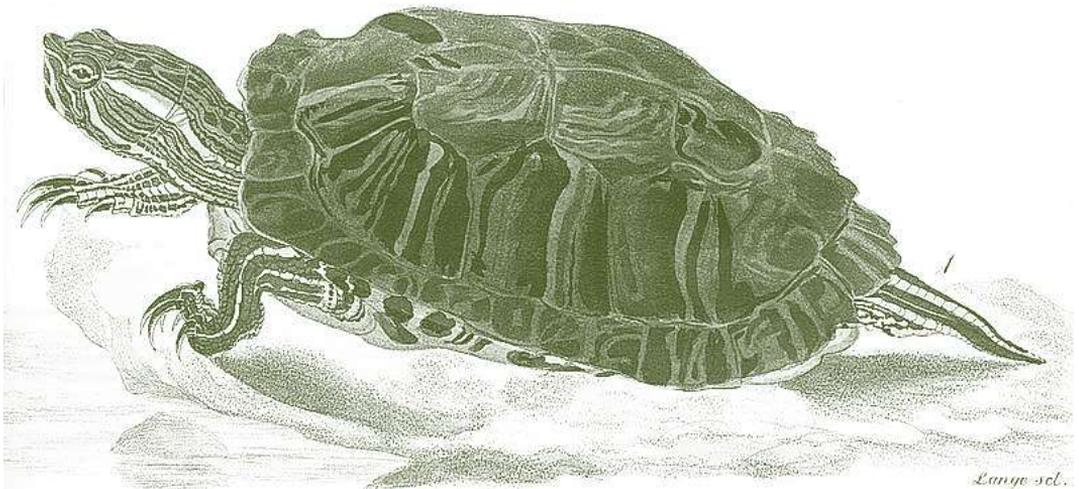
**Cuarta.** La proliferación del tejido de granulación durante la cicatrización por segunda intención se produce tanto en los bordes laterales como en el lecho de la herida, donde es incluso más abundante. Este hallazgo difiere de estudios anteriores en reptiles que describen la curación de heridas a partir de los bordes laterales. Además, la ZMB persiste morfológicamente inmadura durante muchas semanas lo que puede relacionarse con la fragilidad de la unión dermo-epidérmica observada con frecuencia este estudio.

**Quinta.** La aplicación tópica de insulina mejora la cicatrización desde el punto de vista clínico; aumenta significativamente a los 28 días la retracción de los bordes de la herida con respecto a los controles y se asocia con la formación de costras más uniformes y consistentes.

**Sexta.** La aplicación tópica de insulina modifica la respuesta inflamatoria especialmente en las fases iniciales con un número significativamente mayor de heterófilos (día 7), macrófagos (días 2 a 14) y fibroblastos (días 14 a 21) respecto a las heridas control, y se asocia con mayor cantidad de fibras de colágeno y remodelación más temprana del tejido de granulación.

**Séptima.** El modelo experimental desarrollado en estos estudios ha demostrado ser sencillo, reproducible y útil para caracterizar la cicatrización por segunda intención y evaluar nuevas estrategias de tratamiento en heridas de la piel blanda de tortugas.

# Resumen / Summary



*"En la vida, no hay nada que temer, solo hay que comprender."*

*Marie Curie, química y física (1867 -1934)*



## 9. Resumen

Las heridas de la piel son un motivo frecuente de consulta en los reptiles mantenidos en cautividad. Como en el resto de reptiles, las tortugas están predispuestas a sufrir heridas por causas muy diversas como traumatismos, mordeduras, condiciones inadecuadas en los terrarios, etc. Especialmente en tortugas acuáticas o semi-acuáticas estas heridas a menudo curan de manera lenta, insidiosa y se hacen crónicas. Sorprendentemente, la cicatrización de las heridas cutáneas en reptiles ha sido muy poco estudiada, especialmente en quelonios donde los estudios previos solo han descrito la estructura de la epidermis y las heridas del caparazón. Esta falta de información dificulta la evaluación de nuevas terapias para la curación de heridas en la piel blanda de tortugas y reptiles en general.

Las tortugas acuáticas, por las particularidades de su metabolismo y hábitat, constituyen un modelo experimental atractivo para el estudio de promotores de la cicatrización. Nuestra hipótesis de trabajo parte de la idea que la cicatrización en la piel de tortugas mantenidas en su entorno natural, con variaciones diarias de temperatura y libre acceso al agua, puede presentar diferencias relevantes respecto a lo descrito hasta ahora en mamíferos y otros reptiles y que la aplicación tópica de factores de crecimiento como la insulina puede mejorar la respuesta inflamatoria y la curación del tejido dañado.

Los objetivos específicos de esta Tesis doctoral han sido: (1) Estudiar y caracterizar los aspectos clínicos e histopatológicos de la cicatrización por segunda intención en heridas cutáneas inducidas experimentalmente en tortugas de la especie *Trachemys scripta elegans* expuestas a variaciones diarias de temperatura ambiente y en un ambiente acuático. (2) Estudiar el valor terapéutico de la aplicación tópica de la insulina porcina como factor promotor de crecimiento en el proceso de cicatrización de úlceras cutáneas por segunda intención en quelonios acuáticos.

