



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Inmunolocalización de
anticuerpos de proliferación
celular, apoptosis y
citoesqueleto en el intestino del
pez cebra

Eva Vizcaya Balboa

Grado en Veterinaria

Año 2024

Modalidad del Trabajo: experimental

Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Eva Vizcaya Balboa y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional”.



• RESUMEN:.....	4
• RESUMO:	4
• ABSTRACT:	5
1. INTRODUCCIÓN:	6
A) EL PEZ CEBRA EN LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA.....	6
B) ANATOMÍA DEL TUBO DIGESTIVO	7
C) HISTOLOGÍA DEL TUBO DIGESTIVO	8
D) INMUNOHISTOQUÍMICA.....	15
E) SALUD INTESTINAL	24
2. OBJETIVOS:	28
3. MATERIAL Y MÉTODOS:	28
4. RESULTADOS:.....	31
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:	38
6. BIBLIOGRAFÍA:.....	43

- **RESUMEN:**

El auge de la acuicultura ha resaltado la necesidad de comprender y optimizar la salud intestinal de los peces, ya que el intestino constituye una interfaz crucial entre el medio interno y externo. Las alteraciones, tanto en el medio externo como en el interno, pueden tener repercusiones negativas en la salud general de los animales de producción, lo que subraya la importancia de reforzar la salud intestinal. En este contexto, el pez cebra ha emergido como un modelo valioso en acuicultura, permitiendo la evaluación de dietas y aditivos dietéticos de manera más eficiente y económica que las pruebas directas en los animales de producción. En el presente trabajo, se ha utilizado esta especie como organismo modelo, para la evaluación de distintos marcadores relativos a la salud intestinal empleando la técnica inmunohistoquímica. En concreto, el objetivo de este trabajo es la puesta a punto de técnicas inmunohistoquímicas para la detección de caspasa 3, antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), citoqueratina AE1/AE3 y E-cadherina, en cortes histológicos de intestino de pez cebra, dado que los protocolos comerciales no estaban probados para esta especie. El estudio mostró que el PCNA se localiza principalmente entre los pliegues intestinales, áreas ricas en células indiferenciadas, indicando alta proliferación. La caspasa 3, un marcador de apoptosis, se encontró en células individuales distribuidas multifocalmente a lo largo del pliegue. La E-cadherina se observó en las áreas de contacto entre las células del epitelio, reflejando su papel en la adhesión celular. Por último, la citoqueratina AE1/AE3 fue positiva en el citoplasma de los enterocitos, con una coloración más intensa en la zona apical correspondiente al borde de cepillo, señalando la estructura del citoesqueleto en estas células. Los resultados mostraron que la inmunolocalización de los antígenos en el pez cebra fue muy similar a la reportada por otros autores en distintas especies, excepto en el caso de la caspasa 3, cuya distribución en el intestino pez cebra difería de la observada en el salmón por otros investigadores.

Palabras clave: pez cebra, intestino, inmunohistoquímica, E-cadherina, caspasa 3, PCNA, citoqueratina AE1/ AE3.

- **RESUMO:**

O auge da acuicultura resaltou a necesidade de comprender e optimizar a saúde intestinal dos peixes, xa que o intestino constitúe unha interface crucial entre o medio interno e externo. As alteracións, tanto no medio externo como no interno, poden ter repercusións negativas na saúde xeral dos animais de produción, o que subliña a importancia de reforzar a saúde intestinal. Neste contexto, o peixe cebra emerxeu como un modelo valioso en acuicultura, permitindo a avaliación de dietas e aditivos dietéticos de maneira máis eficiente e económica que as probas directas nos animais de produción. No presente traballo, utilizouse esta especie como organismo modelo para a avaliación de distintos marcadores relativos á saúde intestinal empregando a técnica inmunohistoquímica. En concreto, o obxectivo deste traballo é a posta a punto de técnicas inmunohistoquímicas para a detección de caspasa 3, antíxeno nuclear de células en proliferación (PCNA), citoqueratina AE1/AE3 e E-cadherina, en cortes histolóxicos de intestino de peixe cebra, dado que os protocolos comerciais non estaban probados para esta especie. O

estudo mostrou que o PCNA localizábase principalmente entre os pregues intestinais, áreas ricas en células indiferenciadas, indicando alta proliferação. A caspasa 3, un marcador de apoptose, atopouse en células individuais distribuídas multifocalmente ao longo do pregue. A E-cadherina observouse nas áreas de contacto entre as células do epitelio, reflectindo o seu papel na adhesión celular. Por último, a citoqueratina AE1/AE3 foi positiva no citoplasma dos enterocitos, cunha coloración máis intensa na zona apical correspondente ao bordo de cepillo, sinalando a estrutura do citoesqueleto nestas células. Os resultados mostraron que a inmunolocalización dos antíxenos no peixe cebra foi moi similar á reportada por outros autores en distintas especies, excepto no caso da caspasa 3, cuxa distribución no intestino do peixe cebra difería da observada no salmón por outros investigadores.

Palabras clave: peixe cebra, intestino, inmunohistoquímica, E-cadherina, caspasa 3, PCNA, citoqueratina AE1/ AE3.

• **ABSTRACT:**

The rise of aquaculture has highlighted the need to understand and optimize fish intestinal health, as the intestine constitutes a crucial interface between the internal and external environments. Alterations, both in the external and internal environments, can have negative repercussions on the overall health of production animals, underscoring the importance of strengthening intestinal health. In this context, the zebrafish has emerged as a valuable model in aquaculture, allowing for the evaluation of diets and dietary additives more efficiently and economically than direct testing in production animals. In this study, this species was used as a model organism for the evaluation of different markers related to intestinal health using immunohistochemistry. Specifically, the objective of this work is to establish immunohistochemical techniques for the detection of caspase 3, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), cytokeratin AE1/AE3, and E-cadherin in histological sections of zebrafish intestine, given that commercial protocols had not been tested for this species. The study showed that PCNA is mainly located between the intestinal folds, areas rich in undifferentiated cells, indicating high proliferation. Caspase 3, a marker of apoptosis, was found in individual cells distributed multifocally along the fold. E-cadherin was observed in the contact areas between epithelial cells, reflecting its role in cell adhesion. Finally, cytokeratin AE1/AE3 was positive in the cytoplasm of enterocytes, with more intense staining in the apical zone corresponding to the brush border, indicating the cytoskeletal structure in these cells. The results showed that the immunolocalization of the antigens in zebrafish was very similar to that reported by other authors in different species, except for caspase 3, whose distribution in the zebrafish intestine differed from that observed in salmon by other researchers.

Keywords: zebrafish, intestine, immunohistochemistry, E-cadherin, Caspase 3, PCNA, Cytokeratin AE1/ AE3.

1. INTRODUCCIÓN:

A) EL PEZ CEBRA EN LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez de agua dulce y pequeño tamaño (3 centímetros aproximadamente) originario del sudeste asiático y perteneciente a la familia Cyprinidae, clase Actinopterygii (Streisinger et al., 1981).

El inicio de su utilización en investigación data de la década de 1950, para el estudio en campos como la toxicología y la embriología (Cartner et al., 2019). Pero no fue hasta 1981, cuando George Streisinger estableció al pez cebra como modelo para la investigación científica (Streisinger et al., 1981).

El pez cebra fue seleccionado para este cometido por una serie de características deseables. En primer lugar, su reproducción es fácil, rápida y no es estacional, por lo tanto se pueden obtener embriones durante todo el año. Además, una única hembra produce cientos de huevos en una sola puesta, haciendo posible un número estadísticamente significativo de embriones estrechamente relacionados en un solo experimento (Streisinger et al., 1981).

La fecundación y todo el desarrollo subsiguiente ocurre en el agua, no en el interior de la madre, lo que facilita mucho la visualización de los distintos procesos. Además, los embriones son casi transparentes, de tal manera que, empleando los métodos microscópicos adecuados, es posible obtener imágenes de todas las células durante el desarrollo (Santoriello & Zon, 2012). Su desarrollo es rápido: la mayoría de órganos están formados 24 horas después de la fertilización (Santoriello & Zon, 2012), eclosionan en tres días y alcanzan la madurez sexual a los 3-4 meses, por lo tanto, se puede observar el desarrollo tanto de células individuales como de estructuras completas del interior del pez cebra. Su carácter es dócil, lo que permite su observación y manipulación a lo largo de todo el desarrollo (Kimmel et al., 1995).

El pez cebra, presenta además otra cualidad, la capacidad de regenerar tejidos como: la aleta, el cerebro, el corazón, la retina o la médula (Fujii et al., 2024).

Existe también, un grado relativamente alto de similitud genética entre el pez cebra y la especie humana, la comparación con el genoma de referencia humano muestra que alrededor del 70 % de los genes humanos tienen al menos un ortólogo en el pez cebra, lo que una vez más confirma la excelencia de este modelo animal (Howe et al., 2013).

Como desventaja, cabe destacar, que al tratarse de un animal no mamífero existen algunas diferencias fisiológicas y anatómicas. Por ejemplo, carecen de estructuras como la glándula mamaria o los pulmones (Santoriello & Zon, 2012).

Dicha especie se emplea como modelo en múltiples disciplinas como la biología del desarrollo (Vacaru et al., 2014), modelo para patologías como el cáncer (Wu et al., 2023) o enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica (Chia et al., 2022; Shenoy et al., 2022) y desarrollo de fármacos o valoración de toxicidad de toxinas, químicos o fármacos, entre otras (Lachowicz et al., 2023; Torres-Ruiz et al., 2021).

B) ANATOMÍA DEL TUBO DIGESTIVO

El tubo digestivo del pez cebra está dividido en diferentes porciones: la cavidad oral, seguida de la orofaringe y el esófago, que desemboca en el intestino. Este último se divide en tres partes: bulbo intestinal o intestino proximal, intestino medio y posterior. Finalmente, el sistema digestivo termina en el ano (Holden et al., 2013).

- CAVIDAD ORAL:

La cavidad oral es el inicio del tubo digestivo y su conexión proximal con el exterior. El pez cebra carece de glándulas salivares y lengua, pero sí están presentes células mucosas y papilas gustativas (Holden et al., 2013).

- OROFARINGE:

Se define la orofaringe como la porción del tracto digestivo comprendido entre la boca y el inicio del esófago. El límite distal está marcado por la presencia de los dientes faríngeos. El pez cebra, al igual que otros ciprínidos carece de dientes mandibulares orales, en su lugar, presenta una dentición faríngea bien desarrollada. Además, es un organismo polifiodonte, lo que significa que la dentición se reemplaza continuamente a lo largo de la vida del animal (Bruneel et al., 2015). Los dientes faríngeos del pez cebra se sitúan en los quintos ceratobranquiales. Se distribuyen en tres filas: una fila ventral compuesta por cinco dientes, una fila mediodorsal de cuatro dientes y una fila dorsal de dos dientes. Dichas filas se disponen simétricamente a cada lado del cuerpo, por tanto, el pez cebra presenta once dientes por cada lado, veintidós dientes en total (Bruneel et al., 2015). Dorsalmente, en la superficie faríngea, se encuentra una almohadilla epitelial queratinizada sobre la que se apoyan los dientes (Huyseune et al., 1998).

- ESÓFAGO:

El esófago es un órgano tubular que conecta la orofaringe con el intestino, más concretamente con el bulbo intestinal. En esta porción también se pueden encontrar algunas papilas gustativas dispersas. Cabe destacar que los peces cebra, son fisóstomos, es decir, regulan la cantidad de aire de su vejiga natatoria a través del denominado conducto neumático. Este conducto, conecta el esófago con la vejiga natatoria permitiendo dicha regulación (Holden et al., 2013).

- INTESTINO:

El intestino es un tubo largo que se pliega en dos ocasiones en el interior de la cavidad abdominal. Se divide en tres partes principales: intestino proximal o bulbo intestinal, intestino medio e intestino posterior. La luz del mismo va decreciendo en dirección caudal, siendo mayor en el bulbo intestinal (*figura 1*).

Como se ha mencionado con anterioridad, el intestino se puede dividir macroscópicamente en tres segmentos: el intestino anterior, el intestino medio y el intestino posterior (*figura 1*) (Wang et al., 2010; Xia et al., 2022).

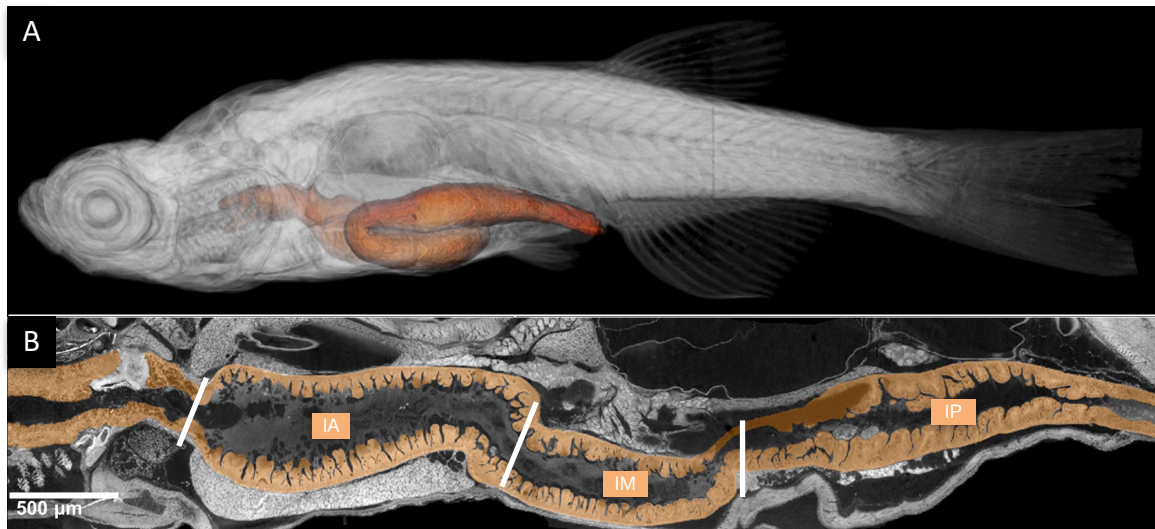


FIGURA 1: A. Representación 3D de un pez cebra juvenil entero (33 dpf) con el tracto gastrointestinal (GI) resaltado (Ding et al., 2019).

B. Corte longitudinal del intestino completo del pez cebra, en el que se indican las tres partes que los conforman: IA, intestino anterior, IM, intestino medio e IP, intestino posterior. Imagen modificada de Ding et al. (2019).

El pez cebra no presenta un estómago funcional, en su lugar se encuentra el bulbo intestinal, una porción dilatada del tracto digestivo que conecta el esófago y el intestino medio. Aunque no se llega a desarrollar estómago en ningún momento de la vida del animal (Cartner et al., 2019), se ha demostrado presencia génica de marcadores que indican diferenciación estomacal en otros vertebrados (Muncan et al., 2007). Sin embargo, se ha propuesto que, a pesar de la expresión de los genes, estos permanecen inactivados (Castro et al., 2013). Además, esta especie carece de ciegos pilóricos, estructuras que cumplen una función similar a la del intestino al contener enzimas y aumentar la superficie de absorción (Buddington & Diamond, 1986). Esto se debe a que tales estructuras solo se encuentran en animales con verdaderos estómagos.

El bulbo intestinal interviene en la absorción de nutrientes (principalmente de grasas) pero también actúa como reservorio de alimentos, lo que permite a los animales ingerir nutrientes de forma más espaciada (Holden et al., 2013).

En contraposición a lo anteriormente expuesto, en un estudio realizado por Wang et al. en 2010 (Wang et al., 2010), se divide el intestino del pez cebra en siete porciones (nombradas de S1-S7).

C) HISTOLOGÍA DEL TUBO DIGESTIVO

La histología digestiva del pez cebra es crucial para el entendimiento de la estructura y la función del sistema digestivo. Dado que se trata de un modelo animal en auge, es muy importante avanzar en el conocimiento sobre aspectos básicos, como la histología. A continuación se exponen las características principales de las porciones en las que divide el tracto gastrointestinal del pez cebra, a excepción del intestino: cavidad oral, orofaringe y esófago (tabla 1, figura 2, A y B).

PORCIÓN DEL APARATO DIGESTIVO	ESTRUCTURA DE LA PARED	TIPO DE EPITELIO	OTRAS CARACTERÍSTICAS
CAVIDAD ORAL (figura 2A)	Mucosa Submucosa Muscular (Mokhtar, 2021)	Epitelio escamoso estratificado (Abbate et al., 2016; Holden et al., 2013)	- Carece de glándulas salivales - Contiene células mucosas, células rodlet y papilas gustativas (Abbate et al., 2016; Holden et al., 2013).
OROFARINGE (figura 2B)	Mucosa: formada por el epitelio y la lámina propia Muscular: comienza a adquirir músculo estriado en su extremo distal. Adventicia (Holden et al., 2013)	Epitelio escamoso estratificado no queratinizado (Holden et al., 2013)	- Carece de glándulas salivales. - Contiene abundantes células mucosas y papilas gustativas. - Presenta dientes faríngeos , en la posición opuesta e ellos encontramos una almohadilla epitelial queratinizada. (Holden et al., 2013)
ESÓFAGO (figura 2B)	Mucosa: epitelio y lámina propia. Muscular: su porción proximal está rodeada por músculo esquelético estriado y la porción distal por músculo liso. Adventicia/ serosa (Holden et al., 2013)	Epitelio ciliado estratificado (Holden et al., 2013).	- Células mucosas muy abundantes. - Menor número de papilas gustativas que en la orofaringe. (Holden et al., 2013)

TABLA 1: resumen de las características histológicas principales de cavidad oral, orofaringe y esófago.

