UNIVERSIDAD SAN SEBASTIAN
VOCACIÓN POR LA EXCELENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA NATURALEZA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA
CARRERA MEDICINA VETERINARIA
SEDE DE LA PATAGONIA

DIFERENCIAS ANATÓMICAS E HISTOLÓGICAS DEL TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A MUCOSAS (MALT) EN DOS ESPECIES DE SALMÓNIDOS PROVENIENTES DE LA REGIÓN DE LOS LAGOS, CHILE

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO

Profesor guía: Mg. Luis Miguel Flores Velázquez
Profesor Copatrocinador: Dr. Frank Vera Otárola
Estudiante: **Javiera Camila Cantero Bustamante**

Puerto Montt, Chile

2024

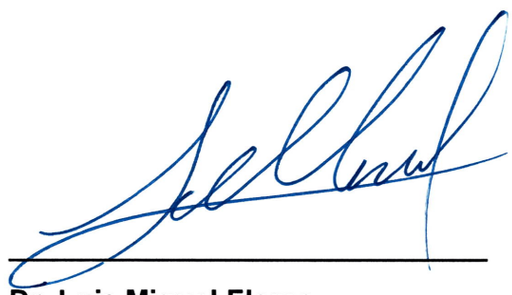
®Javiera Camila Cantero Bustamante. Se autoriza la reproducción parcial o total de esta obra, con fines académicos, por cualquier forma, medio o procedimiento, siempre y cuando se incluya la cita bibliográfica del documento.

Puerto Montt, Chile

2024

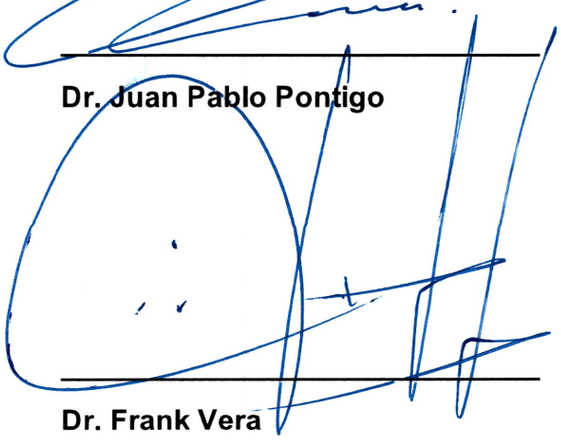
HOJA DE CALIFICACIÓN

En Puerto Montt, el 23 de julio de 2024, los abajo firmantes dejan constancia que el (la) estudiante Javiera Camila Cantero Bustamante de la carrera de Medicina Veterinaria ha aprobado su Memoria de Título para optar al grado de Médico Veterinario con una nota de 6,1



Dr. Luis Miguel Flores

Dr. Juan Pablo Pontigo



Dr. Frank Vera

AGRADECIMIENTOS

Comenzar agradeciendo a mis profesores el Dr. Luis Miguel Flores, Dr. Frank Vera y también a la TM. Jeraldine Poveda por su paciencia, apoyo y guía entregados para la realización este estudio.

A mi familia y amigos por la contención emocional que me brindaron en este último periodo de la carrera, que no fue para nada fácil.

Y a mi motivación para seguir adelante, mi gata Bloom que me acompañó largas noches de redacción, estudio y análisis. Sin duda no lo hubiera logrado sin su apoyo y amor.

INDICE DE CONTENIDOS

1 INTRODUCCION 1

1.1 Acuicultura en Chile 1

1.2 Producción de salmónidos 1

1.3 Inmunidad en peces 2

1.4 Relevancia de la investigación 6

2 HIPÓTESIS 7

3 OBJETIVOS 7

3.1 Objetivo general 7

3.2 Objetivos específicos 7

4 MATERIALES Y METODOS 8

4.1 Tipo de estudio 8

4.2 Obtención de muestras 8

4.2.1 Obtención de peces 8

4.2.2 Necropsia 8

4.2.3 Histología 10

4.3 Cálculo de estudio 12

5 RESULTADOS 12

5.1 Identificación de las estructuras anatómicas e histológicas en las dos especies de salmónidos. 12

5.2 Comparación de las estructuras anatómicas en tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) en las dos especies de salmones antes mencionados 14

5.3 Comparación de las estructuras histológicas en tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) en las dos especies de salmones antes mencionados. 14