En un primer experimento se utilizaron 24 tortugas hembras, adultas, sanas que fueron alojadas en instalaciones al aire libre en un entorno acuático. Bajo anestesia general se realizaron dos heridas iguales en todos los animales, una en cada miembro

posterior, mediante un bisturí circular de 6 mm de diámetro. Las tortugas fueron divididas en dos grupos iguales (n=12). En el grupo 1, para evaluación clínica, se calculó digitalmente a partir de fotografías el perímetro de la herida inicial y su evolución semanal hasta 28 días después. La retracción de heridas fue expresada como el porcentaje de reducción respecto al perímetro de la herida inicial. En el grupo 2, para evaluación histológica, se realizaron biopsias de tres heridas con un bisturí de 8 mm en los días 2, 7, 14, 21, 28, 42, 60 y 135. En estas biopsias, dentro del estudio histológico, se realizó un estudio morfométrico de las principales células inflamatorias (heterófilos, macrófagos, linfocitos y fibroblastos) y se evaluó si se producía reacción cruzada con un panel de 15 anticuerpos comerciales usados habitualmente en anatomía patológica como marcadores de células en mamíferos. Para este estudio se utilizó la técnica inmunohistoquímica del complejo Avidina-biotina-peroxidasa (ABC).

Desde el punto de vista clínico, la retracción de la herida fue muy limitada, después de 28 días el tamaño medio de las heridas era todavía el 91,41% de la herida inicial, sin que hubiera diferencias significativas. La cicatrización se produjo bajo una costra irregular y frágil que cubrió la epidermis regenerada hasta el final de las fases de proliferación/remodelación. Microscópicamente, la re-epitelización fue completa a los 14 días en muchos animales; la inflamación activa persistió hasta el día 28 y la reconstitución y remodelación del tejido conectivo se obtuvo entre los días 42 a 135 con superposición de las fases inflamatorias y proliferativas durante un largo periodo. En el estudio morfométrico, la superposición de fases se manifestó por la persistencia, sin cambios significativos, de las poblaciones de células inflamatorias (macrófagos y linfocitos) incluso después de la proliferación significativa de fibroblastos para formar tejido de granulación. El estudio inmunohistoquímico mostró que los anticuerpos AE1/AE3 (marcador panqueratinas), Factor VIII (marcador de plaquetas y endotelios), MAC 387 (marcador de macrófago/histiocitos), CD3 (marcador de linfocitos T) y el anticuerpos NCL-MSA (marcador de actina de fibra lisa y miofibroblastos) presentaban reacción cruzada con las células equivalentes de los tejidos de la piel y/o el tejido de granulación de las tortugas.

En el segundo experimento, para la evaluación de la aplicación tópica de insulina porcina, se utilizaron 44 tortugas hembras adultas sanas de la especie *Trachemys scripta elegans* en las que se realizaron heridas según el procedimiento descrito en el experimento 1. De forma similar, los animales fueron asignados a un grupo 1 (n=24) para evaluación clínica, y a un grupo 2 (n=20) para evaluación histológica y morfométrica. En ambos grupos, una herida de cada animal se usó como control y la contralateral fue tratada con insulina porcina (5 UI/mL diluida en glicerol) aplicada

tópicamente una vez al día durante una semana. En el grupo 2 se tomaron biopsias de 4 heridas control y 4 tratadas a los 2, 7, 14, 21 y 28 días.

A los 28 días, el tamaño medio de la herida fue significativamente menor ( $P < 0,001$ ) en el grupo tratado con insulina respecto al grupo control (67,15% y 91,41% respectivamente). La aplicación de insulina se asoció con la formación de costras más uniformes y consistentes. Desde el punto de vista microscópico y morfométrico, la aplicación tópica de insulina modificó la respuesta inflamatoria especialmente en las fases iniciales con un número significativamente mayor de heterófilos (día 7,  $P < 0,001$ ), macrófagos (días 2  $P < 0,01$ , 7  $P < 0,001$  y 14  $P < 0,05$ ) y fibroblastos (días 14 y 21,  $P < 0,001$ ) respecto a las heridas control, y se asoció con mayor cantidad de fibras de colágeno y remodelación más temprana del tejido de granulación. Como evidencia de una cicatrización acelerada, la densidad de linfocitos descendió más rápidamente en el grupo tratado con insulina que en el grupo control, siendo significativamente menor a los 21 días post-herida ( $P < 0,001$ ).

En conclusión, el modelo experimental desarrollado ha demostrado ser sencillo, reproducible y útil para caracterizar la cicatrización por segunda intención y evaluar nuevos tratamientos en heridas de la piel blanda de tortugas. Los resultados indican que la insulina promueve la curación mediante la regulación de la respuesta inflamatoria de la herida, específicamente la cantidad y función de macrófagos, heterófilos y fibroblastos. Por lo tanto, sería recomendable realizar ensayos clínicos con insulina tópica en heridas espontáneas de tortugas acuáticas.



## 10. Summary

Skin wounds are a common clinical presentation in reptiles kept in captivity. As the rest of reptiles, turtles are prone to skin wounds of diverse causes as traumatism, bites or unsanitary conditions. Especially in freshwater turtles, wounds many times heal insidiously and become chronic. Unexpectedly, cutaneous wound healing in reptiles has rarely been reported, particularly in chelonians where previous studies described only the epidermal structure and wounds of the shell. This lack of knowledge hampers the evaluation of new therapies for the treatment of soft skin wounds in chelonians and other reptiles in general.