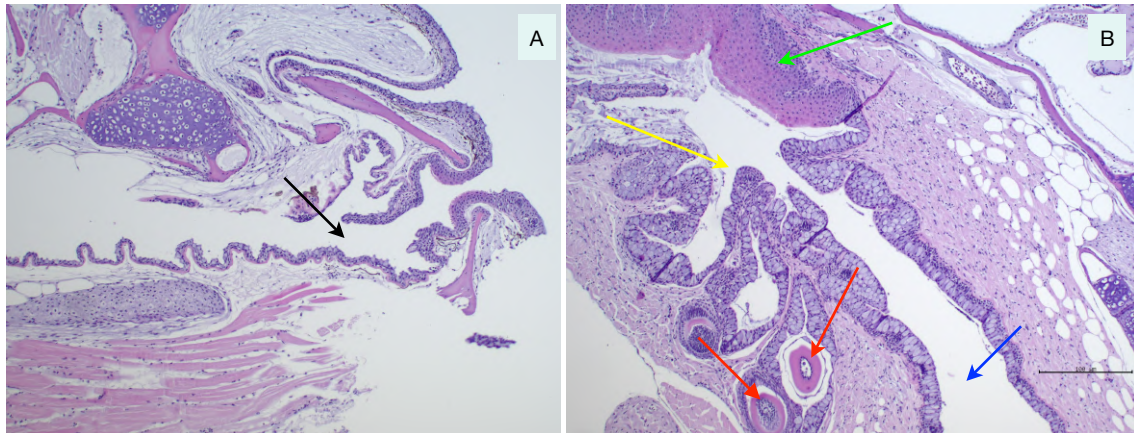


FIGURA 2A (izquierda): imagen de la cabeza de un pez zebra, en la que se indica con la flecha negra la cavidad oral.
 FIGURA 2B (derecha): imagen de la parte proximal del tubo digestivo de un pez cebra en la que se observa, orofaringe (flecha azul), dientes faríngeos (flecha roja), esófago (flecha amarilla) y almohadilla epitelial (flecha verde).

- INTESTINO:

La mucosa se organiza formando pliegues, los cuales están revestidos directamente por el epitelio. A diferencia de los mamíferos, no se encuentran presentes las vellosidades intestinales. (figura 3).

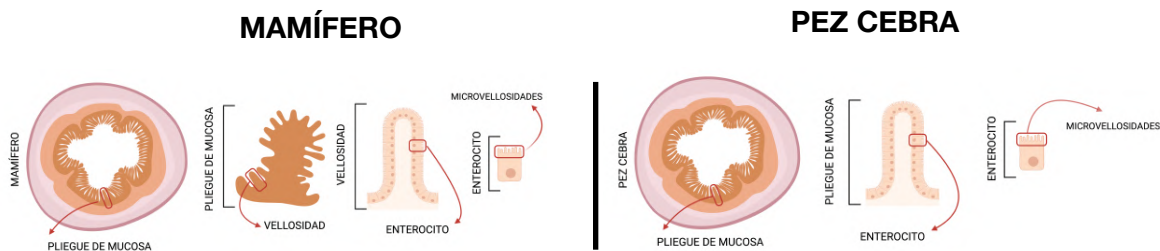


FIGURA 3: diferenciación entre la organización de la mucosa en mamíferos y en el pez cebra. Esquema propio creado con biorender.com.

La mucosa, a su vez está constituida por el **epitelio** y la **lámina propia** (figura 4A y 4B).

El **epitelio** de revestimiento intestinal es de tipo columnar simple. Está compuesto principalmente por enterocitos, células altas con núcleo ovalado situado en la parte media (Holden et al., 2013). En su superficie apical, los enterocitos presentan microvellosidades, cuya función principal es incrementar la superficie de absorción (Carten & Farber, 2009).

Además de los enterocitos, existen **otras células** que conforman el epitelio: las células **goblet**, las células **enteroendocrinas** (Wallace et al., 2005), las células **rodlet** y los **linfocitos** (Brugman, 2016).

- Las **células caliciformes o células goblet**, son el segundo tipo celular más abundante del intestino y su función principal es la producción de mucus (Wallace et al., 2005). El mucus tiene funciones asociadas a la protección frente a patógenos y toxinas. Los principales componentes del mucus son las mucinas: polímeros largos, densamente O-glicosilados. Los

cambios en la cantidad y las propiedades de las mucinas pueden conducir a una mayor susceptibilidad a las infecciones y contribuir a los trastornos del tracto gastrointestinal (Jevtov et al., 2014).

- **Las células enteroendocrinas** presentan un papel fundamental en la regulación del metabolismo. Intervienen en procesos como: la liberación de enzimas digestivas y de la bilis, regulación de la motilidad intestinal, detección de nutrientes y metabolitos microbianos, y la estimulación y supresión del apetito. Se ha observado que las células enteroendocrinas de los peces cebra expresan la mayoría de las hormonas que son secretadas por las células enteroendocrinas de los mamíferos (Lavergne et al., 2020).
- Los **linfocitos** participan en la respuesta inmunitaria y controlan la composición microbiana al suprimir eficazmente el crecimiento de algunas especies bacterianas en el intestino (Brugman et al., 2014).
- **Las células rodlet** fueron clasificadas como un parásito protozoario desde que Thélohan las descubrió en 1892 y las denominó *Rhabdospora thelohani*. Actualmente muchos autores han demostrado que estas células son componentes normales del epitelio intestinal, capaces de secretar glicoproteínas y participar en la respuesta inmunitaria (Karim et al., 2022).

A diferencia de los mamíferos, las criptas de Lieberkühn, están ausentes en el pez cebra y la renovación del epitelio, en su lugar, ocurre en los espacios entre los pliegues, ya que en estas áreas se pueden encontrar células más indiferenciadas (Li et al., 2020). Por tanto, se podrían considerar estas zonas en cierta manera, análogas de las mencionadas criptas (Holden et al., 2013). Este proceso de renovación consiste en la migración de las células epiteliales desde la base de los pliegues hasta la punta donde sufren apoptosis. La tinción de bromodesoxiuridina (BrdU) (nucleósido implicado en la proliferación celular (Taupin, 2007)) mostró que esta migración lleva de 5 a 7 días en el intestino anterior y de 7 a 10 días en el intestino medio (Brugman, 2016).

La lámina propia es una capa de tejido conectivo subyacente al epitelio (Wallace et al., 2005). Contiene capilares sanguíneos, fibras musculares y vasos linfáticos (Flores et al., 2020). A diferencia de los mamíferos, los peces carecen de **submucosa** y de **muscular de la mucosa** (Holden et al., 2013).

La muscular está constituida por dos capas de músculo liso: una más profunda **circular** y una más superficial **longitudinal** (Holden et al., 2013). El plexo de neuronas mioentéricas se encuentra entre las capas musculares longitudinal y circular, y regula la motilidad intestinal (Wallace et al., 2005).

La serosa es la capa más externa, se encuentra alrededor del músculo (Wallace et al., 2005).

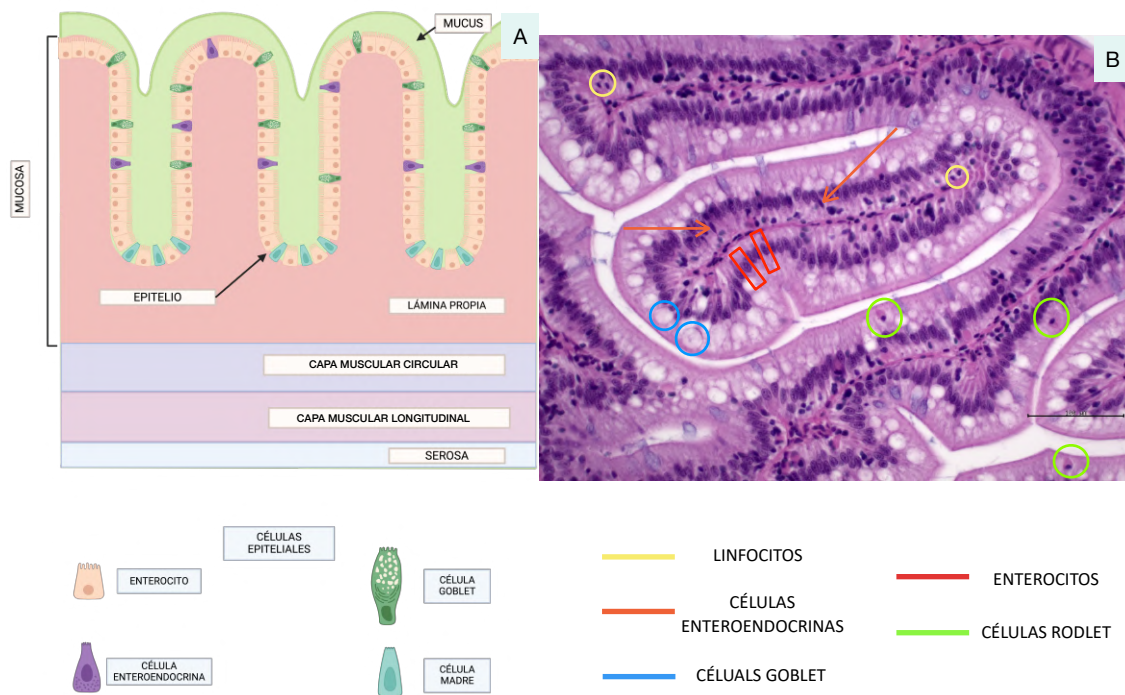


FIGURA 4A: representación de las distintas capas que conforman la pared intestinal y las células que constituyen el epitelio intestinal. Esquema propio creado con BioRender.com.

FIGURA 4B : corte histológico de un intestino de pez cebra teñido con hematoxilina- eosina, en el que se señalan varios tipos celulares presentes en los pliegues intestinales. 40 x, barra: 100 μ m.

Una vez establecidas las características generales del intestino, se describe a continuación las principales diferencias existentes entre las tres porciones que conforman el órgano. Dichas diferencias van a marcar las distintas funcionalidades de los tramos del intestino.

1. INTESTINO PROXIMAL O BULBO INTESTINAL:

Como se ha mencionado con anterioridad el **bulbo intestinal** presenta una luz de mayor tamaño. Las células goblet están presentes en mucha menor cantidad que en el esófago. La mucosa se pliega formando proyecciones bien desarrolladas que se encuentran finamente vascularizadas. Además de las células goblet o caliciformes, se observan linfocitos poco abundantes y células enteroendocrinas. No hay presencia de glándulas gástricas, por tanto, no se produce pepsina ni ácido clorhídrico (Holden et al., 2013). La ausencia de ácido clorhídrico indica que la acidificación no es necesaria para la digestión en estos animales (Harper & Lawrence, 2011). Por el contrario, las enzimas digestivas son abundantes en esta porción del intestino, esto sumado a un mayor desarrollo de los pliegues, les atribuye la función de absorción de nutrientes (Brugman, 2016).

2. INTESTINO MEDIO:

Las células mucosas están presentes y son un poco más abundantes que en la zona del bulbo intestinal. Los pliegues son prominentes, no hay glándulas presentes y la capa muscular y la serosa son continuas con las del bulbo intestinal (Holden et al., 2013). Al igual que en la

porción anterior del intestino, también hay elevada presencia de enzimas y solutos por lo que también tiene un papel importante en la absorción. Además, la parte final del intestino medio contiene células vacuoladas (tipo M), lo que indicaría que además de la absorción de nutrientes esta región presenta una función inmunitaria (Brugman, 2016).

3. INTESTINO POSTERIOR Y ANO:

En el intestino posterior los pliegues ya no son aparentes. Aquí, los enterocitos componen una sola capa de epitelio cuboidal. La ausencia de epitelio columnar como en los otros dos tramos de intestino indicaría que en esta región no hay presencia de enterocitos con función de absorción de nutrientes, pero si están implicados en la absorción de agua (Brugman, 2016). Aún se pueden observar algunas células mucosas, pero son mucho menos abundantes que en el tramo anterior. El intestino posterior termina en el ano (Holden et al., 2013).

En la tabla 2 se encuentra un breve resumen de las diferencias histológicas de los 3 principales tramos de intestino (tabla 2):

DIFERENCIAS ENTRE LOS DISTINTOS TRAMOS DEL INTESTINO				
	PLIEGUES	ENTEROCITOS	CÉLULAS GOBLET	FUNCIÓN
INTESTINO PROXIMAL	Bien desarrollados y finamente vascularizados	Enterocitos columnares	Menos abundantes que en el esófago	Absorción de nutrientes
INTESTINO MEDIO	Bien desarrolladas	Algunos enterocitos presentan vacuolas supranucleares	Más abundantes que en el intestino proximal	Absorción de nutrientes y función inmunitaria
INTESTINO POSTERIOR	Ausentes	Epitelio cuboidal	Menos abundantes que en el intestino medio	Absorción de agua

Tabla 2: principales diferencias entre los distintos tramos de intestino en pez cebra.

RESPUESTA INMUNITARIA INTESTINAL

El pez cebra posee tanto inmunidad innata como adquirida. Sin embargo, las larvas de pez cebra tienen únicamente inmunidad innata, ya que la inmunidad adquirida no se desarrolla hasta las cuatro o seis semanas después de la fertilización. El sistema inmunitario innato está constituido por macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, receptores tipo TLR y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y el sistema del complemento. Mientras que el sistema inmune adquirido está compuesto por linfocitos B y T (Flores et al., 2020).

Cuando un patógeno trata de acceder al organismo se topa en primer lugar, con la barrera física del epitelio, además del mucus y la microbiota. Todos los epitelios tienen un papel fundamental en la respuesta inmunitaria. En el intestino los leucocitos se distribuyen de forma ordenada,

formando el denominado GALT (tejido linfoide asociado al intestino) que permite una respuesta efectiva frente a infecciones y vacunaciones. El GALT en los peces comprende tanto linfocitos B como T presentes en la lámina propia o como linfocitos intraepiteliales (Beck & Peatman, 2015). También se identificó un tipo de célula, localizado en la sección media del intestino medio, que contenían grandes vacuolas capaces de almacenar contenido luminal. Podrían ejercer un papel en la respuesta inmunológica similar al desempeñado por las células M. Se postula que podrían transferir contenido luminal a las células inmunitarias que se encuentran dispersas debajo de la capa epitelial (Brugman, 2016). Es importante tener en cuenta que los peces cebra carecen de placas de Peyer y células M, propiamente dichas. En mamíferos, estas estructuras participan en la respuesta inmunológica: las células M se encuentran en el epitelio que cubre los tejidos linfoides asociados a la mucosa, como las placas de Peyer del intestino. Las células M transportan activamente antígenos lumbinales a los folículos linfoides subyacentes para iniciar una respuesta inmune (Kobayashi et al., 2019). Tampoco se ha demostrado la presencia de células de Paneth (producen péptidos y proteínas antimicrobianas y otros componentes que son importantes para la defensa y la inmunidad del huésped) (Holden et al., 2013; Wallaey, 2023).

MICROBIOTA

La microbiota intestinal es el conjunto de microorganismos que habitan en el tracto gastrointestinal del huésped. Muchos de estos microorganismos desempeñan funciones beneficiosas, como la regulación de la digestión, la absorción de nutrientes y la maduración del sistema inmunológico. La alteración del microbiota intestinal se ha asociado con una amplia variedad de enfermedades, incluyendo trastornos del neurodesarrollo, obesidad y enfermedades inflamatorias intestinales (Flores et al., 2020). Al igual que otros vertebrados, los peces cebra albergan una compleja comunidad de bacterias comensales en su tracto digestivo.

La adquisición de la microbiota intestinal ocurre después de la eclosión, derivando de microbios maternos y ambientales y diversificándose a lo largo del desarrollo. El análisis genómico ha mostrado que la microbiota intestinal del pez cebra comparte seis divisiones bacterianas con ratones y cinco con humanos. En peces cebra criados en laboratorio, la microbiota intestinal está dominada por Proteobacterias, mientras que en ratones y humanos predominan Firmicutes y Bacteroidetes (Zhao & Pack, 2017). Además, la microbiota desempeña un papel crucial en la respuesta inmunitaria. Durante la colonización del intestino larvario por parte de las bacterias comensales, estas puede preparar a las células inmunes innatas para enfrentar infecciones mediante un receptor de tipo Toll (TLR) y una vía dependiente de la respuesta primaria de diferenciación mielóide 88 (MyD88) (Flores et al., 2020).

D) INMUNOHISTOQUÍMICA

I. Introducción:

La inmunohistoquímica es una técnica histológica que permite detectar moléculas, constituyentes celulares o tisulares en secciones de tejido, empleando anticuerpos específicos, por medio de interacciones específicas antígeno-anticuerpo (Suvarna et al., 2019).

El **objetivo** general de todas las técnicas histológicas es una correcta identificación de los componentes celulares tanto normales como patológicos. Más concretamente, la técnica inmunohistoquímica permite: la detección específica de los antígenos, la preservación de detalles histológicos de los tejidos, de tal forma que permita detectar los antígenos objetivo en su localización concreta. Y el marcaje de antígenos suficientemente fuerte como para que sea fácilmente detectable durante la observación al microscopio (Valle, 2022).

Se emplea en **contextos** diversos, tanto diagnósticos como investigadores. En el ámbito diagnóstico se utiliza, sobre todo, en el campo de las enfermedades infecciosas y de procesos cancerosos (Eyzaguirre & Haque, 2008; Hornick, 2014). Mientras que, en la investigación, permite la detección de moléculas como proteínas u otros marcadores, lo que contribuyen a una mejor comprensión de la fisiología y patología de los distintos organismos.

La inmunohistoquímica es una técnica que presenta **limitaciones**, es un proceso exigente, con muchas variables posibles que pueden llevar a resultados falsos positivos o falsos negativos. Se deben tener en cuenta factores como (O'Hurley et al., 2014):

- Necesidad de **validar los anticuerpos para la técnica** que se vaya a llevar a cabo, en este caso la inmunohistoquímica.
- **Reactividad en la especie de interés.** Es importante comprobar que el anticuerpo está validado por el laboratorio para su uso en la especie de elección. En caso de no estar validado para la especie de interés, se deberán llevar a cabo pruebas propias para determinar si funciona o no. En algunos casos, cuando el anticuerpo está probado para una especie diferente a la objetivo se pueda realizar una comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína objetivo (antígeno). La finalidad es comparar ambas, con el propósito de ver el grado de conservación a lo largo de la evolución de la molécula que se desea detectar. Si la proteína está conservada, el anticuerpo podría funcionar, en caso contrario, es muy probable que el anticuerpo no se una al antígeno.

Incluso algunos laboratorios, aportan en la ficha técnica del anticuerpo la región específica del antígeno a la que se unen, facilitando la comparación. El pez cebra, aunque es un animal cuyo uso en investigación está en auge, presenta la dificultad añadida de que, en muchas ocasiones, los anticuerpos adquiridos, carecen de validación en dichos animales. Por tanto, es de gran importancia la optimización de la técnica en peces y más concretamente en el pez cebra.