6 DISCUSIÓN 17

7 CONCLUSION 20

8 BIBLIOGRAFIA 21

9 ANEXOS 24

INDICE DE FIGURAS

Figura 1..... 3

Figura 2..... 5

Figura 3..... 9

Figura 4..... 9

Figura 5……..……11

Figura 6……..……12

Figura 7……..……14

INDICE DE TABLAS

Tabla 1……15

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo investigar las diferencias anatómicas e histológicas del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) en dos especies de salmónidos, *Salmo salar* (salmón del Atlántico) y *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris), provenientes de la Región de los Lagos, Chile. Dos especies de importancia en la acuicultura del país, para ello se analizaron 5 ejemplares de cada especie mediante necropsias y análisis histológicos en órganos clave como la boca, branquias, aletas, piel y tracto digestivo. Los resultados muestran diferencias en la cantidad, distribución y morfología del MALT entre ambas especies. En *Salmo salar*, los acúmulos linfoides son más abundantes en la boca y el tracto digestivo, donde presentan un tamaño mayor y una distribución más dispersa, principalmente en la submucosa. En contraste, *Oncorhynchus mykiss* muestra una mayor cantidad de acúmulos en las branquias, aunque estos son más pequeños y localizados. Los acúmulos en la boca y aletas de *O. mykiss* tienden a ser más alargados y angostos, a diferencia de los acúmulos más circulares observados en *S. salar*. La piel en ambas especies presenta una baja presencia de MALT, con acúmulos difícilmente visualizables, ubicados en el subcutáneo o infiltrados en la musculatura superficial. En general, *S. salar* exhibe una mayor presencia de MALT en las regiones analizadas en comparación con *O. mykiss*. Estos hallazgos sugieren diferencias en la respuesta inmunitaria entre las dos especies, lo que podría tener implicaciones significativas para su manejo y salud en la acuicultura.

Palabras clave: teleósteos, sistema inmune, acumulo linfoide, comparación.

ABSTRACT

The present study aimed to investigate the anatomical and histological differences of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) in two salmonid species, *Salmo salar* (Atlantic salmon) and *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout), from the Los Lagos Region, Chile. These are two important species in the country's aquaculture industry. To this end, five specimens of each species were analyzed through necropsies and histological analysis of key organs such as the mouth, gills, fins, skin, and digestive tract. The results show differences in the quantity, distribution, and morphology of MALT between the two species. In *Salmo salar*, lymphoid accumulations are more abundant in the mouth and digestive tract, where they are larger and more diffusely distributed, mainly in the submucosa. In contrast, *Oncorhynchus mykiss* exhibits a greater number of accumulations in the gills, although these are smaller and more localized. The accumulations in the mouth and fins of *O. mykiss* tend to be more elongated and narrower, unlike the more circular accumulations observed in *S. salar*. The skin in both species shows a low presence of MALT, with accumulations barely visible, located in the subcutaneous tissue or infiltrated into the superficial musculature. Overall, *S. salar* exhibits a greater presence of MALT in the analyzed regions compared to *O. mykiss*. These findings suggest differences in the immune response between the two species, which could have significant implications for their management and health in aquaculture.

Keywords: teleost, immune system, lymphoid accumulation, comparison.

1 INTRODUCCION

1.1 Acuicultura en Chile

La acuicultura y específicamente la salmonicultura ha logrado posicionar a Chile en el segundo puesto a nivel global, concentrando el 28% de la producción mundial. Esto debido a sus condiciones ambientales como la temperatura del agua que oscila entre 10°C y 12°C, niveles de oxígeno apropiados y una larga costa que hace a Chile un lugar ideal para el cultivo de salmones como salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Consejo del Salmón, 2023).

Las especies mencionadas anteriormente son introducidas y han dado excelentes resultados en cuanto a su cultivo y producción. Son peces teleósteos, o sea que cuentan con esqueleto y tienen la capacidad de protruir la mandíbula, son de agua fría, poiquilotermos, es decir que no regulan su temperatura, sino que está influenciada directamente por la temperatura ambiental, son carnívoros y se cultivan principalmente en la zona sur del país, entre la región de la Araucanía (IX) y región de Magallanes (XII), a excepción de la trucha que puede abarcar también la región del Biobío (VIII) (Bjørndal y Aarland, 1999; SUBPESCA, 2020b).