Freshwater turtles, due to their special metabolism and habitat represent a suitable experimental model for the study of heal promoters. Our working hypothesis is that cutaneous wound healing in turtles kept in their natural environment, with variations in ambient temperature and free access to water, may present relevant differences in comparison with previous reports in mammals and other reptile species, and that the topical application of insulin could improve de inflammatory response and overall healing process of the damaged tissue.

The main objectives of this study were: (1) to describe the clinical and histopathological features of second-intention cutaneous wound healing in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta elegans*) exposed to daily variations of ambient temperature in an aquatic environment; (2) to study the therapeutic value of topical application of insulin as a promoter for second intention cutaneous wound healing of freshwater chelonians.

Experience 1; 24 healthy adult females housed in outdoor facilities with free access to water and exposed to daily variations in temperature were used. Under general anesthesia, one full thickness 6 mm skin biopsy punch wound was created in each rear limb. The turtles were assigned to Group 1 (n=12 for clinical evaluation) and Group 2 (n=12 for microscopic study). Group 1 was photographed on day 1 and weekly until 28 days post wounding. Wound retraction was expressed as the percentage of perimeter reduction from the initial wound. For Group 2, three skin

wounds were sampled at 2, 7, 14, 21, 28, 42, 60 and 135 days post wounding using a disposable 8 mm skin biopsy punch for histological study. As a part of the histological study, the number of the main inflammatory cells (heterophils, macrophages, fibroblasts and lymphocytes) was recorded in these samples; moreover, cross reactivity was evaluated with a panel of 15 commercial antibodies routinely used as mammals cellular markers in pathology. For this study, the avidin-biotin-peroxidase (ABC) immunostaining method was used.

Clinically, wound contraction was very limited; after 28 days the mean wound size was still 91.41% of the original wound, and differences were not significant. The Cicatrization progressed under a persistent irregular and fragile crust that remained over the new epidermis till the end of the proliferation-remodelation phases. Microscopically, re-epithelialization was complete by day 14 in many animals; active inflammation persisted until 28 days and the connective tissue re-constitution and remodeling was achieved from 42 to 135 days, with marked overlapping of the inflammatory and proliferative phases over a long period of time. Morphometrically, this overlapping was manifested by the absence of significant changes in the inflammatory cell numbers (macrophages and lymphocytes) even after there was a clear fibroblasts infiltration forming the granulation tissue. The immunohistochemical study showed that the antibodies AE1/AE3 (pankeratins marker), factor VIII (platelet and endothelial marker), MAC 387 (macrophage/histiocytes marker), CD3 (T lymphocytes marker) and NCL-MSA antibody (smooth muscle fiber actin and myofibroblasts marker), cross-reacted with their counterparts in turtle skin and granulation tissue.

Experience 2; Forty-four healthy adult female red-eared slider turtles were used to evaluate the topical application of porcine insulin. Wounds were performed as described before and the animals were assigned to group 1 (n=24), for clinical evaluation, and to group 2 (n=20) for histological evaluation. In both groups, one rear limb wound of each animal was used as control and the contralateral wound was treated daily for one week with topical porcine insulin (5 IU/mL in glycerol). In group 2, 4 control and 4 treated wounds were biopsied at 2, 7, 14, 21 and 28 days.

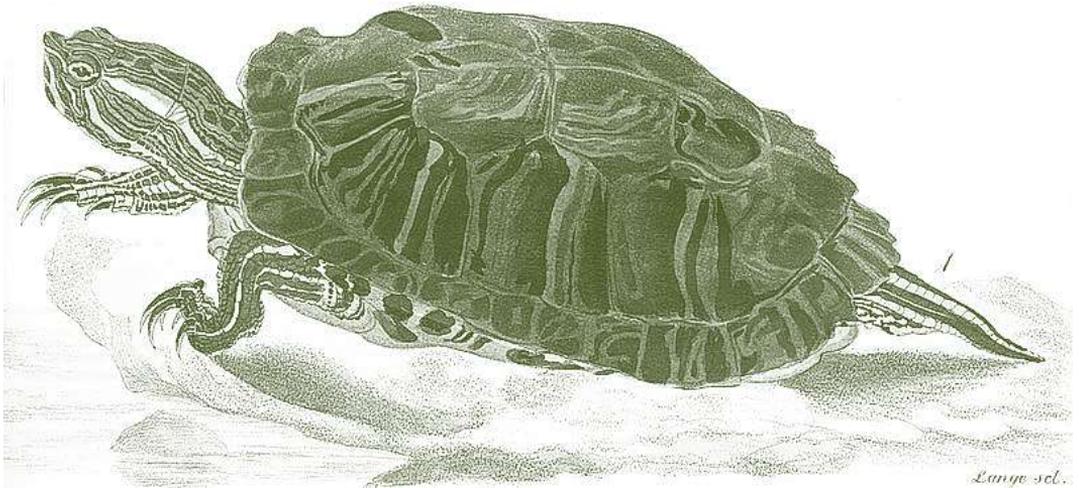
After 28 days, mean wound size was significantly lower ( $P<0.0001$ ) in the treated wounds than in the control wounds (67.15% and 91.41% respectively). Topical insulin application was also associated with firmer and more consistent crusts. Microscopically, topical insulin modified the inflammatory response especially at early phases achieving a significantly higher mean number of heterophils (day 7,  $P<0.001$ ),