Como paso previo al inicio de la técnica inmunohistoquímica se procede a la preparación de las muestras, empleando un **procesado rutinario de las muestras para histopatología** (Valle, 2022). Debido al proceso de fijación de los tejidos, en ocasiones, se produce el

enmascaramiento de los epítomos (lugares del antígeno donde se unirá el anticuerpo), evitando una unión adecuada de los anticuerpos, y por tanto evitando el marcaje de los antígenos objetivo. Con el fin de revertir este enmascaramiento se emplea la **recuperación antigénica**. También, se ha de realizar **bloqueo de enzimas endógenas** con el fin de evitar las interacciones entre estas enzimas y aquellas asociadas a los anticuerpos (anticuerpos conjugados). Las enzimas que permanecen unidas a los anticuerpos tienen un papel vital, al convertir el cromógeno en un producto de color visible al microscopio. Por último, en ocasiones se realiza un **bloqueo de sitios inespecíficos**, con el fin de evitar la unión de los anticuerpos a antígenos no objetivo y generar falsos positivos (Valle, 2022).

La inmunohistoquímica puede ser de dos tipos: directa o indirecta.

- **Método directo** (*figura 5*): en este caso se emplea un anticuerpo primario que se conjuga directamente con el marcador que permitirá su posterior visualización (enzima o fluoróforo). El anticuerpo primario marcado se une directamente al antígeno objetivo. Como ventajas, cabe destacar, que se trata de una técnica rápida y fácil, pero carece de la sensibilidad de otras técnicas y proporciona poca amplificación de señal (Suvarna et al., 2019).
- **Método indirecto** (*figura 5*): en este caso se emplea, además del anticuerpo primario no conjugado, un anticuerpo secundario conjugado. El **anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario** con la finalidad de permitir la visualización de la localización del antígeno de interés. De esta forma aumenta la amplificación de la señal y la sensibilidad. Se emplea con mayor frecuencia. La razón principal es la mayor sensibilidad de la técnica indirecta, ya que permite generar una tinción tisular más fuerte. La explicación más simple es que dos moléculas de anticuerpos secundarios pueden unirse simultáneamente a una molécula del anticuerpo primario. En otras palabras, la detección indirecta emplea dos veces más etiquetas de color que la detección directa (Kalyuzhny, 2016). Como desventaja principal, la técnica indirecta consta de un mayor número de pasos y por ello requiere de más tiempo (O'Hurley et al., 2014).
 - Es de gran importancia tener en cuenta que el **anticuerpo primario** se une al antígeno frente al que va dirigido. Lo ideal es que la especie del anticuerpo primario sea diferente a la del tejido para evitar la reactividad cruzada.
 - El **anticuerpo secundario** anticuerpo debe dirigirse contra la especie del anticuerpo primario, pero no ha de ser producido en esta misma especie. De tal forma que, si por ejemplo si el anticuerpo primario procede de un conejo, el anticuerpo secundario será contra conejo, pero procederá de una especie distinta al conejo (Valle, 2022).

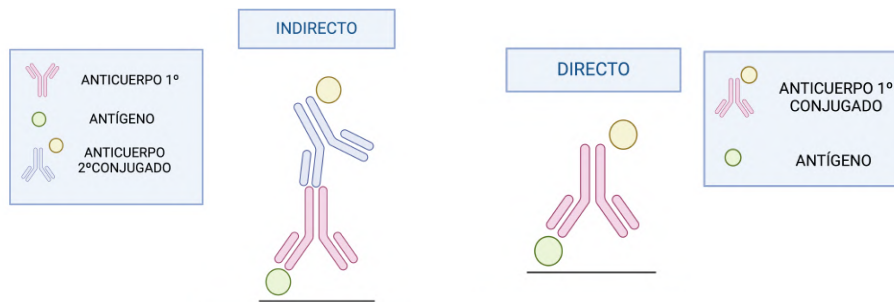


FIGURA 5: representación de las técnicas directa e indirecta en inmunohistoquímica. Esquema propio creado con BioRender.com.

Por último, se añade el cromógeno, que al reaccionar con la enzima asociada al anticuerpo (primario en la técnica directa y secundario en la indirecta) generará coloración que permitirá la visualización de la localización del antígeno, empleando el microscopio.

II. Fundamentos de la inmunohistoquímica

Para una comprensión óptima de la técnica inmunohistoquímica es necesario definir una serie de puntos básicos. En primer lugar, se definen los conceptos de antígeno y anticuerpo. A continuación, se indica la estructura y los tipos de anticuerpos existentes, así como, la clonalidad y los tipos de etiquetado que pueden presentar. Así mismo, se describe la unión antígeno- anticuerpo y las características que presenta.

El conocimiento de estos conceptos permitirá tanto una adecuada selección de los anticuerpos, como una interpretación adecuada de los resultados obtenidos y una identificación de los posibles problemas que se produzcan (Ramos-Vara, 2017).

A. ANTÍGENOS

Los antígenos son moléculas que inducen la formación de anticuerpos. Pueden presentar uno o más sitios de unión a los anticuerpos. Estas regiones topográficas altamente específicas están compuestas por un pequeño número de aminoácidos o unidades de monosacáridos y se denominan **grupos determinantes antigénicos o epítopos** (figura 6) (Tizard, 2009).

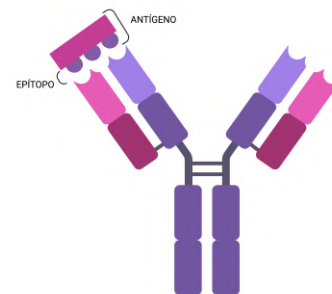


FIGURA 6: antígeno uniéndose a un anticuerpo. Esquema propio creado con BioRender.com.

B. ANTICUERPOS

Los anticuerpos son glicoproteínas producidas por los linfocitos B en presencia de antígenos (Beck & Peatman, 2015). Los términos anticuerpo e inmunoglobulina a menudo se usan indistintamente. Se encuentran en fluidos orgánicos como la sangre, así como en muchas secreciones.

- ESTRUCTURA DE LOS ANTICUERPOS:

La unidad básica de cada anticuerpo es un monómero; los anticuerpos pueden ser monoméricos, diméricos, triméricos, tetraméricos o pentaméricos. El monómero, se

compone de dos cadenas pesadas y dos ligeras. Ambos tipos de cadena de polipéptidos permanecen unidos mediante enlaces disulfuro y dan lugar a una estructura en forma de Y. Tanto en las cadenas pesadas como en las ligeras se diferencian regiones constantes (no existe variabilidad entre anticuerpos) y variables (existe variabilidad entre anticuerpos). Las cadenas ligeras presentan un dominio variable y un dominio constante. Mientras que, las cadenas pesadas presentan un dominio variable, tres o cuatro constantes y una región bisagra. Las regiones terminales o dominios variables de cada brazo difieren en la secuencia de aminoácidos. Esta variabilidad proporciona especificidad para un epítipo en particular y permite que el anticuerpo se una específicamente al antígeno (figura 7) (Tizard, 2009).

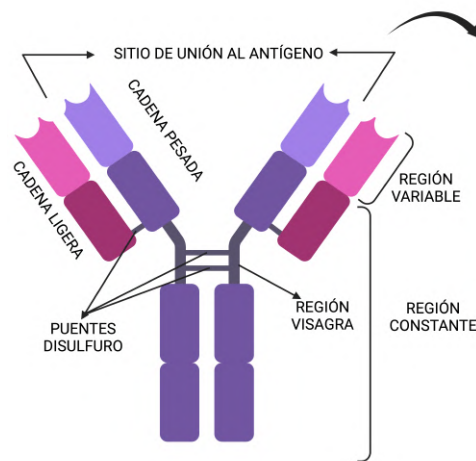


FIGURA 7: descripción de las distintas partes que componen un anticuerpo. Esquema propio creado con BioRender.com.

- TIPOS DE ANTICUERPOS:

Se distinguen cinco tipos de anticuerpos que se encuentran en la sangre de los vertebrados superiores: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (Suvarna et al., 2019), aunque en los teleósteos solo están presentes tres isotipos de inmunoglobulinas: IgM, IgZ e IgD. Sin embargo, los mecanismos básicos para la generación de la diversidad de inmunoglobulinas son similares en los teleósteos y los vertebrados superiores (Bilal et al., 2021).

- UNIÓN ANTÍGENO- ANTICUERPO:

Las cadenas laterales de aminoácidos del dominio variable de un anticuerpo forman un sitio similar a una cavidad que es geométrico y químicamente complementario al epítipo del antígeno. Se ha utilizado la analogía de una cerradura (anticuerpo) y la llave (antígeno), y el ajuste preciso requerido explica el alto grado de especificidad de anticuerpo-antígeno que se observa. El anticuerpo y el antígeno asociados se mantienen unidos por una combinación de enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y fuerzas de Van der Waals (Suvarna et al., 2019).

C. DEFINICIÓN DE CONCEPTOS: LA ESPECIFICIDAD Y LA SENSIBILIDAD.

Existen dos conceptos que es importante diferenciar y son: la especificidad y la sensibilidad. La **especificidad** es la capacidad de un anticuerpo para unirse selectivamente a un solo epítipo en un antígeno (Suvarna et al., 2019). De esta manera, a mayor especificidad se obtiene un menor número de falsos positivos en los resultados.

La **sensibilidad** es la cantidad relativa de antígeno que una técnica IHC es capaz de detectar.

Una técnica con alta sensibilidad es capaz de detectar cantidades más pequeñas de antígeno que una técnica con baja sensibilidad. Si se utiliza para detectar la misma cantidad de antígeno, la técnica con alta sensibilidad produciría una señal más grande que un método con baja sensibilidad (Suvarna et al., 2019).

D. CLONALIDAD DE LOS ANTICUERPOS

Existen dos tipos de anticuerpos: **monoclonales** o **policlonales**.

Los anticuerpos **monoclonales** se producen en ratones. El proceso para la obtención del anticuerpo consiste en la inoculación de un inmunógeno purificado (antígeno). Tras la producción de la respuesta inmune se cosechan un único linfocito B (células productoras de anticuerpos) en el bazo o la médula ósea. Los linfocitos B tienen una vida limitada, por lo que se combinan con células del mieloma del ratón. Las células resultantes son inmortales y producen anticuerpos específicos para un solo tipo de epítipo del antígeno (O'Hurley et al., 2014).

Los anticuerpos **policlonales** se producen en múltiples especies como: conejos, caballos, cabras y pollos. Estos anticuerpos presentan mayor afinidad que los monoclonales, ya que tienen la capacidad de unirse a distintos epítopos del antígeno. También, debido a esta característica, presentan menor especificidad (Magaki et al., 2019). Como en el caso anterior, su producción comienza con la inmunización del animal con un inmunógeno purificado, el sistema inmune genera linfocitos B que se diferenciarán en células plasmáticas, capaces de producir los anticuerpos que se encontrarán en el suero. Posteriormente, los anticuerpos se cosechan sangrando al animal, obteniéndose un suero rico en inmunoglobulinas. Es probable que el animal produzca numerosos clones de linfocitos B plasmáticos, a través de las cuales se obtienen una mezcla de inmunoglobulinas para distintos epítopos del mismo antígeno (O'Hurley et al., 2014).

En la siguiente tabla (*tabla 3*), se destacan las principales diferencias entre los anticuerpos policlonales y los monoclonales:

DIFERENCIAS ENTRE ANTICUERPOS POLICLONALES Y MONOCLONALES					
POLICLONALES	Se obtiene una población heterogénea de Ac para un antígeno concreto	Producidos por diferentes clones de linfocitos B	No requiere líneas celulares de hibridoma	Los Ac obtenidos pueden unirse a distintos epítopos del antígeno	Menor especificidad Mayor sensibilidad
MONOCLONALES	Se obtiene una población homogénea de Ac para un antígeno concreto	Producidos por clones de un mismo linfocito B	Requiere líneas celulares de hibridoma	Los Ac obtenidos pueden unirse a un único epítipo del antígeno	Mayor especificidad Menor sensibilidad

Tabla 3: resumen de las diferencias principales entre anticuerpos monoclonales y policlonales.

E. ETIQUETADO

En el etiquetado o conjugado de los anticuerpos se puede realizar de dos maneras: empleando anticuerpos marcados con **fluoróforos** (inmunofluorescencia) o a través de **enzimas** (unidas al anticuerpo primario o secundario) que permiten la reacción del cromógeno, y por tanto la visualización de la localización de los antígenos (inmunohistoquímica enzimática) (Valle, 2022).

La **inmunofluorescencia** se basa en la utilización de fluoróforos como marcadores. Los fluoróforos son etiquetas fluorescentes que, cuando se conjugan con el anticuerpo, absorben la luz ultravioleta o visible para alcanzar un estado excitado inestable. Posteriormente, el fluoróforo emite luz a medida que los electrones regresan a su estado fundamental (Im et al., 2019).

Se pueden emplear tanto métodos de detección directa como indirecta. En la forma directa, el fluoróforo se conjuga directamente al anticuerpo primario que a su vez permanecerá unido al epítipo objetivo. Por el contrario, en el método indirecto se emplea un proceso de incubación en dos pasos: en primer lugar, el anticuerpo primario se une al epítipo objetivo y posteriormente se añade un anticuerpo secundario etiquetado con fluoróforo que se une al anticuerpo primario. Aunque el método directo es más rápido, el método indirecto presenta una mayor sensibilidad y permite amplificación de señal (Im et al., 2019).

Para la observación de las muestras es imprescindible disponer de un microscopio de campo oscuro, que va acompañado de filtros adecuados y de una fuente de luz ultravioleta para visualizar los fluoróforos de uso rutinario (Valle, 2022).

La **inmunohistoquímica enzimática**, se basa en el marcaje de los anticuerpos con enzimas, cuya función es reaccionar con el cromógeno, generando un compuesto estable y de color que permita la observación de la localización del antígeno objetivo, empleando el microscopio. Como en la inmunofluorescencia, la técnica puede realizarse de dos formas: directa o indirecta. En la técnica de detección directa el anticuerpo marcado con la enzima correspondiente es el primario, y este reacciona directamente con el antígeno presente en el tejido. Por el contrario, en la técnica indirecta, es el anticuerpo secundario el que permanece marcado con la enzima. Esta técnica, aunque requiere más tiempo, permite amplificación de la señal. Las etiquetas enzimáticas más empleadas incluyen la peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa alcalina (Valle, 2022).

En el caso de las inmunohistoquímicas de tipo enzimático, tras la incubación de los anticuerpos y sus respectivos lavados, se añade el cromógeno. Se trata de un compuesto incoloro que tras una reacción química se convierte en un compuesto coloreado, marcando aquellas zonas donde se encuentre el antígeno objetivo. Esta reacción química ocurre gracias a las enzimas. Los cromógenos más comunes generan color marrón, rojo o azul. La elección tanto de la enzima como del cromógeno dependerá de varios factores como: la presencia o ausencia de pigmentos endógenos, la intensidad de la reacción, la ubicación de los anticuerpos, los medios de montaje utilizados o preferencias personales (Ramos-Vara, 2005).

- **Para la peroxidasa de rábano picante**, el sustrato más empleado es el tetracloruro de 3,3'diaminobenzidina (DAB) (*figura 8*), este genera color marrón y es insoluble en disolventes orgánicos, dato que es importante conocer para el posterior montaje de las muestras. Otro cromógeno, es el 3-Amino-9-etilcarbazol (AEC), que produce color rojo, es soluble en disolventes orgánicos pero insoluble en agua. También se puede emplear 4-cloro-1-naftol, precipita como un producto azul que es soluble en disolventes orgánicos (Ramos-Vara, 2005).
- **Para la fosfatasa alcalina** el cloruro de tetrazolio 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/ nitro azul (BCIP/NBT; coloración azul, medio permanente), el rojo rápido (medio de montaje rojo y acuoso) y la fucsina nueva (fucsia y medio permanente) son los cromógenos más utilizados (Ramos-Vara, 2005).

- (I) Muestra de tejido. (II) Realización de la técnica inmunohistoquímica. (III) Resultado del revelado empleando el cromógeno DAB.

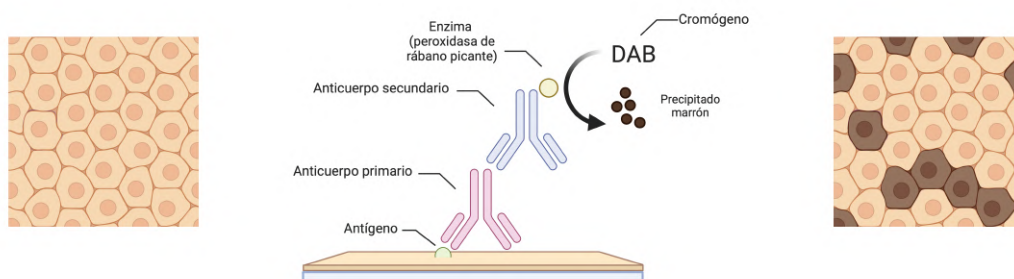


FIGURA 8: representación del funcionamiento del cromógeno DAB. Creado con BioRender.com.

III. Aspectos prácticos a tener en cuenta en la técnica inmunohistoquímica:

Una vez definidos los conceptos básicos, a continuación, se describen los fundamentos de los puntos críticos de la técnica inmunohistoquímica.

A. PROCESADO HISTOLÓGICO RUTINARIO:

La preparación de las muestras comprende procesos como la fijación del tejido, deshidratación, aclarado, infiltración, inclusión y corte del mismo. El fijador más comúnmente empleado es el formaldehído tamponado al 10%. La deshidratación consistirá en introducir la muestra en concentraciones crecientes de alcoholes, para posteriormente continuar con el aclarado, que sustituirá el alcohol por un disolvente orgánico como el xileno. Tras este proceso, las muestras se incluyen en parafina líquida para su corte empleando el microtomo. Los portaobjetos sobre los que se depositan la muestra han de estar tratados, por ejemplo por silanizado, para favorecer la adhesión de las muestras (Ramrus, 2004; Suvarna et al., 2019).

Antes de iniciar el proceso de la inmunohistoquímica, se realiza desparafinado y rehidratación de las muestras, que consisten en introducir los cortes de las muestras, ya sobre sus portaobjetos, primero dos veces en xileno y a continuación en alcoholes con concentración decreciente para terminar colocando las muestras en agua destilada (Ramos-Vara, 2017).

En ocasiones, es necesario realizar una decalcificación del tejido antes del fijado, por ejemplo, si existe hueso u otros tejidos duros, ya que, de esta manera, se facilita el corte (Suvarna et al., 2019).

B. RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA

Aunque en la década de 1970 se pensaba que el procesamiento rutinario de las muestras (fijación con formol e inclusión en parafina) ocasionaba la pérdida de muchos epítomos y que por tanto nunca podrían demostrarse a través de la inmunohistoquímica, se ha visto que esto no es así. Como se ha mencionado con anterioridad, el procesado de la muestra puede ocasionar el enmascaramiento (no destrucción) de los antígenos, debido a la formación de enlaces intermoleculares e intramoleculares, imposibilitando su observación (Suvarna et al., 2019). Por tanto, es necesario llevar a cabo una recuperación antigénica. Este proceso consigue devolver a las proteínas a su estructura antes de la fijación y de esta manera recuperar la antigenicidad (Ramos-Vara, 2017). Se ha de tener en cuenta que el proceso de recuperación antigénica no siempre es necesario y se debe consultar en cada caso (Ramos-Vara, 2017).

Se distinguen dos tipos de **recuperación antigénica: enzimática e inducida por calor**.

- La **recuperación enzimática**, se lleva a cabo a través de enzimas proteolíticas. A través de la eliminación de la reticulación y la agregación y precipitación de las proteínas generada por la fijación, los antígenos quedan expuestos (Varone et al., 2012). Las enzimas que se emplean con mayor asiduidad son la tripsina y la proteinasa K. Es importante ajustar factores como la temperatura, el tiempo, la concentración de la enzima y la duración de la fijación, para optimizar el resultado. Se ha de tener en cuenta que no es apta para todos los tejidos ya que puede dañarlos, su elección dependerá del anticuerpo escogido y debe ser revisado en cada caso (Suvarna et al., 2019).
- La **recuperación inducida por calor** ha desplazado en gran medida a la recuperación enzimática. Existen numerosas teorías sobre su funcionamiento, a continuación, se describen dos ejemplos. En primer lugar, se ha propuesto que los enlaces formados durante la fijación por formalina, se rompen a temperaturas por encima de 100° centígrados. También se propone, que el calor elimina las bases de Schiff más débiles, sin afectar a los puentes de metileno. Ya que durante la fijación con formalina los puentes de metileno y las bases de schiff forman enlaces intramoleculares. Esta recuperación se puede realizar empleando distintos mecanismos, como: microondas, olla a presión, vaporera o baño de agua (Suvarna et al., 2019).

En la recuperación antigénica por calor las muestras son colocadas en cubetas donde permanecen sumergidas en soluciones, durante la administración del calor. Dichas soluciones son tampones que pueden presentar varios pH: citrato (pH 6), EDTA (pH 8) o Tris- EDTA (pH 9) (Suvarna et al., 2019).

C. BLOQUEO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA INTERNA

Las enzimas son los marcadores más empleados en inmunohistoquímica. Estas moléculas, que se encuentran asociadas al anticuerpo primario o secundario (en función de si la técnica es

directa o indirecta), permiten la unión del cromógeno y por tanto la visualización de la localización del antígeno. Es muy importante conocer la enzima que se va a emplear en el marcaje de la técnica ya que las enzimas endógenas análogas, influyen en su actividad y por ellos es necesario realizar un bloqueo de las mismas. La enzima más comúnmente empleada para esta función es la **peroxidasa**, por tanto, será necesario bloquear su actividad endógena. De forma normal la peroxidasa se encuentra, sobre todo, en polimorfonucleares neutrófilos y células mieloides (Suvarna et al., 2019).

La **fosfatasa alcalina** es la principal alternativa a la peroxidasa, se encuentra principalmente en intestino, riñón y tejido linfoide. En este caso se debe tener en cuenta que, si se emplea fijación con formol e inclusión en parafina, este proceso inactiva la enzima. De esta forma, no será necesario su inactivación si se emplea esta enzima en el marcaje (Valle, 2022).

Por último, si se emplean métodos basados en la **biotina** o la **estraptovidina** será necesario el bloqueo de la actividad endógena de la biotina. Esta se encuentra principalmente en: hígado, riñón y tejido linfoide (Valle, 2022).

D. BLOQUEO INESPECÍFICO

La función del bloqueo inespecífico es evitar la unión de los anticuerpos a epítomos no objetivo que van a estar presentes en la muestra. De esta forma se previene la unión inespecífica y la aparición de posibles falsos positivos. En general, las soluciones de bloqueo se dividen en las siguientes categorías: soluciones proteicas, sueros normales y tampones comerciales libres de proteínas (Im et al., 2019).

Las soluciones de bloqueo proteicas están constituidas por proteínas que se unirán a otras proteínas de la muestra, de tal forma que los anticuerpos se verán obligados a competir con las proteínas de bloqueo. Los ejemplos comunes incluyen la albúmina sérica bovina (BSA), la leche seca sin grasa y la gelatina (Im et al., 2019).

Al emplear sueros normales, se ha de tener en cuenta que deben ser de la misma especie que el anticuerpo secundario. Si por el contrario se empleara una solución de bloqueo con anticuerpos criados en la misma especie que el anticuerpo primario, los anticuerpos secundarios podrían unirse de forma inespecífica a anticuerpos pertenecientes al suero normal y no al anticuerpo primario (Im et al., 2019).

E. CONTRASTE

Tras la adición del cromógeno y por tanto la aparición del marcaje de los antígenos de interés es necesario la realización de una **contratinción**. Esta tinción nos permite contrastar el tejido del fondo con los lugares marcados por el cromógeno. La contratinción más comúnmente empleada es la hematoxilina, aunque es importante tener en cuenta que el color debe contrastar con el del cromógeno (Valle, 2022).

F. DESHIDRATACIÓN Y MONTAJE

Por último, se lleva a cabo la **deshidratación y el montaje**. Para la deshidratación, se emplean concentraciones crecientes de alcohol (etanol) y por último dos inmersiones en xileno. De esta

manera se elimina el agua de la muestra y evitamos su degradación (Ramos-Vara, 2017).

Para el montaje, se emplea un medio de montaje y un cubreobjetos. El medio de montaje rellenará el espacio entre la muestra y el cubreobjetos, preservando el estado de la misma. Una vez finalizado el proceso permite observar las muestras al microscopio.

E) SALUD INTESTINAL

La acuicultura ha emergido como una industria de creciente importancia y expansión, impulsada por el crecimiento poblacional global y la declinación de la pesca tradicional (Ahmad et al., 2021). Sin embargo, la domesticación de las especies utilizadas aún no ha alcanzado el nivel de desarrollo de la industria ganadera más establecida, como la producción de ganado vacuno o aves de corral. El aumento de la demanda, asociado con un incremento en el volumen de producción y una reducción de los precios, ha generado tensiones con la capacidad productiva y la adaptación a entornos de producción más intensivos de los animales. Esto ha provocado una mayor incidencia de brotes de enfermedades, con consecuencias tanto para los animales como para la economía, además de afectar la percepción pública de la industria. En última instancia, el objetivo de la industria acuícola es optimizar los parámetros ambientales, las dietas y la genética, con el fin de reducir significativamente los episodios de enfermedades, pues priorizar la salud animal es una necesidad apremiante (Beck & Peatman, 2015).

Las superficies mucosas juegan un papel crucial en la salud animal, ya que constituyen la primera barrera de defensa contra los patógenos y son clave en procesos fisiológicos vitales como la absorción de macro y micronutrientes, la excreción de desechos y la osmorregulación (Beck & Peatman, 2015). A diferencia de los órganos inmunológicos convencionales, como el bazo y el riñón, las superficies mucosas son accesibles a través de tratamientos de inmersión o cambios en la dieta, lo que permite estrategias personalizadas para mejorar la salud de las mucosas y, por ende, del organismo en su totalidad. De hecho, numerosas áreas de investigación en acuicultura en la última década han dependido en gran medida de una mejor comprensión de las mucosas (Bøgwald & Dalmo, 2019; Nimalan et al., 2022; Yu et al., 2020).

El tracto gastrointestinal es la interfaz exclusiva entre todo lo que los peces ingieren del medio ambiente, siendo responsable de la absorción de todos los micro y macronutrientes, la extracción y exclusión de toxinas y desechos, y el metabolismo y la biosíntesis de moléculas críticas (Ostrander, 2000). El intestino, además, desempeña un papel crucial en la respuesta inmunitaria debido a la presencia del tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés) (Beck & Peatman, 2015). En particular, las alteraciones en el entorno interno o externo pueden afectar rápidamente la barrera intestinal, lo que a su vez impacta la salud intestinal y, a largo plazo, el bienestar general de los peces. Por otro lado, es crucial profundizar en estos conocimientos para mantener e incluso fortalecer la salud intestinal y el bienestar general de los peces de cultivo y de laboratorio. En este sentido, las empresas de alimentación en acuicultura tienen un gran interés en encontrar soluciones para mejorar la nutrición y la salud

de los peces mediante el uso de aditivos dietéticos que permitan promover la eficiencia alimentaria, el crecimiento y la salud intestinal de los peces (Dawood et al., 2018). Sin embargo, evaluar un gran número de dietas en especies acuícolas es costoso y requiere tiempo. En este sentido, el pez cebra ha crecido como modelo en biomedicina y, en menor medida, en la investigación acuícola, y permite evaluar los efectos de diferentes dietas en la salud intestinal de los peces (Ulloa et al., 2014).

Existen diferentes métodos para la determinación de la salud intestinal como: el estudio morfológico y morfométrico del intestino (Fleming et al., 2010), la caracterización de la microbiota (Rolig et al., 2017), la evaluación de la de respuesta inflamatoria (Fleming et al., 2010; Oehlers et al., 2010), o la caracterización de marcadores de apoptosis y proliferación celular (Guerra-Varela et al., 2018; Oehlers et al., 2010) y de las proteínas de unión y del citoesqueleto (Dale et al., 2009; Ronza et al., 2020), entre otros. En relación a estos últimos parámetros, se ha visto que el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) puede ser un marcador útil para la valoración de la proliferación celular, mientras que la determinación de la caspasa 3 se ha utilizado para la detección de células en apoptosis (Guerra-Varela et al., 2018; Oehlers et al., 2010). Por otro lado, las proteínas E-cadherina y citoqueratina AE3/ AE1 son importantes marcadores del estado de las uniones intercelulares y del citoesqueleto de las células del epitelio, respectivamente (Dale et al., 2009; Ronza et al., 2020). Una de las principales técnicas para determinar la presencia de estas moléculas es la inmunohistoquímica, que permite estudiar los marcadores en el contexto tisular dando una visión global de los eventos que ocurren en el intestino. Sin embargo, antes de la utilización de la técnica en especies animales para las que no están probadas, es necesario la puesta a punto de dichas técnicas en las especies de interés, con el fin de obtener resultados fiables.

ANTÍGENOS RELACIONADOS CON LA PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS CELULAR

El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) interviene en el proceso de replicación del ADN. Se trata de una proteína de forma toroidal que rodea la doble hélice del ADN y puede desplazarse bidireccionalmente sobre ella. Se encuentra asociada a la enzima ADN polimerasa y su función es sujetarla a la cadena de ADN, de tal forma que aumente la procesividad de la enzima (cantidad de nucleótidos añadidos antes de disociar el complejo que forma con la enzima) (Kelman, 1997). El PCNA participa, principalmente, en la **replicación y reparación del ADN** y en el **control de ciclo celular**, pero también en procesos como la apoptosis, el metabolismo de la cromatina y la expresión de genes (Maga & Hübscher, 2003). Al tratarse de una proteína asociada esencialmente a la replicación del ADN, la mayor parte de las interacciones ocurren en la fase S (o de replicación celular) o en la transición entre el final de la fase G1 (la célula se prepara para dividirse) y el inicio de la fase S (Zessin et al., 2016).

Distintos estudios relativos a la salud intestinal han empleado el PCNA como marcador en múltiples especies de peces. En ellos se valoraron los cambios producidos en el marcador en distintos escenarios como: modificaciones en la dieta (Sanden et al., 2005), infección por

acantocéfalos (Dezfuli et al., 2012), diagnóstico de cáncer (Dale et al., 2009) o inoculación intraperitoneal de tóxicos (Sanden & Olsvik, 2009). El objetivo en todos ellos fue valorar los cambios producidos en la proliferación celular en las situaciones mencionadas, a través de la inmunolocalización de PCNA.

Por otro lado, la **apoptosis** (figura 9) es un proceso de muerte celular programada, que depende de la activación de una cascada proteolítica de caspasas. Es imprescindible en procesos como la homeostasis de los tejidos, el desarrollo celular, la eliminación de células dañadas o infectadas y la patogenia de enfermedades degenerativas o el cáncer (Asadi et al., 2022).

La **caspara- 3** es una enzima proteasa clave en la apoptosis celular, cataliza la escisión específica de muchas proteínas celulares. No se activa hasta que es escindida por Caspasas iniciadoras durante el flujo apoptótico (Porter & Jänicke, 1999). Las Caspasas se activan por **dos vías: extrínseca e intrínseca**.

La **vía extrínseca**, también denominada mitocondrial depende la fuga de citocromo C, procedente del citosol mitocondrial. Este favorece la formación del apoptosoma, que a su vez activa la caspasa-9. La caspasa-9, se descompone y activa la procaspasa- 3, 6 y 7 (Asadi et al., 2022).

La **vía intrínseca**, está modulado por los receptores de muerte celular, como los miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). Los ligandos de muerte se unen a sus receptores correspondientes y a través de mediadores activan la caspasa- 8, que a su vez activa la procaspasa-3 (Asadi et al., 2022).

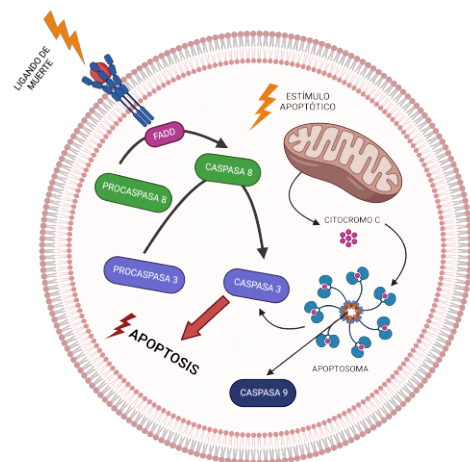


FIGURA 9: Representación de las distintas vías de activación de la apoptosis. Creado con BioRender.com. Modificado de Asadi et al., 2022 y Losada García et al., 2013.

La caspasa 3 se ha empleado como marcador de muerte celular programada o apoptosis en diversos estudios realizados en distintas especies de peces. Se describieron modificaciones en la distribución del marcador, asociados a infecciones parasitarias (Losada et al., 2014), modificaciones dietéticas (Bakke-McKellep et al., 2007) o situaciones de hipoxia (Zheng et al., 2021).

ANTÍGENOS RELACIONADOS CON EL CITOESQUELETO Y LAS UNIONES INTERCELULARES:

El citoesqueleto es una red proteica compleja, dinámica y altamente versátil. Participa en procesos como: preservación y adaptación de la forma celular, endocitosis, división celular, transporte intracelular, motilidad, transmisión de fuerza, reacción a fuerzas externas o adhesión (Hohmann & Dehghani, 2019).

Todas las proteínas citoesqueléticas difieren en su estructura química y también en el tipo de filamentos y estructuras que lo forman.

El citoesqueleto celular está constituido por cuatro componentes (*figura 10*) (Li et al., 2022):

- Los **microfilamentos**, en los que se incluye a la G- actina y la F- actina.
- Los **microtúbulos**, formados por α y β tubulina.
- Los **filamentos intermedios**, constituidos por queratina y vimentina.
- Las **septinas** (Mostowy & Cossart, 2012).

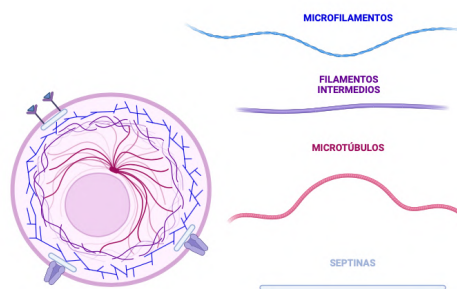


FIGURA 10: Representación de los diferentes componentes del citoesqueleto celular. Esquema modificado de BioRender.com.

Los **filamentos intermedios** se dividen en cinco clases, los cuatro primeros son citoplasmáticos, mientras que el quinto es nuclear. Los tipos I y II son las queratinas, que, a su vez, se pueden clasificar en ácidas y básicas (Hohmann & Dehghani, 2019). Las células epiteliales, incluidas las de la mucosa intestinal, emplean principalmente en su citoesqueleto **citoqueratinas** (Kuburich et al., 2022). Dentro de la célula, los filamentos intermedios forman una malla densa que se encuentra, sobre todo, en el área perinuclear pero también llega a la membrana citoplasmática. A través de su anclaje con la membrana nuclear y citoplasmática, los filamentos, forman una estructura de sostén para las mitocondrias, aparato de Golgi y otros orgánulos, lo que permite organizar su ubicación. Debido a esta estructura de red y su capacidad de anclar orgánulos, a menudo, se consideran amortiguadores mecánicos. Otras funciones relativas a los filamentos intermediarios son: la apoptosis, migración, adhesión e interacción con otros componentes citoplasmáticos. Cerca de la membrana citoplasmática, los filamentos intermediarios, interactúan con los sitios de adhesión local, los desmosomas y hemidesmosomas, por tanto, están altamente involucrados en la adhesión celular y tisular (Hohmann & Dehghani, 2019).

La adhesión entre células es una característica fundamental de los organismos pluricelulares, mediada por un conjunto de estructuras de membrana denominadas uniones intercelulares.

Existen tres tipos: **uniones estrechas**, **uniones adherentes** y **desmosomas** (*figura 11*). Dentro de las uniones adherentes destaca la **E-cadherina**, que constituye el núcleo estructural y funcional de estas uniones. Además de las uniones intercelulares, la E-cadherina permanece asociada con el citoesqueleto de la actina, por tanto, participa en la dinámica y plasticidad de los tejidos epiteliales (Ronza et al., 2019).