1.2 Producción de salmónidos

El ciclo productivo que se realiza tanto con *S. salar* y *O. mykiss* comienza con la obtención de gametos en pisciculturas que son centros de cultivo en tierra, pero abastecidos con fuentes naturales de agua dulce, aquí, los gametos se fecundan e incuban. En su primera etapa de vida se llama “ova ojo” ya que se logran diferenciar dos puntos negros dentro de la ova los cuales serán los ojos de los futuros peces, estos en un tiempo eclosionan y se convierten en alevines, luego reabsorben su saco vitelino y están listos para comenzar a comer por si solos, en este punto alcanzan un peso aproximado de 0,16 a 0,20 gr., poco a poco van ganando peso y es necesario ir separando por tallas (S, M, L, XL) para mantener una correcta alimentación y

crecimiento uniforme según grupo, además en esta etapa se les aplica su primera vacuna por lo que la inoculación debe ser lo más precisa posible según peso, luego de esto llegan a etapa de juveniles y comienza la smoltificacion (cercano a los 60gr.), etapa muy importante en donde el salmón se adapta y cambia su fisiología celular para seguir su ciclo en agua de mar, ya que, al ser este un medio en el que hay mayor cantidad de Na+ disuelto necesita desarrollar la capacidad de osmorregulación (Orrego, 2018; Salcedo, 2020). Luego se envían a centros de cultivo en agua de mar donde terminan su engorde hasta que finalmente son llevados a las plantas de faenamiento para después ser comercializados.

Según el registro nacional de acuicultura se encuentran inscritos 1000 centros de cultivo en mar y 266 en tierra para trucha arcoíris (SUBPESCA, 2020b), 1021 centros de cultivo en mar y 214 en tierra para salmón del Atlántico (SUBPESCA, 2020a).

La importancia de cada especie en el mercado recae en parte en la diferencia en sabor de su carne, ya que el salmón tiende a ser más intenso que la trucha la cual es de sabor más neutro, pero también más jugoso (OpinionDual, 2023). Otra diferencia es que el salmón tiene menos espinas, los filetes son más grandes y su periodo de cultivo es más extenso en comparación a la trucha.

1.3 Inmunidad en peces

El sistema inmune de los salmónidos es muy similar al del resto de los vertebrados, su función es proteger contra patógenos y se divide en innato o adquirido, sus principales órganos linfoides son el timo, órgano bilateral ubicado bajo la faringe, aquí es donde se generan los linfocitos, al igual que en otros animales este órgano está bien diferenciado en individuos jóvenes y va involucionando a medida que envejecen, por ejemplo, en la trucha arcoíris juvenil se observan poros que a medida que el animal envejece se van cerrando y el epitelio que recubre al timo se va engrosando (Vega et al., 2010). Otro órgano linfoide es el riñón cefálico, en los peces el riñón ocupa gran parte de la zona dorsal del animal, bajo la columna y se subdivide cumpliendo diversas

funciones, la porción más craneal es la encargada de diferenciar eritrocitos y otros leucocitos como son los linfocitos B y macrófagos, este es el análogo a la medula ósea de los mamíferos (Bjørgen y Koppang, 2021; Vega et al., 2010). El bazo cumple una función similar al riñón cefálico, pero en menor medida, es un órgano único, pero en ocasiones puede haber dos o más bazos (generalmente asociado a patologías), además hay tejido como las mucosas (MALT) y la piel el cual no se considera órgano linfoide como tal pero si encontramos linfocitos, macrófagos células plasmáticas y granulocitos (Vega et al., 2010). Cuando el animal esta inmunosuprimido o hay factores extrínsecos como la temperatura, la estación del año o cualquier agente que estrese severamente al pez aumenta el cortisol en sangre, hormona responsable de disminuir la respuesta inmune lo que hace al pez más susceptible a infecciones e infestaciones parasitarias (Olabuenaga, 2000; Penagos et al., 2009).

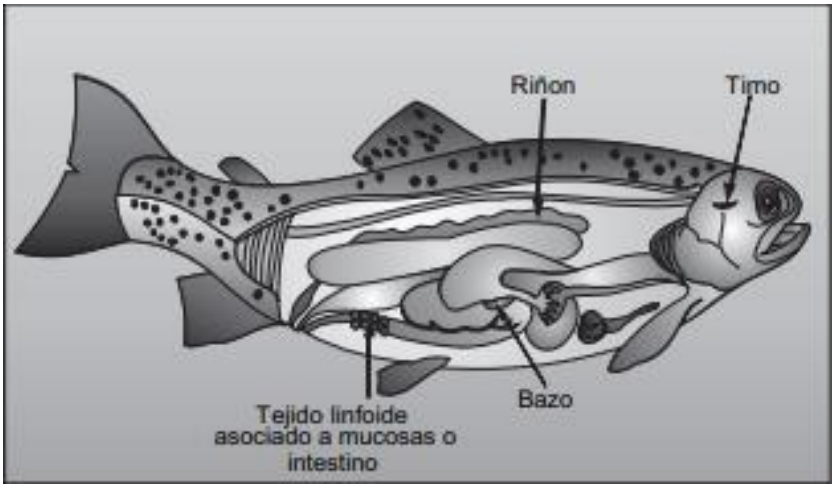


Figura 1: Localización de los principales órganos linfoides en los peces teleósteos. Fuente: Vega et al., 2010.