macrophages (days 2  $P < 0.01$ , 7  $P < 0.001$  and 14  $P < 0.05$ ) and fibroblasts (days 14 and 21,  $P < 0.001$ ) compared with control wounds. Insulin administration induced a higher amount of collagen fibers and an earlier remodeling of granulation tissue. As proof of a faster cicatrization process, lymphocyte number lowered faster in the insulin-treated wounds, and was significantly lower ( $P < 0.001$ ) at day 21 post-wounding.

In conclusion, the experimental model here described was found to be practical, reproducible and useful to characterize second-intention wound healing and to evaluate new therapies for soft skin wounds in turtles. Results indicate that topical insulin promotes healing by up-regulating the inflammatory response in the wound, specifically the amount and function of macrophages, heterophils and fibroblasts. Therefore, it would be justified to pursue clinical studies using topical insulin in non-experimental, spontaneous wounds of freshwater turtles.



# Bibliografía



*“El sinsentido sigue siendo sinsentido, aunque esté en boca de un científico con fama mundial”.*

*John Lennox. Matemático y filósofo (1942)*



## 11. Bibliografia

Abraham JA, Klagsbrun M. Modulation of wound repair by members of the fibroblast growth factor family. In: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* (2<sup>a</sup> ed.), Clark RAF (ed.). New York: Plenum, 1996; 195-248.

Alibardi L, Sawyer RH. Immunocytochemical analysis of beta keratins in the epidermis of chelonians, lepidosaurians, and archosaurians. *J Exp Zool* 2002; 293:27-38.

Alibardi L, Spinisi E, Toni M. Differentiation of the epidermis in turtle: an immunocytochemical, autoradiographic and electrophoretic analysis. *Acta Histochem* 2004; 106:379-95.

Alibardi L, Toni M. Skin structure and cornification proteins in the soft-shelled turtle *Trionyx spiniferus*. *Zoology* 2006; 109: 182-95.

Ando Y, Jensen PJ. Epidermal growth factor and insulin like growth factor I enhance keratinocyte migration. *J Invest Dermatol* 1993; 100: 633–39.

Apikoglu-Rabus S, Izzettin FV, Turan P, Ercan F. Effect of topical insulin on cutaneous wound healing in rats with or without acute diabetes. *Clin Exp Dermatol* 2009; 35:180–85.

Azevedo F, Pessoa A, Moreira G, Dos Santos M, Liberti E, Araujo G, Carvalho C, Saad M, Lima MH. Effect of topical insulin on second-degree burns in diabetic rats. *Biol Res Nurs* 2015; 1-12

Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg* 2005; 31:674-86.

Beer HD, Fassler R, Werner S. Glucocorticoid-regulated gene expression during cutaneous wound repair. *Vitam Horm* 2000; 59:217-39.

- Benoliel AM, Kahn-Peries B, Imbert J y cols. Insulin stimulates haptotactic migration of human epidermal keratinocytes through activation of NF-kappa B transcription factor. *J Cell Sci* 1997; 110:2089-97.
- Beynon P, Cooper JE. BSAVA: Manual de los animales exóticos. Sastre Vidal Ediciones 1999.
- Bohling MW, Henderson RA, Swaim SF y cols. Cutaneous wound healing in the cat: a macroscopic description and comparison with cutaneous wound healing in the dog. *Vet Surg* 2004; 33:579-87.
- Breuing K, Andree C, Helo G y cols. Growth factors in the repair of partial thickness porcine skin wounds. *Plast Reconstr Surg* 1997; 100:657-64.
- Broadley KN, Aquino AM, Woodward SC y cols. Monospecific antibodies implicate basic fibroblast growth factor in normal wound repair. *Lab Invest* 1989; 61:571-75.
- Campbell TW. Clinical Pathology of Reptiles. En: Mader DR (ed) *Reptile Medicine and Surgery* 2006, 2ª ed. Saunders Elsevier, Missouri, 453-70.
- Cangul IT, Gui NY, Topal A, Yilmaz R. Evaluation of the effects of topical tripeptide-copper complex and zinc oxid on open wound healing in rabbits. *Vet Dermatol* 2006; 17:417-23.
- Carlson HC, Allen JR. The acute inflammatory reaction in chicken skin: blood cellular response. *Avian Dis* 1970; 14:817-33.
- Chaiken RL, Moses AC, Usher P, Flier JS. Insulin stimulation of aminoisobutyric acid transport in human skin fibroblasts is mediated through both insulin and type I insulin-like growth factor receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63:1181-5.
- Chen X, Liu Y, Zhang X. Topical insulin application improves healing by regulating the wound inflammatory response. *Wound Repair Regen* 2012a; 20:425-34.
- Chen X, Zhang X, Liu Y. Effect of topical insulin application on wound neutrophil function. *Wounds* 2012b; 24(7):178-84.