Tanto la citoqueratina como la E-cadherina son dos marcadores muy empleados en la evaluación de la salud

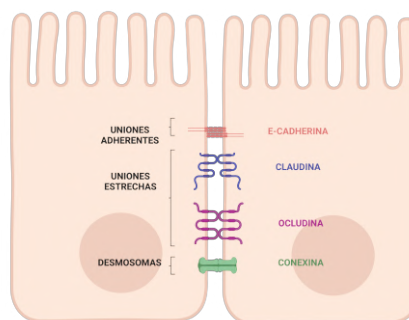


FIGURA 11: Representación de las diferentes uniones intercelulares. Esquema propio creado con BioRender.com.

intestinal. En primer lugar, la **citoqueratina** ha sido empleada de forma frecuente como marcador tumoral de células epiteliales, tanto en neoplasias espontáneas (Paquette et al., 2015) como en aquellas provocadas por la dieta (Dale et al., 2009). También se ha realizado una caracterización de la distribución normal de la citoqueratina en el epitelio intestinal en el salmón Atlántico (*Salmo salar*) (Løkka et al., 2013), de esta manera, se establece un modelo a partir del cual se podrán identificar situaciones atípicas.

Por otro lado, la **E-cadherina** es una proteína de gran importancia en el mantenimiento de la función barrera del organismo. Se ha empleado para valorar, en otras especies de teleósteos y en la especie humana, las modificaciones producidas en el intestino por infecciones parasitarias (Ronza et al., 2020), en patologías como el cáncer (Singhai et al., 2011) o alteraciones causadas por modificaciones dietéticas (Hu et al., 2016). También se realizó una caracterización de la distribución normal de la E-cadherina en distintos tejidos, empleando el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) como modelo (Ronza et al., 2019).

2. OBJETIVOS:

El presente trabajo de fin de grado se enmarca en el contexto de un proyecto Europeo NeoGiant, cuya finalidad es evaluar el uso de extractos ricos en polifenoles que presentan características eubióticas, microbicidas y antioxidantes que pueden contribuir significativamente a la mejora del estado sanitario y del bienestar animal. Uno de los objetivos del proyecto es emplear el pez cebra como modelo, que permita trasladar los resultados obtenidos a animales de interés productivo en acuicultura. Los resultados obtenidos permitirán un mejor conocimiento de la barrera intestinal en el pez cebra, la evaluación del efecto de la introducción de diferentes dietas y serán, en cierta medida, extrapolables a especies piscícolas de producción.

- El objetivo de este trabajo es la puesta a punto de técnicas inmunohistoquímicas para la detección de caspasa 3, antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), citoqueratina AE1/AE3 y E-cadherina, en cortes histológicos de intestino de pez cebra con el propósito de disponer de herramientas de utilidad para la evaluación de la salud intestinal en pez cebra.

3. MATERIAL Y MÉTODOS:

Para la realización de este trabajo se emplearon cinco peces cebra adultos. Se eutanasiaron empleando sobredosis de triclaína tamponada con bicarbonato y se realizó la confirmación de la eutanasia por sección medular.

Se realizaron dos tipos de fijación de los peces:

- Fijación de ejemplares completos. Antes de la fijación se realizaron cortes en ambos opérculos con el fin de exponer las branquias. También se diseccionó la pared abdominal para favorecer la penetración del fijador. Para su fijación fueron introducidos en formol tamponado al 10 %, durante menos de 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente los peces se lavaron con agua corriente y se introdujeron en EDTA bisódico en tampón ácido,

para llevar a cabo un proceso de descalcificación y facilitar el corte. Para el tallado se realizó un corte longitudinal de los peces de forma que se obtuvieron dos mitades que se colocaron sobre los casetes de inclusión.

- Fijación del tubo digestivo. Se procedió a la apertura de la cavidad abdominal para la extracción del tubo digestivo completo desde la cavidad orofaríngea hasta el ano. Se colocó en un casete de inclusión entre dos esponjas empapadas en fijador Bouin, posteriormente los casetes obtenidos se introdujeron en duquesas con fijador Bouin en su interior. La fijación se realizó durante 12 horas y posteriormente se introdujeron en etanol 70° hasta su procesado.

El procesado de las muestras se realizó empleando un inclusor o procesador de muestras tipo carrusel (figura 12). Las muestras que habían sido fijadas en formol comenzaron su procesamiento en las cubetas de formol, mientras que, las fijadas en Bouin empezaron en el alcohol 70°. Ambas continuaron el proceso hasta la cubeta de parafina, donde se lleva a cabo la infiltración.

Posteriormente las muestras se incluyeron en bloques de parafina y se realizaron cortes a 2,5 micras empleando el microtomo.

Antes de proceder con la técnica inmunohistoquímica se realizó una tinción con hematoxilina-eosina de algunos cortes de los bloques obtenidos, para la observación del tejido, y de esta manera confirmar que las muestras eran adecuadas para la inmunotinción.

Los cortes obtenidos para inmunohistoquímica se colocaron sobre portaobjetos tratados con silane, para favorecer la adhesión de los tejidos. Las muestras obtenidas se secaron a temperatura ambiente.

Para cada un de los anticuerpos empleados se seleccionaron tanto controles positivos como negativos, para la validación de la técnica. Como tejidos controles positivos se emplearon: un tumor con un elevado número de mitosis (glioma de perro), para PCNA. Intestino de rodaballo para caspasa 3, E-cadherina y citoqueratina AE3/ AE1. Para la citoqueratina AE3/ AE1 además, se utilizó piel de rodaballo. Cabe destacar que, para el control positivo se emplearon tejidos en los que se conocía de antemano que estaba presente el antígeno y procedían de especies para las técnica está validada.

En cuanto a los controles negativos, se emplearon los mismos cortes de los controles positivos pero no se añadió anticuerpo primario, sino que se sustituyó por diluyente de anticuerpo.

Antes de proceder a la realización de la técnica inmunohistoquímica las muestras se desparafinaron e hidrataron. Para ello se introdujeron en dos cubetas de xileno durante ocho minutos cada una y, posteriormente, en tres cubetas con concentraciones de alcoholes

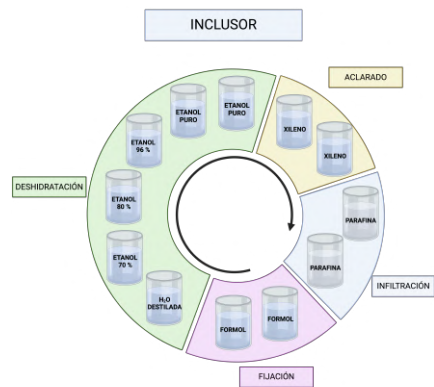


FIGURA 12: representación general del procesamiento de muestras en un inclusor. Esquema propio creado con BioRender.com.

decrecientes (etanol 100°, 96° y 70°, respectivamente), durante cuatro minutos cada una. Por último, las muestras se colocaron en agua destilada cuatro minutos.

Al inicio se emplearon los protocolos de inmunohistoquímica indicados por el laboratorio de procedencia de cada anticuerpo pero, al tratarse de una especie no probada previamente fue necesario la puesta a punto de la técnica para el pez cebra. Se realizaron varias pruebas con diversas modificaciones. En primer lugar, se emplearon distintos tipos de portaobjetos tratados con el fin de determinar qué adhesión era la más adecuada. También se probaron dos tipos de cortes: peces enteros e intestinos diseccionados, con el fin de verificar si existían diferencias en la adhesión al portaobjetos entre ambos.

Para la optimización de la técnica inmunohistoquímica, para cada uno de los anticuerpos, fue necesario probar distintos tiempos de recuperación antigénica por calor, ya que era el tipo de recuperación indicada por el fabricante para todos los anticuerpos. La recuperación en todos los casos se realizó introduciendo las muestras en cubetas con dos tipos de tampón distintos según el anticuerpo: tampón de pH alto o de pH bajo. Ambas soluciones comerciales se emplearon a concentración 1:50. Por último, dichas cubetas se introducían en una olla con agua previamente llevada a ebullición, y una vez dentro se dejaron el tiempo de elección. Se comenzó con cinco minutos y se fue aumentando hasta quince minutos en algunos casos. Finalmente, se introdujo otra modificación. Al inicio de las pruebas, la recuperación antigénica por calor se llevó a cabo en una olla sin colocar la tapa y posteriormente se colocó la tapa, para una distribución más homogénea del calor.

Tras la recuperación antigénica, se realizaron tres lavados de cinco minutos cada uno empleando PBS- Tween. Estos lavados, se llevaron a cabo tras la recuperación antigénica, el bloqueo de la peroxidasa, la incubación del anticuerpo primario y del secundario. A continuación, se incubaron las muestras con un reactivo de bloqueo de la peroxidasa (peróxido de hidrógeno) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se administró un suero normal de caballo, que se incubó durante veinte minutos, con el fin de disminuir las uniones inespecíficas. Al contrario que en la mayoría de los pasos anteriores y posteriores, las muestras no se lavaron, sino que se drenó el líquido, y a continuación se aplicó el anticuerpo primario de elección, que se incubó durante dos horas. Tanto en la E-cadherina como en la caspasa 3 se emplearon varios anticuerpos de casas comerciales diferentes, que se detallan en la siguiente tabla (*tabla 4*):

AC	LABORATORIO	TIPO DE AC	DILUCIÓN
E-CADHERINA	DAKO	mAb	1:50
	GENETEX	pAB	1:100
CASPASA 3	PROMEGA	pAB	1:250
			1:50
	SANTA CRUZ	mAb	1:500

Tabla 4: anticuerpos empleadps para la detección de E-cadherina y caspasa- 3, y concentraciones a las que fueron probados. ;mAb: anticuerpo monoclonal ratón; pAb: anticuerpo policlonal .

Seguidamente, se administró el anticuerpo secundario, que se incubó durante treinta minutos. Para el revelado se emplearon dos soluciones: vector VIP® y DAB (diaminobenzidina). Posteriormente, las muestras se contrastaron con hematoxilina, se deshidrataron empleando cubetas con concentraciones de alcoholes crecientes (etanol 70°, 96° y 99°, respectivamente) y se montaron en un medio soluble en xileno, xileno plastificante diestireno (DPX). En la siguiente imagen se representa, de manera resumida, la técnica inmunohistoquímica y los materiales empleados (*figura 13*).

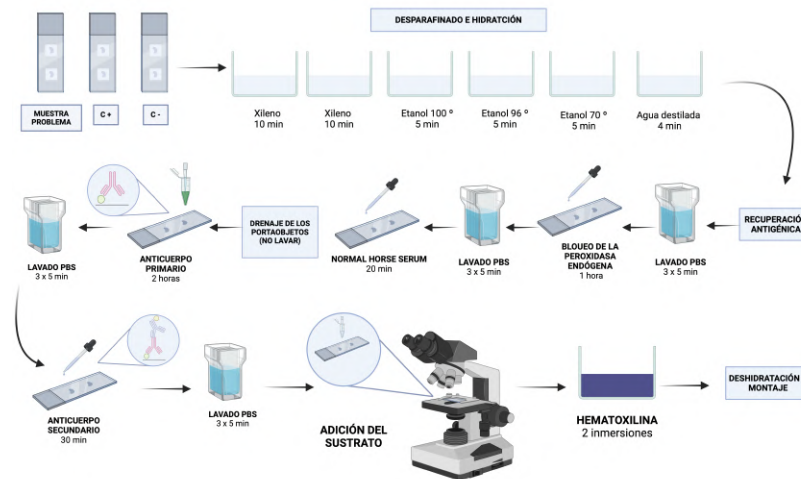


FIGURA 13: representación general de la técnica indirecta inmunohistoquímica. Esquema propio creado con BioRender.com.

4. RESULTADOS:

A. HEMATOXILINA- EOSINA:

Antes de comenzar la técnica inmunohistoquímica se realizó una tinción hematoxilina- eosina de los dos tipos de muestras que se iban a emplear: un pez entero y un intestino diseccionado. Con el fin de determinar si los cortes realizados eran adecuados para la inmunotinción, es decir, si el intestino se encontraba en buenas condiciones.

En el intestino anterior del corte de un pez entero se detectó, en primer lugar un mayor tamaño de la luz con respecto al tramo de intestino medio. Se observaron los pliegues intestinales recubiertos por la mucosa, compuesta, a su vez, por el epitelio y la lámina propia. El epitelio estaba constituido por varios tipos celulares pero sobre todo destacan los enterocitos y las células goblet. Además del tamaño de la luz, se observaron otras diferencias: los pliegues presenta un mayor desarrollo y las células goblet son más abundantes en el intestino medio (*figura 14*).

En el corte del intestino diseccionado se observaron los pliegues intestinales bien definidos y en ellos se distinguía la mucosa, constituida por el epitelio y la lámina propia. La diferencia en el tamaño de la luz, en ambos tramos de intestino, también es muy notable en el corte longitudinal del intestino diseccionado (*figura 15*).

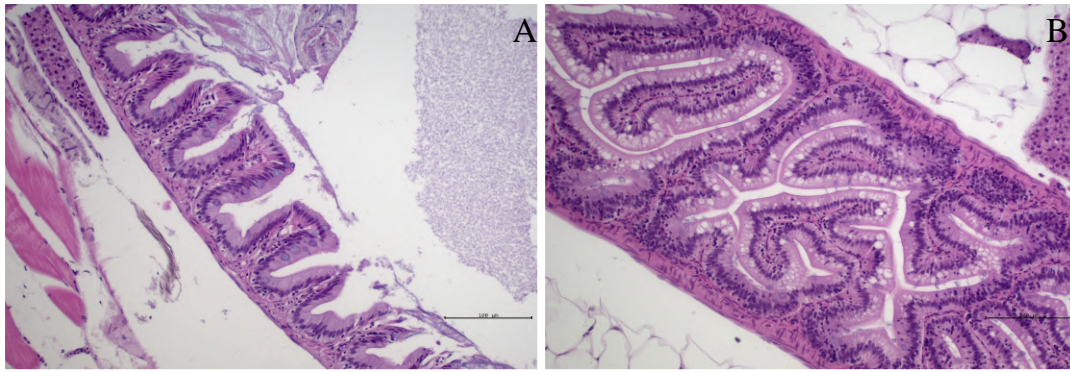


FIGURA 14: tinción hematoxilina- eosina realizada en muestras de pez cebra entero, cortado longitudinalmente.

A: 20x, barra 100 µm. Porción correspondiente al intestino anterior.

B: 20x, barra 100 µm. Porción correspondiente al intestino medio.

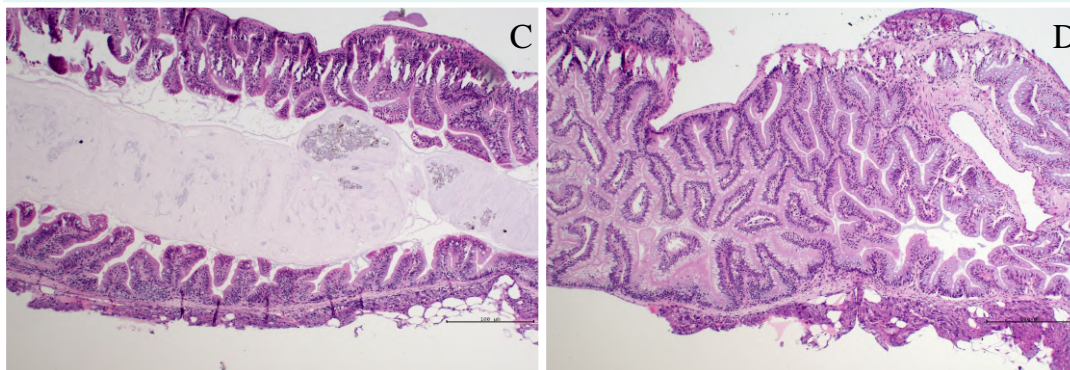


FIGURA 15: tinción hematoxilina- eosina realizada en muestras de intestino diseccionado pez cebra, cortado longitudinalmente.

C: 20x, barra 100 µm. Porción correspondiente al intestino anterior.

D: 20x, barra 100 µm. Porción correspondiente al intestino medio.

B. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA

Los protocolos proporcionados por el laboratorio de comercialización de los anticuerpos primarios, en muchas ocasiones, no están probados en el pez cebra ni otras especies de interés en acuicultura. Por tanto, con el fin de optimizar la técnica para el pez cebra, se realizaron algunas modificaciones en los protocolos de inmunohistoquímica.

La problemática que surgió inicialmente, fue el desprendimiento de los tejidos del portaobjetos durante la recuperación antigénica, cuando se empleaban cortes del pez cebra entero. Los tejidos no se desprendían en todos los casos, solo en aquellos en los que la recuperación antigénica era superior a cinco minutos. Para evitar que esto ocurriera se modificaron tres variables: los portaobjetos empleados, los cortes y el tiempo de recuperación. Con respecto a los portaobjetos se probaron tres tipos, con tratamientos de adhesión diferentes: silanizados, SuperFrost® y Trajan®, pero no se observó diferencia entre ellos. A continuación, se emplearon cortes diferentes; en lugar del pez entero, únicamente se emplearon intestinos diseccionados. Se observó que estas muestra resistían mucho mejor el tratamiento térmico y no se desprendían. Además, asociado a la recuperación antigénica, se introdujo una última modificación, al inicio, en todos los casos, el procedimiento se realizó empleando un olla sin usar la tapa pero después,

se colocó. Al generarse una distribución térmica más homogénea se observó que las muestras no se desprendían.

Además, en algunos casos fue necesario el uso de más de un tipo de anticuerpo y el ajuste de la dilución. En la siguiente tabla (*tabla 5*) se detallan los procesos realizados y sus resultados:

AC	LABORATORIO	TIPO DE AC	RA	TIEMPO DE RA	DILUCIÓN	REVELADO	CORTE	RESULTADO
CK AE1/ AE3	DAKO	mAb	CALOR: TAMPÓN HIGH PH	5 MIN	RTU	Vector VIP®	PEZ ENTERO	✓ (Marcaje específico)
E-CADHERINA	DAKO	mAb	CALOR: TAMPÓN LOW PH	15 MIN	1:50	DAB	INTESTINO DISECCIONADO	✓ (Marcaje específico)
	GENETEX	pAb	CALOR: TAMPÓN LOW PH,	5 MIN	1:100	Vector VIP®	PEZ ENTERO	✗ (Tinción inespecífica)
				15 MIN	1:100	Vector VIP®	PEZ ENTERO	✗ (Tinción inespecífica)
	CASPASA-3	PROMEGA	pAb	CALOR: TAMPÓN HIGH PH	5 MIN	1:250	DAB	INTESTINO DISECCIONADO
15 MIN					1:250	Vector VIP®	PEZ ENTERO/ INTESTINO DISECCIONADO	✗ (Sin marcaje)
15 MIN					1:50	Vector VIP®	INTESTINO	✓ (Marcaje específico)
	SANTA CRUZ	mAb	CALOR: TAMPÓN HIGH PH	5 MIN	1:500	Vector VIP®	PEZ ENTERO	✗ (Sin marcaje)
PCNA	SANTA CRUZ	mAb	CALOR: TAMPÓN LOW PH	5 MIN	1:200	Vector VIP®	PEZ ENTERO	✓ (Marcaje específico)
						DAB	INTESTINO DISECCIONADO	✓ (Marcaje específico)

Tabla 5: características principales de los anticuerpos empleados. AC: anticuerpo; CK: citoqueratina; DAB: tetracloruro de 3,3'diaminobenzidina; mAb: anticuerpo monoclonal ratón; MIN: minutos; pAb: anticuerpo policlonal conejo; PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación; RA: recuperación antigénica; RTU: "ready to use", listo para usar.