Dentro de la respuesta inmune innata tenemos la primera línea de defensa ante cualquier patógeno o agente irritante es la misma piel y mucus que los recubre, este contiene enzimas proteolíticas y a su vez este se va generando y eliminando continuamente para mantener así su función protectora contra hongos, bacterias, virus y parásitos (Olabuenaga, 2000). Este mucus también es secretado internamente por todo el tracto gastrointestinal que sumado al pH acido del estómago cumple la misma función protectora (Olabuenaga, 2000). Por otra parte, existen las células NK (por sus

siglas en ingles Natural Killer) es un tipo de linfocito encargados de generar lisis por medio de la citotoxicidad que generan al entrar en contacto con la célula blanco y secreción de citoquinas marcadoras (Olabuenaga, 2000). En cuanto a las células fagocíticas, que son las encargadas de capturar y digerir material extraño, estas se pueden dividir en granulocitos o polimorfonucleares (heterófilos, eosinófilos y basófilos) los cuales contienen gránulos lisosomales en su citoplasma, no poseen gran capacidad fagocítica, pero al liberar sus gránulos si pueden generar lisis de células y membranas (Fernández et al., 2002).Y por otro lado tenemos los agranulocitos o mononucleares (monocitos), células de gran tamaño, con gran capacidad fagocítica también conocidos como macrófagos (Olabuenaga, 2000).

En cuanto al sistema inmune adquirido, cuando un agente extraño al cual llamaremos antígeno ingresa al cuerpo, se activan los linfocitos B los cuales detectan los antígenos y comienzan a producir inmunoglobulinas (Ig) (Olabuenaga, 2000). En los peces se encuentran las IgM un tipo de proteínas de marcaje que al igual que el resto de las Igs se encuentran en el suero de la sangre, gracias a esto pueden traspasar vasos sanguíneos y encontramos Igs en casi todos los tejidos, fluidos tisulares, linfa, y mucus epitelial. Luego a los linfocitos T se les presenta el antígeno (Ag) mecanismo mediado por células presentadoras de antígeno (APC) y en conjunto a otras células como: granulocitos, trombocitos y macrófagos, es que finalmente los patógenos son atacados y fagocitados (Olabuenaga, 2000). Además, hace un par de años se encontraron nuevas Igs, una es la inmunoglobulina teleóstea (IgT/IgZ), esta actúa principalmente en las mucosas concentrándose en la mucosa intestinal siendo la inmunoglobulina más presente en este tejido, y es producida específicamente por un tipo de linfocitos B que no genera otras Igs (Dornburg et al., 2021; Ekaitz Maguregui, 2020; Rozas Serri, 2024).

Al ser especies poiquilotermas, están influenciados por la temperatura ambiental y cambio de estación, lo que también se ve reflejado en su sistema inmune, más específicamente en la producción de inmunoglobulinas. Se describe que a mayor temperatura (dentro de los rangos óptimos para la especie) hay mayor producción de

Igs y, por el contrario, a bajas temperaturas la producción tiende a disminuir hasta en casos extremos, desaparecer. Esto se explica porque la temperatura igualmente afecta el crecimiento y desarrollo de los peces, de igual forma a mayor temperatura crecen más rápido por lo que su sistema inmune madura de mejor manera (Olabuenaga, 2000).

Una característica especial de la inmunidad en peces es la formación de centros melanomacrofagos (CMMs) presentes principalmente en bazo, pero de igual forma los podemos encontrar en riñón, hígado, gónadas y timo (Fernández et al., 2002). Es una acumulación de células fagocíticas con gran cantidad de productos de desecho provenientes de eritrocitos y tejido dañado, haciendo que se acumule en su interior diversos pigmentos, por ejemplo: melanina, lipofuscina por oxidación de ácidos grasos y hemosiderina de la metabolización de la hemoglobina (Penagos et al., 2009). La melanina que acumula en gránulos y sirve para la absorción de radicales libres perjudiciales para otras células, además se le atribuye la capacidad bactericida al combinarse con peroxidasa (Fernández et al., 2002). Los CMMs también pueden almacenar complejos antígeno-anticuerpo que estos macrófagos fagocitaron en algún momento y se piensa que esto podría estimular la respuesta inmune especifica (Fernández et al., 2002). Se ha encontrado en grandes cantidades en peces que cursan algún cuadro patológico por lo que se relaciona directamente al estado sanitario del individuo (Fernandez et al., 2002; Penagos et al., 2009).