- Clark RA. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci* 1993; 306:42-8.
- Coleman IK, Kormos A, Garrett A y cols. Topical application of epidermal growth factor does not enhance re-epithelization of partial thickness wounds in human volunteers, *WHS. Prog. Abstr* 1991; 1.8.
- Cooper DM, Yu EZ, Hennessey P y cols. Determination of endogenous cytokines in chronic wounds. *Ann Surg* 1994; 219:688-92.
- Cooper JE. Dermatology. En: Mader DR (ed) *Reptile Medicine and Surgery* 2006, 2ª ed. Saunders Elsevier, Missouri, 196-216.
- Edmonds M, Bates M, Doxford M y cols. New treatments in ulcer healing and wound infection. *Diabetes Metab Res Rev* 2000; 1:S51–S54.
- Ernst CH, Barbour RW. *Turtles of the World* 1989. Smith. Inst. Press, Washington. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador, A., Marco, A.(Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Ernst CH, Lovich, JE. *Turtles of the United States and Canada* 2009, 2ª ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore. En: Enciclopedia Virtual delos Vertebrados Españoles. Salvador A, Marco A (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Flier JS, Usher P, Moses AC. Monoclonal antibody to the type I insulin-like growth factor (IGF-I) receptor blocks IGF-I receptor-mediated DNA synthesis. Clarification of the mitogenic mechanisms of IGF-I and insulin in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:664-8.
- French SS, Matt KS, Moore MC. The effects of stress on wound healing in male tree lizards (*Urosaurus ornatus*). *Gen Comp Endocrinol* 2006; 145:128-32.
- Gapp DA, Polak JM. Localization of insulin to gastroenteropancreatic cells in the turtle gastrointestinal tract. *Gen Comp Endocrinol* 1990; 78:48-55.

Grayson LS, Hansbrough JF, Zapata-Sirvent RL y cols. Quantitation of cytokine levels in skin graft donor site wound fluid. *Burns* 1993; 19: 401-5.

Greenhalgh DG, Sprugel KH, Murray MJ y cols. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *Am J Pathol* 1990; 136:1235-46.

Greenhalgh DG. The role of growth factors in wound healing. *J Trauma* 1996; 41:159-67.

Gregory WB Jr. Effect of insulin on the healing of bone wounds in albino rats. *J Dent Res* 1965; 44:487-92.

Grotendorst GR, Soma Y, Takehara K y cols. EGF and TGF-alpha are potent chemoattractants for endothelial cells and EGF-like peptides are present at sites of tissue regeneration. *J Cell Physiol* 1989; 139:617-23

Hanam SR, Singleton CE, Rudek W. The effect of topical insulin on infected cutaneous ulcerations in diabetic and nondiabetic mice. *J Foot Surg* 1983; 22:298-301.

Harding KG, Morris HL, Patel GK. Science, medicine and the future: healing chronic wounds. *Br Med J* 2002; 324:160-3.

Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999; 79:1283-316.

Hernandez CGS, Camacho GP. Problemas clínicos más comunes de las tortugas mantenidas como mascotas. *AMMVEPE* 2002; 13(2):56-64.

Hom DB, Linzie BM, Huang TC. The healing effects of autologous platelet gel on acute human skin wounds. *Arch Facial Plast Surg* 2007; 9:174-83.

Hrynyk M, Neufeld RJ. Insulin and wound healing. *Burns* 2014; 40:1433-46.

Ishida Y, Kondo T, Kimura A y cols. Absence of IL-1 receptor antagonist impaired wound healing along with aberrant NF-kB activation and a reciprocal suppression of TGF beta signaling pathway. *J Immunol* 2006; 176:5598-606.

- Jackson JT, Starkey DE, Guthrie RW y cols. A mitochondrial DNA phylogeny of extant species of the genus *Trachemys* with resulting taxonomic implication. *Chelonian Conservation and Biology* 2008; 7:131-35.
- Johnson DE, Williams LT. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 1993; 60:1-41.
- Kahn CR. The molecular mechanism of insulin action. *Ann Rev Med* 1985; 36:429-51.
- Kassem R, Trau H. The effect of topical insulin on the healing process of second degree burn in guinea pigs. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56: AB207.
- Keller KA, Paul-Murphy J, Weber III S y cols. Assessment of platelet-derived growth factor using a splinted full thickness dermal wound model in bearded dragons (*Pogona vitticeps*). *J Zoo Wildl Med* 2014; 45: 866-74.
- Kiritsy CP, Lynch SE. Role of growth factors in cutaneous wound healing: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4(5):729-60.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N y cols. Tissue Renewal, Regeneration, and Repair. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 8th ed, Philadelphia: Saunders Elsevier, 2010; 79-110.
- Lima MHM, Caricilli AM, Abreu LL y cols. Topical insulin accelerates wound healing in diabetes by enhancing the AKT and ERK pathways: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *Plos ONE* 2012; 7(5):1-13.
- Liu Y, Petreaca M, Yao M y cols. Cell and molecular mechanism of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing. *BMC Cell Biol* 2009; 10:1.
- Maderson PFA, Roth SI. A histological study of the early stages of cutaneous wound healing in lizards in vivo and in vitro. *J Exp Zool* 1972; 180:175-86.
- Maderson PFA. Some developmental problems of the reptilian integument. En: Gans C (ed) *Biology of reptilian*. New York: Wiley-Interscience Publications; 1995.