A continuación, se resumen los resultados del marcaje obtenido en el intestino de peces cebra adultos correspondientes a cuatro anticuerpos: citoqueratina AE1/AE3, E-cadherina, PCNA y caspasa-3. Cabe destacar que, en todos los casos la inmunotinción resultó positiva tanto en el control positivo como en la muestra problema, y negativa en el control negativo, permitiendo la validación de la técnica.

- E-CADHERINA:

La E-cadherina se detectó a lo largo de todo el intestino del pez cebra, no se observaron diferencias apreciables en la expresión del antígeno entre los diferentes tramos del intestino del pez cebra. La inmunotinción resultó positiva en el epitelio intestinal, ubicándose en el área de contacto entre las células, en posición basolateral (*figura 16*).

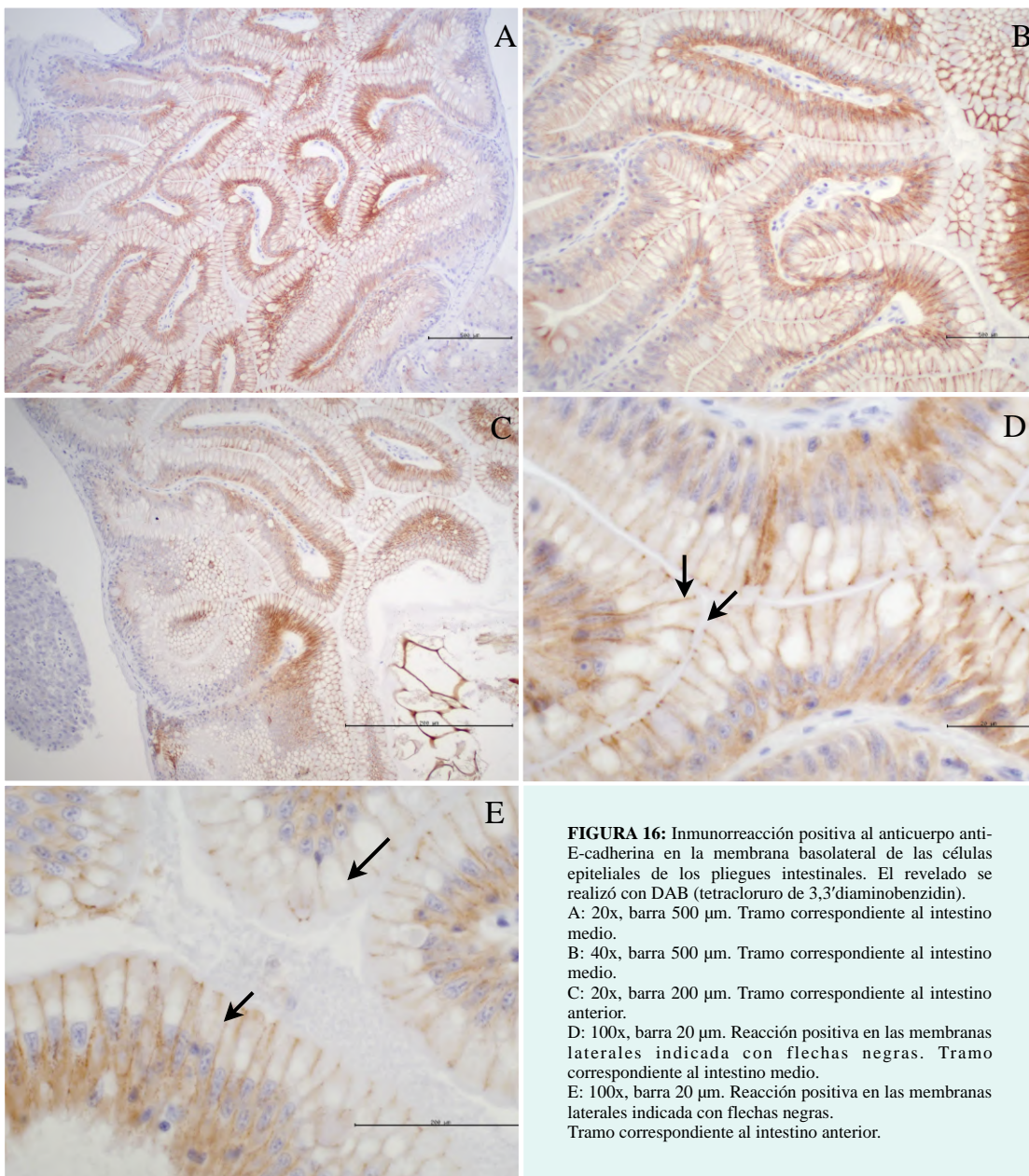


FIGURA 16: Inmunorreacción positiva al anticuerpo anti-E-cadherina en la membrana basolateral de las células epiteliales de los pliegues intestinales. El revelado se realizó con DAB (tetracloruro de 3,3'diaminobenzidin).
A: 20x, barra 500 μm . Tramo correspondiente al intestino medio.
B: 40x, barra 500 μm . Tramo correspondiente al intestino medio.
C: 20x, barra 200 μm . Tramo correspondiente al intestino anterior.
D: 100x, barra 20 μm . Reacción positiva en las membranas laterales indicada con flechas negras. Tramo correspondiente al intestino medio.
E: 100x, barra 20 μm . Reacción positiva en las membranas laterales indicada con flechas negras. Tramo correspondiente al intestino anterior.

- CITOQUERATINA AE1/AE3:

La inmunotinción se observó con igual intensidad en todos los tramos del intestino del pez cebra. La inmunotinción resultó positiva en el citoplasma de los enterocitos que componen el epitelio intestinal. La coloración presentó mayor intensidad en la zona apical, correspondiente con el borde de cepillo o microvellosidades. La lámina propia, las capas musculares y la serosa, no mostraron positividad, tampoco las células goblet ni los linfocitos. También se observó inmunomarcaje en las células endoteliales presentes en los vasos sanguíneos (*figura 17*).

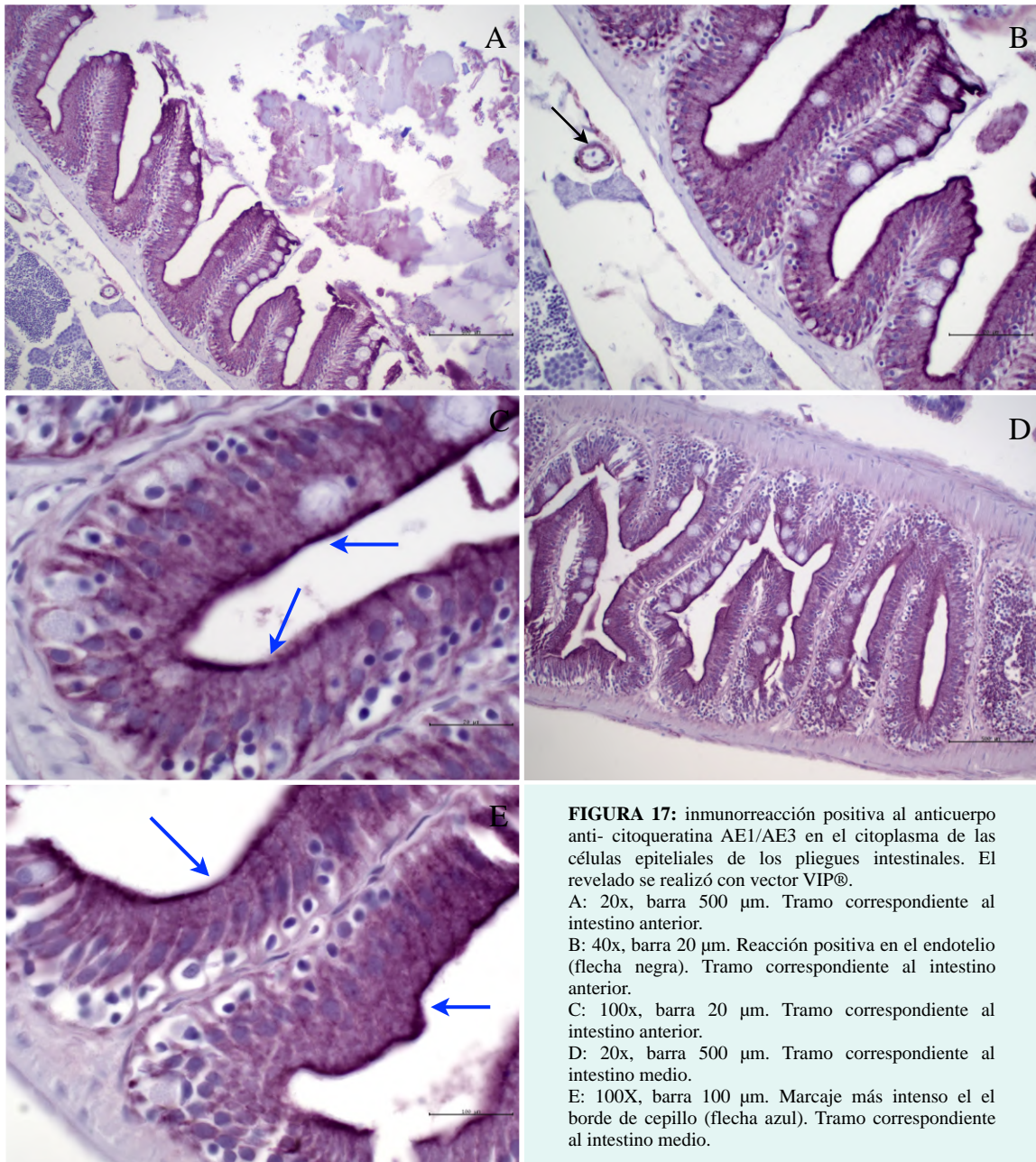


FIGURA 17: inmunorreacción positiva al anticuerpo anti- citoqueratina AE1/AE3 en el citoplasma de las células epiteliales de los pliegues intestinales. El revelado se realizó con vector VIP®.

A: 20x, barra 500 μm . Tramo correspondiente al intestino anterior.

B: 40x, barra 20 μm . Reacción positiva en el endotelio (flecha negra). Tramo correspondiente al intestino anterior.

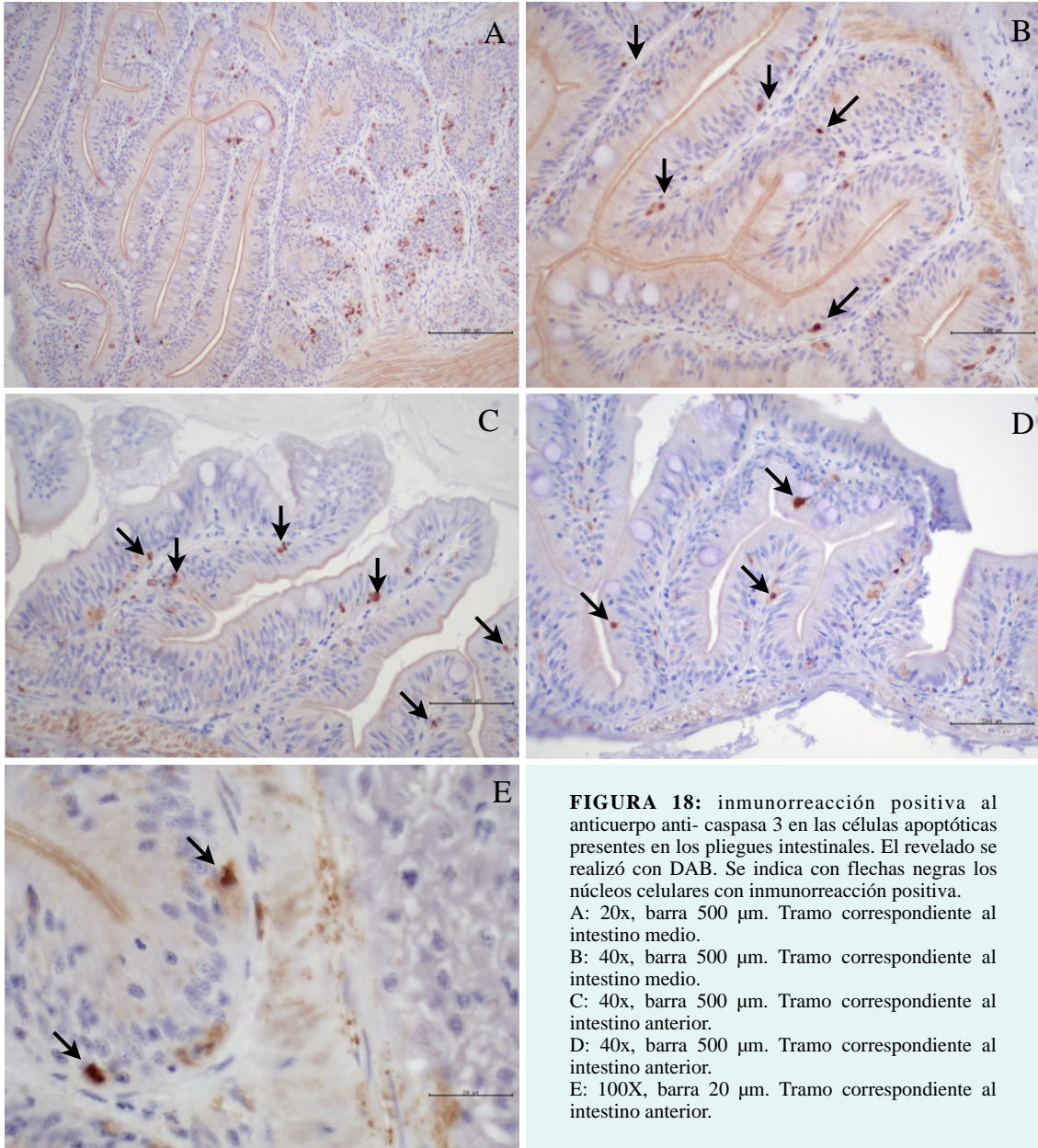
C: 100x, barra 20 μm . Tramo correspondiente al intestino anterior.

D: 20x, barra 500 μm . Tramo correspondiente al intestino medio.

E: 100X, barra 100 μm . Marcaje más intenso en el borde de cepillo (flecha azul). Tramo correspondiente al intestino medio.

- CASPASA- 3:

No se detectaron diferencias en la intensidad de la tinción entre los distintos tramos de intestino del pez cebra. El inmunomarcaje de la enzima caspasa- 3 fue esencialmente nuclear y se localizaba de forma multifocal a lo largo de los pliegues intestinal (*figura 18*). Existe un ligero marcaje inespecífico localizado en el borde de cepillo de los pliegues intestinales y en la capa muscular.



- PCNA

No se observaron diferencias apreciables en la expresión del PCNA entre los diferentes tramos del intestino del pez cebra. La reactividad positiva estaba localizada en el epitelio, más concretamente en las áreas más profundas entre pliegues intestinales, de tal forma que, a medida que ascendemos en el pliegue, las células ya no presentan inmunorrección positiva. El marcaje del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), era principalmente nuclear (*figura 19*).