Madibally SV, Solomom V, Mitchell R y cols. Influence of insulin therapy on burn wound healing in rats. *J Surg Res* 2003; 109:92–100.

Marikovsky M, Breuing K, Liu PY y cols. Appearance of heparin binding EGF-like growth factor in wound fluid as a response to injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:3889-93.

Marikovsky M, Vogt P, Eriksson E y cols. Wound fluid-derived heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) is synergistic with insulin-like growth factor-I for Balb/MK keratinocyte proliferation. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 616-21.

Martson M, Viljanto J, Laippala P y cols. Cranio-caudal differences in granulation tissue formation: an experimental study in the rat. *Wound Repair Regen* 1999; 7:119-26.

Mateo MR, Roberts ED, Enright FM. Inflammation induced by subcutaneous turpentine inoculation of young American alligators (*Alligator mississippiensis*). *Am J Vet Res* 1984; 45:1870-5.

Maruyama K, Asai J, Li M y cols. Decrease macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing. *Am J Pathol* 2007; 170:1178-91.

Mauldin EA, Peters-Kennedy J. Integumentary System. En: Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Volume 1. 6th edition. Maxie MG editor, St. Louis, Missouri: Elsevier, 2015; 513-4.

McArthur S, Meyer J, Innis C. Anatomy and Physiology. En: MacArthur S, Wilkinson R, Meyer J. editors. *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*. Oxford: Blackwell Publishing, 2004; 93-9.

McGavin MD, Zachary JF. Pathologic Basis of Veterinary Disease. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2012; 135-46.

McFadden MS. Suture Materials and Suture Selection for Use in Exotic Pet Surgical Procedures. *J Exotic Pet Med* 2011; 20(3):173-81.

- Meredith A, Redrobe S (eds.). Manual de Animales Exóticos – Colección BSAVA. Lexus Editorial 2012.
- Mitchell MA, Diaz-Figueroa A. Wound management in reptiles. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 2004; 7:123-40.
- Morreale S.J, Gibbons JW. Habitat Suitability index Model: Slider Turtle. Biological Report 1986: 82 (10.125). National Ecology Center, U.S. Fish and Wildlife Service. Washington DC. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador A, Marco A (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Nagashima H, Shibata M, Taniguchi M y cols. Comparative study of the shell development of hard- and soft-shelled turtles. *J Anat* 2014; 225:60-70.
- Nayak BS, Ramdeen R, Adogwa A y cols. Wound-healing potential of an ethanol extract of *Carica papaya* (Caricaceae) seeds. *Int Wound J* 2012; 9: 650-5.
- Nissen NN, Polverini PJ, Gamelli RL y cols. Basic fibroblast growth factor mediates angiogenic activity in early surgical wounds. *Surgery* 1996; 119:457-65.
- Norton TM. Chelonians emergency and critical care. *Semin Avian Exot Pet Med* 2005; 14:106-30.
- Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2001; 2:3005.1-12.
- Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg* 2004; 187:115-165.
- Pelegrinelli FF, Thirone AC, Gasparetti AL y cols. Early steps of insulin action in the skin of intact rats. *J Invest Dermatol* 2001; 117(4):971-6.
- Perez J, Day MJ, Martin MP y cols. Immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate associated with feline cutaneous squamous cell carcinomas and precancerous lesions (actinic keratosis). *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 69:33-46.

- Perez-Tomas R, Balesta J, Pastor LM y cols. Comparative immunohistochemical study of the gastroenteropancreatic endocrine system of three reptiles. *Gen Comp Endocrinol* 1989; 76:171-91.
- Qiao L, Lu SL, Dong JY y cols. Abnormal regulation of neo-vascularization in deep partial thickness scalds in rats with diabetes mellitus. *Burns* 2011; 37:1015-22.
- Raskin RE. Reptilian complete blood count. In: *Laboratory Medicine – Avian and Exotic Pets*. Fudge AM editor, Philadelphia, PA: WB Saunders, 2000; 195-6.
- Reike JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res* 2012; 49:35-43.
- Risau W. Angiogenic growth factors. *Prog Growth Factor Res* 1990; 2:71-9.
- Ross R, Glomset J, Kariya B y cols. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71:1207-10.
- Sardari K, Mirshahi A, Maleki M y cols. Effects of topical allicin on second-intention wound healing in dogs (histological aspects). *Comp Clin Pathol* 2006; 15:98-102.
- Schneider A, Hanke W. Influence of insulin-like growth factors and insulin on the [35 S] sulfate uptake by cartilage of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Gen Comp Endocrinol* 1996; 104:92-102.
- Schreml S, Szeimies RM, Prantl L y cols. Wound healing in the 21st century. *J Am Acad Dermatol* 2010; 63:866-81.
- Seidel ME. Taxonomic observations on extant species and subspecies of slider turtles, genus *Trachemys*. *Journal of Herpetology* 2002; 36 (2):285-92.
- Seidel ME, Ernest CH. *Catalogue of American Amphibian and Reptiles* 2006; 831: 1-94.
- Simpson DM, Ross R. The neutrophilic leukocyte in wound repair. A study with antineutrophil serum. *J Clin Invest* 1972; 51:2009-23.

Singer AJ, Clark AF. Cutaneous wound healing. The New England Journal of Medicine 1999; 341 (10):738-46.

Smith DA, Barker IK, Allen OB. The effect of ambient temperature and type of wound on healing of cutaneous wounds in the common garter snake (*Thamnophis sirtalis*). Can J Vet Res 1988; 52:120-8.

Smith DA, Barker IK. Healing of cutaneous wound in the common garter snake. Can J Vet Res 1988; 52:111-9.

Strachan L, Murison JG, Prestidge RL, Sleeman MA, Watson JD, Kumble KD. Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily. J Biol Chem 2001; 276: 18265-71.

Swaim SF. Surgery of traumatized skin: Management and reconstruction in the dog and cat. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1980; 70-115.

Swaim SF, Henderson RA: Small Animal Wound Management, 2<sup>a</sup> ed., Baltimore, Williams & Wilkins, 1997; 87-90.

Swaim SF, Hinkle SH, Bradley DM. Wound contraction: basic and clinic factors. Compendium 2001; 23(1):20-33.

Tsahar E, Moyer JD, Waterman H y cols. Pathogenic poxviruses reveal viral strategies to exploit the ErbB signaling network. EMBO J 1998; 15:5948-63.

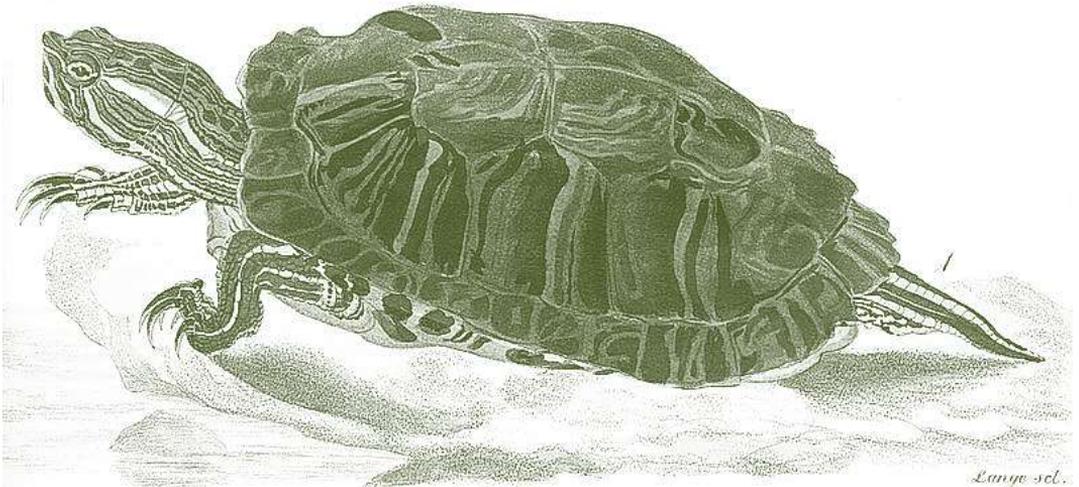
Tsao MC, Walthall BJ, Ham RG. Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. J Cell Physiol 1982; 110:219-29.

Tsirogianni AK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. Wound healing: immunological aspects. Injury 2006; 37(1):5-12.

Vella D. Management of freshwater turtle shell injuries. Lab Animal 2009; 38:13-4.

- Vogt PM, Lehnhardt M, Wagner D, Jansen V, Krieg M, S. Determination of endogenous growth factors in human wound fluid: temporal presence and profiles of secretion. *Plast ReconstrSurg* 1998; 102:117-23.
- Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003; 83:835-70.
- Whitby DJ, Ferguson MWJ. Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. *Dev Biol* 1991; 147:207-15.
- Wilmink JM, Van Weeren PR, Stolk PW y cols. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. *Equine Vet J* 1999; 31:61-7.
- White SD, Bourdeau P, Bruet V y cols. Reptiles with dermatological lesions: a retrospective study of 301 cases at two university veterinary teaching hospitals (1992–2008). *Vet Dermatol* 2010; 22:150-61.
- Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001; 37 (4):3-8.

# Anexo



*"La compasión por los animales está tan conectada con la bondad de carácter que podemos decir que quien es cruel con los animales no puede ser bueno."*

*Arthur Schopenhauer, filósofo (1788-1860)*



## 14. Anexo: autorización Comité de Ética



**UNIVERSIDAD DE CORDOBA**  
Vicerrector de Política Científica  
y Campus de Excelencia  
Justo P. Castaño Fuentes

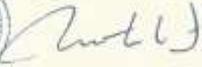


Prof. Dra. D<sup>a</sup>. Elena Mozos Mora  
Dpto. Anatomía y Anat. Patológica Comparadas  
Facultad de Veterinaria  
Edificio Sanidad Animal  
Campus de Rabanales  
Universidad de Córdoba

Reunido el Comité de Bioética para la Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba, se acordó informar favorablemente la solicitud para la evaluación de procedimientos experimentales con animales, presentado por el investigador responsable D<sup>a</sup>. Elena Mozos Mora Pérez, a desarrollar en el procedimiento experimental titulado **"ESTUDIO DE LA CICATRIZACIÓN EN LA PIEL DE QUELONIOS: EFECTO DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO PLAQUETARIOS Y DEL ACEITE OZONIZADO"**, dado que se ajusta a la legislación existente sobre experimentación animal (Directiva 2010/63/UE, y R.D. 53/2013, de 1 de febrero), en cuanto al diseño, idoneidad de la especie y número de animales seleccionados, así como el protocolo previsto en el que se garantiza la evitación de sufrimiento o dolor innecesario.