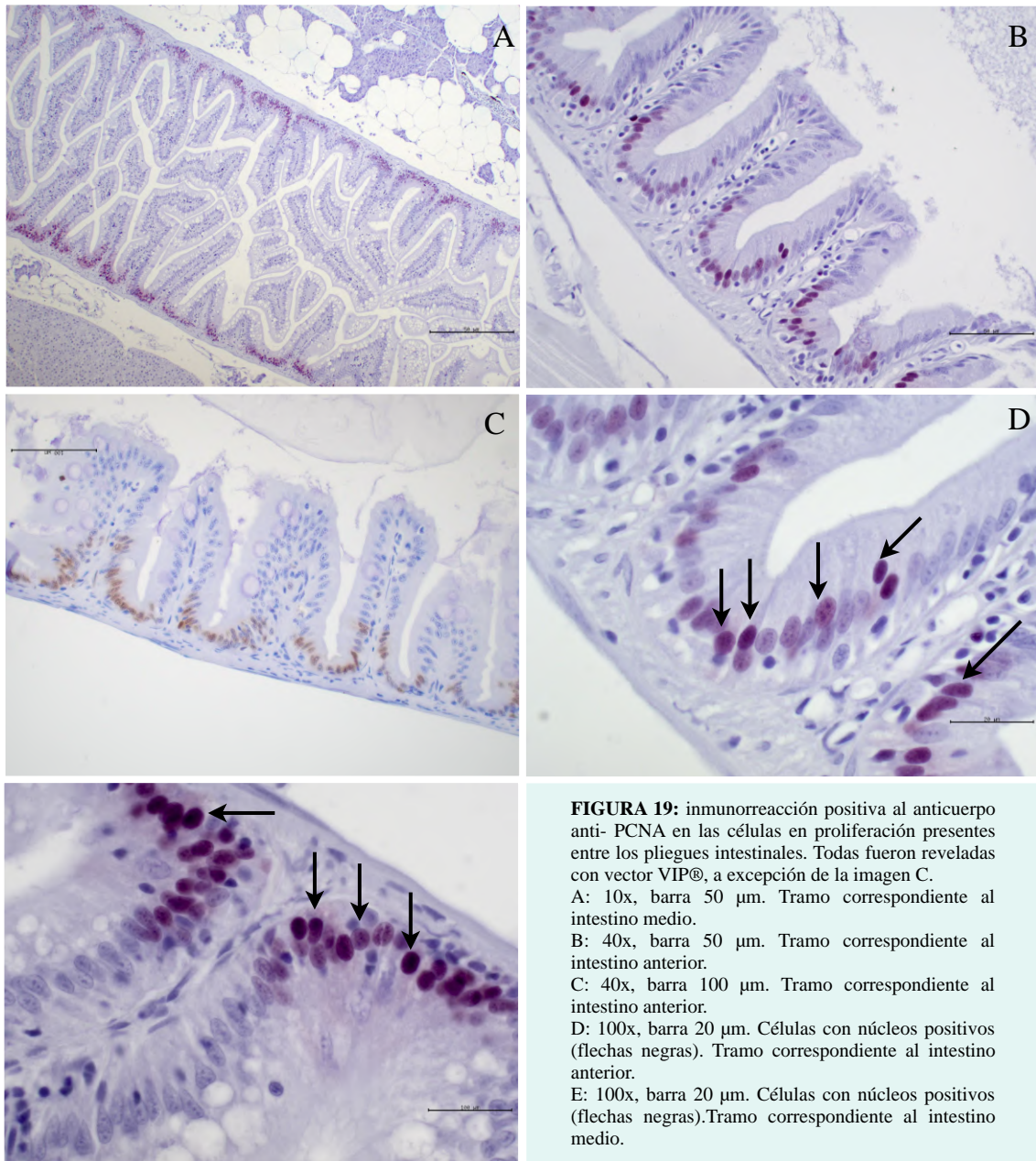


FIGURA 19: inmunorreacción positiva al anticuerpo anti- PCNA en las células en proliferación presentes entre los pliegues intestinales. Todas fueron reveladas con vector VIP®, a excepción de la imagen C.
A: 10x, barra 50 µm. Tramo correspondiente al intestino medio.
B: 40x, barra 50 µm. Tramo correspondiente al intestino anterior.
C: 40x, barra 100 µm. Tramo correspondiente al intestino anterior.
D: 100x, barra 20 µm. Células con núcleos positivos (flechas negras). Tramo correspondiente al intestino anterior.
E: 100x, barra 20 µm. Células con núcleos positivos (flechas negras).Tramo correspondiente al intestino medio.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

La salud de las mucosas es un tema de gran relevancia y preocupación en acuicultura. Todos los organismos, incluidos los peces, están en constante interacción con su entorno, enfrentándose a diversos desafíos biológicos, como virus, bacterias y parásitos; químicos, como contaminantes y tratamientos; y físicos, relacionados con el manejo. Además, son sensibles a estímulos externos como el estrés y las modificaciones dietéticas. Las superficies mucosas, que incluyen la piel, las branquias y el intestino, actúan como la interfaz entre el medio interno y externo, constituyendo la primera línea de defensa. La capa de moco, la microbiota y la estructura de estas superficies trabajan en estrecha coordinación para garantizar la funcionalidad de la barrera protectora. Por lo tanto, mantener una buena salud de las mucosas no solo contribuye a una mejora de la salud y bienestar animal, sino que también genera una mayor productividad y reducción del uso de tratamientos (Lazado, 2020).

Se seleccionó el pez cebra como organismo modelo debido a características como su pequeño tamaño o por su bajo coste de mantenimiento. Además de la posibilidad de extrapolar los resultados obtenidos a otras especies de interés en acuicultura (Santoriello & Zon, 2012).

Para la detección de los marcadores de apoptosis y proliferación celular, las proteínas de unión y el citoesqueleto, se ha empleado la técnica inmunohistoquímica. Es importante tener en cuenta que es una técnica con múltiples pasos en la que interviene muchos factores, como la humedad, la temperatura, un secado adecuado de los portaobjetos, preparación de diluciones correctamente, elección adecuada de controles, tiempos de recuperación antigénica, incubación y revelado, entre otros. Asimismo, aunque el pez cebra es un animal cuyo uso en investigación está en auge, existe poca información detallada sobre su anatomía e histología digestiva. Además, existe la dificultad añadida de que, en esta especie, la mayoría de los productos comercialmente disponibles, carecían de validación para la técnica. En consecuencia, es complicado disponer de marcadores probados que puedan emplearse para inmunotinción en cortes histológicos, de tal forma que, se permita la inmunolocalización de moléculas de interés en su contexto tisular.

La importancia de este trabajo residió en la introducción de modificaciones en los protocolos de inmunohistoquímica, que generaron mejoras significativas en los resultados para la especie de interés. Contribuyendo de esta manera a aumentar las herramientas disponibles para el conocimiento de la salud de las mucosas en los peces.

Además de las modificaciones relativas a la recuperación antigénica, los anticuerpos primarios, los cortes empleados y los distintos tratamientos de los portaobjetos, también se modificó el cromógeno. El uso de DAB (tetracloruro de 3,3'-diaminobenzidina) o vector VIP®, dependía del tipo de muestra empleada. En los cortes longitudinales del pez entero se empleó en todos los casos vector VIP®, la razón es la existencia de pigmentos endógenos, como los centros de melanomacrófagos (Steinel & Bolnick, 2017), presentes en el pez cebra que podrían confundirse con marcaje por DAB. En los intestinos diseccionados se empleó DAB, ya que en estos casos no había posibilidad de confusión.

CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS ANTICUERPOS Y APLICACIONES EN LA EVALUACIÓN DE LA SALUD INTESTINALES DE PECES:

El inmunomarcaje obtenido para cada uno de los anticuerpos empleados, no mostró diferencias entre los distintos tramos de intestino. Aunque al tratarse de un estudio cualitativo y no cuantitativo, quizás se precisaría de un análisis para comprobarlo. Tampoco se han encontrado publicaciones que muestren las posibles diferencias existentes en el inmunomarcaje de estos anticuerpos a lo largo del intestino, en esta especie o en otras.

PCNA

Aunque en el pez cebra las criptas de Lieberkühn estén ausentes, la renovación epitelial continua presente y tiene lugar principalmente en los espacios entre los pliegues (Wallace, 2005), de tal forma que, como cabría esperar y, como se ha visto en el presente trabajo, la mayor expresión de PCNA, tiene lugar en estas áreas. El resultado obtenido en el pez cebra sano es muy similar al observado en los animales sanos de distintas investigaciones llevadas a cabo en otras especies de peces como el salmón Atlántico (*Salmo salar*). (Bakke-McKellep et al., 2007; Sanden & Olsvik, 2009) o la trucha común (*Salmo trutta*) (Dezfuli et al., 2012). Es decir, que a nivel histológico, la inmunolocalización de PCNA en pez cebra es similar a la del salmón y la de la trucha.

El PCNA, se ha empleado como marcador para la evaluación de la salud intestinal de múltiples especies de peces en situaciones patológicas. En salmones Atlánticos, se valoraron los cambios asociados a la proliferación celular empleando el marcador PCNA, tras la administración intraperitoneal de β -naphthoflavone (BNF), un tóxico modelo. Los resultados reflejaron que el BNF redujo significativamente la proliferación de las células intestinales, en comparación con el grupo control (animales sanos) (Sanden & Olsvik, 2009).

En lo relativo a alteraciones intestinales asociadas a la dieta, se valoraron los efectos a largo plazo de la alimentación con productos vegetales en salmones del Atlántico. Empleando distintos marcadores, entre ellos, la proliferación celular a través de la detección de PCNA en el intestino mediante inmunohistoquímica. En general, la proliferación celular estaba concentrada en la base de los pliegues pero también, se detectaron células positivas a lo largo del mismo. Aunque su número fue disminuyendo a medida que se ascendía en el pliegue. Se determinó, además, que la mucosa intestinal de animales alimentados con soja experimentaron un aumento de la proliferación celular, mientras que los alimentados con maíz, experimentaron disminución de la proliferación (Sanden et al., 2005).

Otra posible aplicación del PCNA como marcador en lo relativo a salud intestinal, es durante las variaciones asociadas a infecciones, como en el caso de la infección por acantocéfalos en la trucha común (Dezfuli et al., 2012). Se observó que en las zonas más próximas a las áreas de unión del parásito, aumentaba el número de células PCNA positivas.

Por último, cabe destacar el papel del PCNA, en el diagnóstico de cáncer. Se observó que la presencia de ingredientes vegetales en piensos administrados en salmones, generaban

inflamación y displasia intestinal, que, a su vez, desembocaba en el desarrollo de adenocarcinomas intestinales. Las células epiteliales intestinales tumorales, presentaban un fuerte marcaje a PCNA, debido a la alta proliferación de las mismas (Dale et al., 2009).

CASPASA 3

El proceso de apoptosis o muerte celular programada es vital para el mantenimiento de la homeostasis en el organismo (Negroni et al., 2015). Aunque existen algunas diferencias en la dinámica de renovación del epitelio intestinal entre peces y mamíferos, existen también grandes similitudes. En el pez cebra, las células más indiferenciadas parten de los espacios entre los pliegues y van avanzando hacia la punta del mismo donde se desprenden, tras sufrir apoptosis (Wallace, 2005).

El marcaje visto en el presente trabajo difiere de lo observado en otras investigaciones anteriores. En el artículo de Bakke-McKellep et al. (2007), realizado empleando el salmón Atlántico como modelo, se observó que en los animales sanos (grupo control) las células positivas a caspasa 3 eran células individuales poco numerosas, localizadas en las puntas de los pliegues. En el pez cebra se observó inmunotinción también en unas pocas células individuales pero se localizaban, en la mayoría de los casos, distribuidas de forma multifocal a lo largo de todo el pliegue intestinal, es decir, no se localizaban únicamente en el área más apical.

En los estudios realizados en rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Losada et al., 2014) y en *Pelteobagrus vachelli* (Zheng et al., 2021), no se describe, en los animales sanos usados como controles negativos, inmunotinción de caspasa 3 únicamente localizada en la parte apical de los pliegues. Además, en el presente trabajo, se observó tinción de fondo localizada en el borde de cepillo y en la capa muscular, probablemente asociado a un exceso de tiempo de revelado o a una concentración del anticuerpo primario demasiado elevado (Ramos-Vara, 2017).

La caspasa 3 ha sido utilizada como marcador en estudios que evalúan los cambios en el intestino del rodaballo (*Scophthalmus maximus*) provocados por el patógeno *Enteromyxum scophthalmi*. El objetivo principal fue emplear el ensayo inmunohistoquímico para detectar células apoptóticas tanto en rodaballos sanos como infectados con *E. scophthalmi*, con el fin de determinar la presencia y distribución de estas células durante el desarrollo de la enfermedad. Los resultados mostraron un aumento significativo de la apoptosis durante la enteromixosis (Losada et al., 2014).

También se evaluaron conjuntamente PCNA y caspasa 3, entre otros marcadores, con el objetivo de analizar los efectos de la harina de soja dietética y la inulina (probiótico) sobre la apoptosis y la proliferación en el salmón del Atlántico. Se observó un aumento significativo en la longitud del compartimento proliferativo en peces alimentados con dietas a base de harina de soja, en comparación con aquellas basadas en harina de pescado y las que incluían el prebiótico inulina. Además, se incrementó la reactividad de la caspasa 3, lo que podría indicar una inducción de la reparación celular y la apoptosis, respectivamente (Bakke-McKellep et al., 2007).

Por último, en un estudio realizado en la especie *Pelteobagrus vachelli*, se determinó que la exposición a situaciones de hipoxia, generaba un aumento de la apoptosis intestinal, que se veía incrementada a medida que aumentaba el tiempo de respuesta (Zheng et al., 2021).

E-CADHERINA

La E-cadherina desempeña un papel fundamental en las uniones intercelulares y es esencial para el mantenimiento de la función barrera del organismo. La salud de las mucosas es un problema recurrente en la investigación en acuicultura, sin embargo, existe una gran falta de estudios inmunohistoquímicos de las proteínas de unión en peces.

Empleando el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) como organismo modelo, se realizó una caracterización inmunohistoquímica de la E-cadherina en distintos tejidos (Ronza et al., 2019). Entre los tejidos utilizados se encuentra el intestino, en el que se observa una inmunotinción muy similar, a la obtenida en el presente trabajo, inmunolocalizada en los contactos célula-célula en el epitelio (Ronza et al., 2019).

Por otro lado, en un contexto patológico, se valoraron las modificaciones producidas por *Enteromyxum spp.* en la distribución de la E-cadherina intestinal empleando inmunohistoquímica. Se observó que, en el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) moderadamente infectado, se conservó el patrón de distribución general de la E-cadherina, pero se detectó una inmunoreacción más intensa en torno a las formas parasitarias. Cuando la infección era severa la inmunotinción se alteró notablemente, observándose áreas de escasa inmunoreacción en las uniones intercelulares y un fuerte marcaje en las áreas de contacto entre el huésped y los parásitos. Por el contrario, no se observaron cambios en la inmunotinción de E-cadherina en doradas con infecciones moderadas y severas, en comparaciones con los animales sanos empleados como control (Ronza et al., 2020). Esta pérdida de la distribución fisiológica y su reubicación en la interfaz parásito- enterocito, podría generar una disfunción de la barrera intestinal y aumento de la permeabilidad (Rao et al., 2002).

También se evaluó, empleando la dorada (*Sparus aurata*) como modelo, el papel de la E-cadherina y las uniones estrechas en la integridad intestinal de peces sanos e infectados por *Enteromyxum leei*. Al contrario que en el estudio realizado por Ronza et al. (2020), se determinó que la expresión de la E-cadherina no mostró ningún cambio entre los peces sanos y los enfermos. Mientras que las uniones estrechas sí se vieron alteradas en los peces parasitados (Sitjà-Bobadilla et al., 2019).

Además, en medicina humana la E-cadherina se emplea como marcador tumoral, ya que la pérdida selectiva de esta proteína puede causar desdiferenciación e invasividad en los carcinomas humanos, lo que lleva a que la E-cadherina se clasifique como un supresor de tumores (Singhai et al., 2011).

CITOQUERATINA AE1/ AE3:

La citoqueratina es una proteína altamente conservada durante la evolución de los vertebrados (Groff et al., 1997), y constituye una parte del citoesqueleto de las células epiteliales.

Empleando el salmón Atlántico salvaje, como organismo modelo, se llevó a cabo una caracterización de la morfología intestinal en el que se emplearon algunos marcadores como la citoqueratina (Løkka et al., 2013). El objetivo, al igual que en el presente estudio, era observar la distribución normal de la citoqueratina en las células epiteliales utilizando el inmunomarcaje. Únicamente se observó inmunotinción en el revestimiento epitelial y, con menor intensidad, en el endotelio. La tinción estaba presente también en la zona apical, correspondiente con el borde de cepillo o microvellosidades, debido al extenso citoesqueleto filamentoso presente en las mismas. Por el contrario, las células goblet permanecieron sin teñir. Los resultados obtenidos en dicho artículo son similares a los obtenidos en el presente trabajo. El inmunomarcaje se detectó únicamente en las células epiteliales intestinales y en el endotelio, siendo de mayor intensidad en las microvellosidades, y ausente en las células goblet.

La citoqueratina se ha empleado en múltiples ocasiones para el diagnóstico de cáncer. Como este marcador es exclusivo de células epiteliales, permitirá caracterizar el fenotipo de las células neoplásicas y confirmar el tipo de tumor presente. Por ejemplo, permitiendo distinguir entre carcinomas y tumores de células neuroendocrinas en el aparato digestivo del pez cebra (*Danio rerio*) como se describió en el siguiente artículo (Paquette et al., 2015).

Igualmente, en el artículo anteriormente mencionado, (Dale et al., 2009), se valora además del papel del PCNA, la expresión de la citoqueratina en adenocarcinomas intestinales asociados a inflamación crónica ocasionada por la dieta. Se empleó para determinar si las células neoplásicas observadas expresaban el marcador citoqueratina presente en las células epiteliales. Quedando demostrado el origen epitelial de la neoplasia.

A continuación se exponen las **conclusiones** derivadas del presente trabajo:

- La introducción de modificaciones en los protocolos de inmunohistoquímica permitieron la optimización de la técnica para muestras de intestino en el pez cebra, especie para la que los anticuerpos empleados no estaban probados.
- La técnica inmunohistoquímica optimizada permitió estudiar la distribución, de los marcadores: PCNA, caspasa 3, E-cadherina y citoqueratina AE1/AE3, en su contexto tisular, en distintos tramos del intestino del pez cebra.
- Los inmamarcajes obtenidos fueron similares a los observados por otros autores en estudios previos realizados en otras especies de peces, a excepción de la caspasa 3, cuya inmunolocalización en el intestino del pez cebra mostró diferencias con el salmón Atlántico.
- Este estudio no solo contribuye al entendimiento básico de la biología del pez cebra, a través de la inmunohistoquímica, sino que también, sienta las bases para futuras investigaciones basadas en modelos de enfermedades, dietas o tratamientos, para su posterior aplicación a la industria de la acuicultura o en biomedicina.