En Córdoba, a 19 de marzo de 2013

EL VICERRECTOR DE POLÍTICA CIENTÍFICA  
Y CAMPUS DE EXCELENCIA

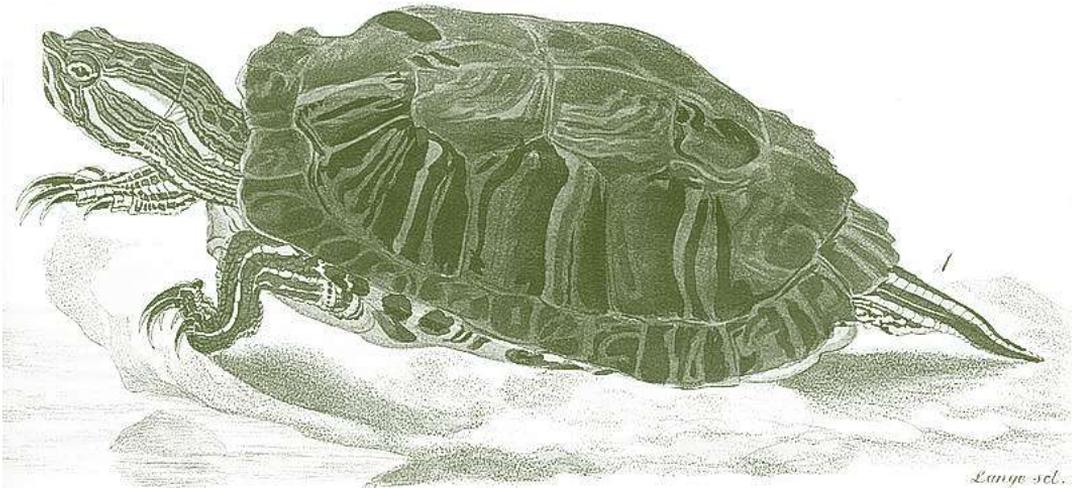


Fdo: Justo Pastor Castaño Fuentes  
Presidente del Comité de Bioética de la  
Universidad de Córdoba

Avda. Métrica Azahara, 5. 14071. Córdoba (España). Tel. +34 957 21 80 40. Fax. +34 957 21 80 88.



# Agradecimientos



*"El cristianismo nos cuenta la Gran Historia, y nos ayuda a encontrar  
nuestra pequeña historia de una nueva manera"*

*Alister E. McGrath. Biofísico y teólogo (1953)*



## 15. Agradecimientos

*A Dios por brindarme la oportunidad y la dicha de la vida, al proveerme los medios necesarios para continuar mi formación como veterinario, y siendo un apoyo incondicional para lograrlo ya que sin Él no hubiera sido posible.*

*A mis maestros que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como persona de bien y preparado para los retos que pone la vida, a todos y cada uno de ellos les dedico cada una de estas páginas.*

*Agradezco a mi amada y preciosa compañera de vida, mi esposa Elza. Mil gracias por acompañarme en este proceso, sobre todo por tu amor, comprensión, paciencia, fortaleza y fe que permitieron que pudiera, no sólo trabajar, sino también llegar a buen puerto. Contigo aprendo constantemente.*

*Quiero expresar mi agradecimiento a mis hijas e hijos, porque tuvieron que soportar la distancia y largas horas sin la compañía de su padre desde los tiempos de la graduación.*

*Agradezco a los hermanos de las iglesias de Córdoba y Granada porque con el ejemplo de muchos de ustedes aprendí, entre muchas otras cosas, que el cristianismo es una cuestión de vivencia más que de apariencia.*

*Quiero agradecer a mis compañeros y funcionarios del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Universidad de Córdoba por el apoyo y paciencia durante todos estos años.*

*Fundamentalmente agradecer a la Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elena Mozos Mora y al Prof. Dr. Pedro José Ginel Pérez, mis directores de tesis. Por la amistad, comprensión y apoyo. Por la confianza en mí depositada, disponibilidad y dedicación, ejemplo de trabajo, rigor científico y experiencia. Sus comentarios y apreciaciones hicieron que esta tesis resultara ser mil veces mejor de lo que se proyectó originalmente.*

*Al veterinario Rafael Guerra y todos los cuidadores del Zoológico de Córdoba, su cariño, atención y respeto para con los animales son un modelo y un incentivo para mi vida profesional.*

*A la dirección del Parque Zoológico Municipal de Córdoba por permitir el uso de sus instalaciones y animales.*

*A la Universidad Federal de Mato Grosso do Sul por el apoyo financiero, sin el cual sería imposible realizar este doctorado.*

*Y a todas las demás personas que de una manera u otra hayan hecho posible la elaboración de este trabajo: ¡muchísimas gracias!*