6. BIBLIOGRAFÍA:

- Abbate, F., Germanà, G. P., De Carlos, F., Montalbano, G., Laurà, R., Levanti, M. B., & Germanà, A. (2006). The Oral Cavity of the Adult Zebrafish (*Danio rerio*). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, *35*(5), 299-304. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2006.00682.x>
- Ahmad, A., Sheikh Abdullah, S. R., Hasan, H. A., Othman, A. R., & Ismail, N. (2021). Aquaculture industry: Supply and demand, best practices, effluent and its current issues and treatment technology. *Journal of environmental management*, *287*, 112271. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112271>
- Asadi, M., Taghizadeh, S., Kaviani, E., Vakili, O., Taheri-Anganeh, M., Tahamtan, M., & Savardashtaki, A. (2022). Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *69*(4), 1633-1645. <https://doi.org/10.1002/bab.2233>
- Beck, B. H., & Peatman, E. (2015). *Mucosal health in aquaculture*. Elsevier, Academic Press.
- Bilal, S., Etayo, A., & Hordvik, I. (2021). Immunoglobulins in teleosts. *Immunogenetics*, *73*(1), 65–77. <https://doi.org/10.1007/s00251-020-01195-1>
- Børgwald, J., & Dalmo, R. A. (2019). Review on Immersion Vaccines for Fish: An Update 2019. *Microorganisms*, *7*(12), 627. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120627>
- Brugman, S. (2016). The zebrafish as a model to study intestinal inflammation. *Developmental and Comparative Immunology*, *64*, 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.020>
- Brugman, S., Schneeberger, K., Witte, M., Klein, M. R., van den Bogert, B., Boekhorst, J., Timmerman, H. M., Boes, M. L., Kleerebezem, M., & Nieuwenhuis, E. E. (2014). T lymphocytes control microbial composition by regulating the abundance of *Vibrio* in the zebrafish gut. *Gut microbes*, *5*(6), 737–747. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.972228>
- Bruneel, B., Mathä, M., Paesen, R., Ameloot, M., Weninger, W. J., & Huysseune, A. (2015). Imaging the zebrafish dentition: from traditional approaches to emerging technologies. *Zebrafish*, *12*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.0980>
- Buddington, R. K., & Diamond, J. M. (1986). Aristotle revisited: the function of pyloric caeca in fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(20), 8012–8014. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.20.8012>
- Carten, J. D., & Farber, S. A. (2009). A new model system swims into focus: using the zebrafish to visualize intestinal metabolism in vivo. *Clinical lipidology*, *4*(4), 501–515. <https://doi.org/10.2217/clp.09.40>
- Cartner, S., Eisen, J. S., Farmer, S. F., Guillemin, K. J., Kent, M. L., & Sanders, G. E. (2019). *The zebrafish in biomedical research: Biology, husbandry, diseases, and research applications*. Academic Press.
- Castro, L. F., Gonçalves, O., Mazan, S., Tay, B. H., Venkatesh, B., & Wilson, J. M. (2013). Recurrent gene loss correlates with the evolution of stomach phenotypes in gnathostome

- history. *Proceedings. Biological sciences*, 281(1775), 20132669. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2669>
- Chia, K., Klingseisen, A., Sieger, D., & Priller, J. (2022). Zebrafish as a model organism for neurodegenerative disease. *Frontiers in molecular neuroscience*, 15, 940484. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.940484>
- Dale, O. B., Tørud, B., Kvellestad, A., Koppang, H. S., & Koppang, E. O. (2009). From chronic feed-induced intestinal inflammation to adenocarcinoma with metastases in salmonid fish. *Cancer research*, 69(10), 4355–4362. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4877>
- Dawood, M. (2018). Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture.*, 10(4), 950–974. <https://doi.org/10.1111/raq.12209>
- Ding, Y., Vanselow, D. J., Yakovlev, M. A., Katz, S. R., Lin, A. Y., Clark, D. P., Vargas, P., Xin, X., Copper, J. E., Canfield, V. A., Ang, K. C., Wang, Y., Xiao, X., De Carlo, F., van Rossum, D. B., La Riviere, P., & Cheng, K. C. (2019). Computational 3D histological phenotyping of whole zebrafish by X-ray histotomography. *eLife*, 8, e44898. <https://doi.org/10.7554/eLife.44898>
- Dezfuli, B. S., Giari, L., Lui, A., Squerzanti, S., Castaldelli, G., Shinn, A. P., Manera, M., & Lorenzoni, M. (2012). Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) expression in the intestine of *Salmo trutta trutta* naturally infected with an acanthocephalan. *Parasites & vectors*, 5, 198. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-198>
- Eyzaguirre, E., & Haque, A. K. (2008). Application of immunohistochemistry to infections. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 132(3), 424–431. <https://doi.org/10.5858/2008-132-424-AOITI>
- Fleming, A., Jankowski, J., & Goldsmith, P. (2010). In vivo analysis of gut function and disease changes in a zebrafish larvae model of inflammatory bowel disease: a feasibility study. *Inflammatory bowel diseases*, 16(7), 1162–1172. <https://doi.org/10.1002/ibd.21200>
- Flores, E. M., Nguyen, A. T., Odem, M. A., Eisenhoffer, G. T., & Krachler, A. M. (2020). The zebrafish as a model for gastrointestinal tract-microbe interactions. *Cellular microbiology*, 22(3), e13152. <https://doi.org/10.1111/cmi.13152>
- Fujii, K., Yamakawa, K., Takeda, Y., Okuda, N., Takasu, A., & Ono, F. (2024). Understanding the pathophysiology of acute critical illness: translational lessons from zebrafish models. *Intensive care medicine experimental*, 12(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s40635-024-00595-x>
- Groff, J. M., Naydan, D. K., Higgins, R. J., & Zinkl, J. G. (1997). Cytokeratin-filament expression in epithelial and non-epithelial tissues of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Cell and tissue research*, 287(2), 375–384. <https://doi.org/10.1007/s004410050763>
- Guerra-Varela, J., Baz-Martínez, M., Da Silva-Álvarez, S., Losada, A. P., Quiroga, M. I., Collado, M., Rivas, C., & Sánchez, L. (2018). Susceptibility of Zebrafish to Vesicular

- Stomatitis Virus Infection. *Zebrafish*, 15(2), 124–132. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1499>
- Harper, C., & Lawrence, C. (2011). *The Laboratory Zebrafish*. CRC Press.
- Hohmann, T., & Dehghani, F. (2019). The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells*, 8(4), 362. <https://doi.org/10.3390/cells8040362>
- Holden, J. A., Layfield, L. L., & Matthews, J. L. (2013). *The zebrafish: Atlas of macroscopic and microscopic anatomy*. Cambridge University Press.
- Hornick J. L. (2014). Novel uses of immunohistochemistry in the diagnosis and classification of soft tissue tumors. *Modern pathology*, 27(S1), S47–S63. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.177>
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., Chow, W., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Hu, H., Kortner, T. M., Gajardo, K., Chikwati, E., Tinsley, J., & Krogdahl, Å. (2016). Intestinal Fluid Permeability in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Is Affected by Dietary Protein Source. *PloS one*, 11(12), e0167515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167515>
- Huyseune, A., Van der heyden, C., & Sire, J. Y. (1998). Early development of the zebrafish (*Danio rerio*) pharyngeal dentition (Teleostei, Cyprinidae). *Anatomy and embryology*, 198(4), 289–305. <https://doi.org/10.1007/s004290050185>
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1897, 299–311. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26
- Jevtov, I., Samuelsson, T., Yao, G., Amsterdam, A., & Ribbeck, K. (2014). Zebrafish as a model to study live mucus physiology. *Scientific reports*, 4, 6653. <https://doi.org/10.1038/srep06653>
- Kalyuzhny, A. E. (2016). *Immunohistochemistry: Essential Elements and Beyond*. Springer International Publishing.
- Karim, A. J., Hassan, A. H., Kadhim, K. H., & Kadhim, K. K. (2022). The immunity function of rodlet cells in the intestine of Binni fish (*Mesopotamichthys sharpeyi*). *Journal of advanced veterinary and animal research*, 9(2), 282–289. <https://doi.org/10.5455/javar.2022.i594>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 203(3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Kelman Z. (1997). PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, 14(6), 629–640. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1200886>

- Kobayashi, N., Takahashi, D., Takano, S., Kimura, S., & Hase, K. (2019). The Roles of Peyer's Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases. *Frontiers in immunology*, *10*, 2345. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02345>
- Kuburich, N. A., den Hollander, P., Pietz, J. T., & Mani, S. A. (2022). Vimentin and cytokeratin: Good alone, bad together. *Seminars in cancer biology*, *86*(Pt 3), 816–826. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.12.006>
- Lachowicz, J., Szopa, A., Ignatiuk, K., Świąder, K., & Serefko, A. (2023). Zebrafish as an Animal Model in Cannabinoid Research. *International journal of molecular sciences*, *24*(13), 10455. <https://doi.org/10.3390/ijms241310455>
- Lavergne, A., Tarifeño-Saldivia, E., Pirson, J., Reuter, A. S., Flasse, L., Manfroid, I., Voz, M. L., & Peers, B. (2020). Pancreatic and intestinal endocrine cells in zebrafish share common transcriptomic signatures and regulatory programmes. *BMC biology*, *18*(1), 109. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00840-1>
- Lazado C. C. (2020). The 1st international symposium on mucosal health in aquaculture - MHA2019. *Tissue barriers*, *8*(2), 1712177. <https://doi.org/10.1080/21688370.2020.1712177>
- Li, J., Prochaska, M., Maney, L., & Wallace, K. N. (2020). Development and organization of the zebrafish intestinal epithelial stem cell niche. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, *249*(1), 76–87. <https://doi.org/10.1002/dvdy.16>
- Li, Y., Wang, D., Ge, H., Güngör, C., Gong, X., & Chen, Y. (2022). Cytoskeletal and Cytoskeleton-Associated Proteins: Key Regulators of Cancer Stem Cell Properties. *Pharmaceuticals*, *15*(11), 1369. <https://doi.org/10.3390/ph15111369>
- Løkka, G., Austbø, L., Falk, K., Bjerkås, I., & Koppang, E. O. (2013). Intestinal morphology of the wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of morphology*, *274*(8), 859–876. <https://doi.org/10.1002/jmor.20142>
- Losada García, A. P. (2013). *Enteromixosis del rodaballo: esclarecimiento de mecanismos patogénicos y rutas de la respuesta inmunitaria* [Tesis de Maestría, Universidade de Santiago de Compostela]. Repositorio Institucional –Universidade de Santiago de Compostela.
- Maga, G., & Hubscher, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of cell science*, *116*(15), 3051–3060. <https://doi.org/10.1242/jcs.00653>
- Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods in molecular biology*, *1897*, 289–298. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25
- Mokhtar, D. M. (2021). *Fish Histology: From Cells to Organs*. Apple Academic Press.
- Mostowy, S., & Cossart, P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *13*(3), 183–194. <https://doi.org/10.1038/nrm3284>

- Muncan, V., Faro, A., Haramis, A. P., Hurlstone, A. F., Wienholds, E., van Es, J., Korving, J., Begthel, H., Zivkovic, D., & Clevers, H. (2007). T-cell factor 4 (Tcf712) maintains proliferative compartments in zebrafish intestine. *EMBO reports*, 8(10), 966–973. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401071>
- Negróni, A., Cucchiara, S., & Stronati, L. (2015). Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis. *Mediators of inflammation*, 2015, 250762. <https://doi.org/10.1155/2015/250762>
- Nimalan, N., Sørensen, S. L., Fečkaninová, A., Koščová, J., Mudroňová, D., Gancarčíková, S., Vatsos, I. N., Bisa, S., Kiron, V., & Sørensen, M. (2022). Mucosal barrier status in Atlantic salmon fed marine or plant-based diets supplemented with probiotics. *Aquaculture*, 547, 737516. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737516>
- Oehlers, S. H., Flores, M. V., Hall, C. J., O'Toole, R., Swift, S., Crosier, K. E., & Crosier, P. S. (2010). Expression of zebrafish cxcl8 (interleukin-8) and its receptors during development and in response to immune stimulation. *Developmental and comparative immunology*, 34(3), 352–359. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.11.007>
- O'Hurley, G., Sjöstedt, E., Rahman, A., Li, B., Kampf, C., Pontén, F., Gallagher, W. M., & Lindskog, C. (2014). Garbage in, garbage out: a critical evaluation of strategies used for validation of immunohistochemical biomarkers. *Molecular oncology*, 8(4), 783–798. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.03.008>
- Ostrander, G. K. (2000). *The laboratory fish*. Academic Press.
- Paquette, C. E., Kent, M. L., Peterson, T. S., Wang, R., Dashwood, R. H., & Löhr, C. V. (2015). Immunohistochemical characterization of intestinal neoplasia in zebrafish *Danio rerio* indicates epithelial origin. *Diseases of aquatic organisms*, 116(3), 191–197. <https://doi.org/10.3354/dao02924>
- Porter, A. G., & Jänicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation*, 6(2), 99–104. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400476>
- Ramos-Vara J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary pathology*, 42(4), 405–426. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>
- Ramos-Vara J. A. (2017). Principles and Methods of Immunohistochemistry. *Methods in molecular biology*, 1641, 115–128. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7172-5_5
- Ramrus, D. A., & Berg, J. C. (2004). Characterization and adhesion testing of mixed silane-treated surfaces. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 18(12), 1395–1414. <https://doi.org/10.1163/1568561042323257>
- Rao, R. K., Basuroy, S., Rao, V. U., Karnaky, K. J., Jr, & Gupta, A. (2002). Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *The Biochemical journal*, 368(2), 471–481. <https://doi.org/10.1042/BJ20011804>
- Rolig, A. S., Mittge, E. K., Ganz, J., Troll, J. V., Melancon, E., Wiles, T. J., Alligood, K., Stephens, W. Z., Eisen, J. S., & Guillemin, K. (2017). The enteric nervous system

- promotes intestinal health by constraining microbiota composition. *PLoS biology*, *15*(2), e2000689. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000689>
- Ronza, P., Estensoro, I., Bermúdez, R., Losada, A. P., Pérez-Cordón, G., Pardo, B. G., Sitjà-Bobadilla, A., & Quiroga, M. I. (2020). Effects of *Enteromyxum* spp. (Myxozoa) infection in the regulation of intestinal E-cadherin: Turbot against gilthead sea bream. *Journal of fish diseases*, *43*(3), 337–346. <https://doi.org/10.1111/jfd.13130>
- Ronza, P., Villamarín, A., Méndez, L., Pardo, B. G., Bermúdez, R., & Quiroga, M. I. (2019). Immunohistochemical expression of E-cadherin in different tissues of the teleost fish *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, *501*, 465–472. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.009>
- Sanden, M., Berntssen, M. H., Krogdahl, A., Hemre, G. I., & Bakke-McKellep, A. M. (2005). An examination of the intestinal tract of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr fed different varieties of soy and maize. *Journal of fish diseases*, *28*(6), 317–330. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00618.x>
- Sanden, M., & Olsvik, P. A. (2009). Intestinal cellular localization of PCNA protein and CYP1A mRNA in Atlantic salmon *Salmo salar* L. exposed to a model toxicant. *BMC physiology*, *9*(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-9-3>
- Santoriello, C., & Zon, L. I. (2012). Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *The Journal of clinical investigation*, *122*(7), 2337–2343. <https://doi.org/10.1172/JCI60434>
- Shenoy, A., Banerjee, M., Upadhyaya, A., Bagwe-Parab, S., & Kaur, G. (2022). The Brilliance of the Zebrafish Model: Perception on Behavior and Alzheimer's Disease. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *16*, 861155. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.861155>
- Singhai, R., Patil, V. W., Jaiswal, S. R., Patil, S. D., Tayade, M. B., & Patil, A. V. (2011). E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer. *North American journal of medical sciences*, *3*(5), 227–233. <https://doi.org/10.4297/najms.2011.3227>
- Sitjà-Bobadilla, A., Gil-Solsona, R., Estensoro, I., Piazzon, M. C., Martos-Sitcha, J. A., Picard-Sánchez, A., Fuentes, J., Sancho, J. V., Caldach-Giner, J. A., Hernández, F., & Pérez-Sánchez, J. (2019). Disruption of gut integrity and permeability contributes to enteritis in a fish-parasite model: a story told from serum metabolomics. *Parasites & vectors*, *12*(1), 486. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3746-7>
- Steinel, N. C., & Bolnick, D. I. (2017). Melanomacrophage Centers As a Histological Indicator of Immune Function in Fish and Other Poikilotherms. *Frontiers in immunology*, *8*, 827. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00827>
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., & Singer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, *291*(5813), 293–296. <https://doi.org/10.1038/291293a0>
- Suvarna, S. K., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2019). *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. Elsevier.

- Taupin P. (2007). BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain research reviews*, 53(1), 198–214. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.08.002>
- Tizard, I. R. (2009). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Elsevier.
- Torres-Ruiz, M., De la Vieja, A., de Alba Gonzalez, M., Esteban Lopez, M., Castaño Calvo, A., & Cañas Portilla, A. I. (2021). Toxicity of nanoplastics for zebrafish embryos, what we know and where to go next. *The Science of the total environment*, 797, 149125. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149125>
- Ulloa, P. E., Medrano, J. F., & Feijoo, C. G. (2014). Zebrafish as animal model for aquaculture nutrition research. *Frontiers in genetics*, 5, 313. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00313>
- Vacaru, A. M., Unlu, G., Spitzner, M., Mione, M., Knapik, E. W., & Sadler, K. C. (2014). In vivo cell biology in zebrafish - providing insights into vertebrate development and disease. *Journal of cell science*, 127(3), 485–495. <https://doi.org/10.1242/jcs.140194>
- Valle, L. D. (2022). *Immunohistochemistry and Immunocytochemistry : Methods and Protocols*. Springer.
- Varone, V. (2012). 1.22 - Biopsic Sampling (Cancer). *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 413–439. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00028-4>
- Wallace, K. N., Akhter, S., Smith, E. M., Lorent, K., & Pack, M. (2005). Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mechanisms of development*, 122(2), 157–173. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.10.009>
- Wallaeys, C., Garcia-Gonzalez, N., & Libert, C. (2023). Paneth cells as the cornerstones of intestinal and organismal health: a primer. *EMBO molecular medicine*, 15(2), e16427. <https://doi.org/10.15252/emmm.202216427>
- Wang, Z., Du, J., Lam, S. H., Mathavan, S., Matsudaira, P., & Gong, Z. (2010). Morphological and molecular evidence for functional organization along the rostrocaudal axis of the adult zebrafish intestine. *BMC genomics*, 11, 392. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-392>
- Wu, X., Hua, X., Xu, K., Song, Y., & Lv, T. (2023). Zebrafish in Lung Cancer Research. *Cancers*, 15(19), 4721. <https://doi.org/10.3390/cancers15194721>
- Xia, H., Chen, H., Cheng, X., Yin, M., Yao, X., Ma, J., Huang, M., Chen, G., & Liu, H. (2022). Zebrafish: an efficient vertebrate model for understanding role of gut microbiota. *Molecular medicine*, 28(1), 161. <https://doi.org/10.1186/s10020-022-00579-1>
- Yu, Y., Wang, Q., Huang, Z., Ding, L., & Xu, Z. (2020). Immunoglobulins, Mucosal Immunity and Vaccination in Teleost Fish. *Frontiers in immunology*, 11, 567941. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.567941>
- Zhao, X., & Pack, M. (2017). Modeling intestinal disorders using zebrafish. En H. William Detrich, Monte Westerfield, Leonard I. Zon (Ed.), *Methods in Cell Biology* (241-270). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.11.006>

- Zheng, X., Fu, D., Cheng, J., Tang, R., Chu, M., Chu, P., Wang, T., & Yin, S. (2021). Effects of hypoxic stress and recovery on oxidative stress, apoptosis, and intestinal microorganisms in *Pelteobagrus vachelli*. *Aquaculture*, *543*, 736945. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736945>
- Zessin, P. J., Sporbert, A., & Heilemann, M. (2016). PCNA appears in two populations of slow and fast diffusion with a constant ratio throughout S-phase in replicating mammalian cells. *Scientific reports*, *6*, 18779. <https://doi.org/10.1038/srep18779>