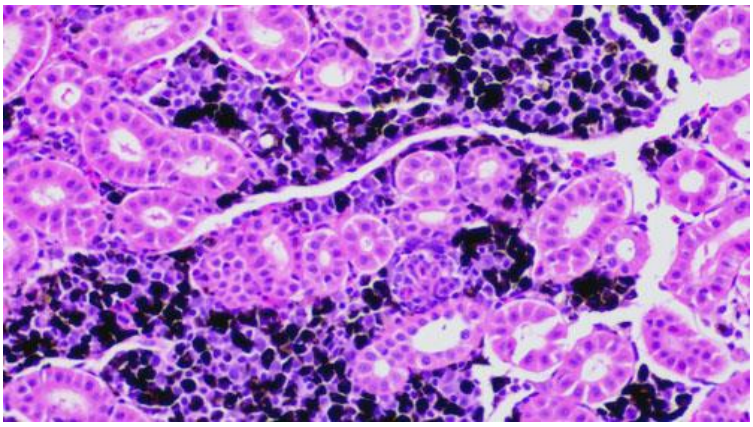


Figura 2: Salmón del Atlántico (Salmo salar), afectado por cuadro crónico de Enfermedad bacteriana del riñón (Renibacterium salmoninarum). Riñón (H-E, 100X). Se observa incremento de melanomacrofagos en el intersticio renal. Fuente: (Godoy, 2014).

1.4 Relevancia de la investigación

Como se ha abordado anteriormente, los peces cuentan con un sistema inmune eficiente y similar al resto de vertebrados, con la diferencia que no cuentan con médula ósea por lo que otros órganos como el riñón, timo, bazo y tejido linfoide asociado a mucosas toman relevancia para suplir la función linfopoyética y hematopoyética. En los próximos ítems abordaremos las diferencias macroscópicas y microscópicas, específicamente de MALT, entre las tres especies de salmónidos antes mencionados, ya que son de alta importancia económica en el sur de Chile y es necesario conocer las diferencias anatómicas y fisiológicas del tejido linfoide entre estos salmónidos con el fin de exponer esta información y en un futuro poder mejorar y buscar nuevas estrategias como vacunas o fármacos para buscar nuevas técnicas de producción y prevención de enfermedades en *S. salar* y *O. mykiss.* Un ejemplo de esto es el uso de antibióticos que a su vez contaminan los ecosistemas, por esto, mejorar nuestras técnicas de cultivo disminuiría también el impacto ambiental. Además, reconocer las similitudes y diferencias entre ellos nos podrían dar indicios de susceptibilidad e inmunidad frente a posibles patógenos según especie, facilitando la selección de mejores reproductores que nos aseguren que las cepas son cada vez más resistentes a enfermedades,

proporcionando así un bienestar tanto de los peces como de los futuros consumidores y a su vez garantizar la sostenibilidad de la acuicultura.

2 HIPÓTESIS

Existen diferencias anatómicas e histológicas en el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) entre las especies de salmónidos, salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Realizar estudio anatómico e histológico en base al tejido linfoide asociado a mucosas en las dos especies de salmónidos, salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), los cuales serán peces sanos, pre-smolt y sacrificados en el centro de procedencia.

3.2 Objetivos específicos

I. Identificar las estructuras anatómicas e histológicas en las dos especies de salmónidos.

II. Comparar las estructuras anatómicas en tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) en las dos especies de salmones antes mencionados.

III. Comparar las estructuras histológicas en tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) en las dos especies de salmones antes mencionados.

4 MATERIALES Y METODOS

4.1 Tipo de estudio

El tipo de estudio a realizar será de tipo experimental con un diseño transversal descriptivo y cualitativo, ya que, se realizará un estudio anatómico e histológico por medio de la necropsia en peces salmónidos en el cual se identificarán y diferenciarán órganos y tejidos de dos especies de salmones cultivados en Chile (Hernández et al., 2014).

4.2 Obtención de muestras

4.2.1 Obtención de peces

Los peces utilizados en este estudio serán provenientes del centro de cultivo mowi (Región de los Lagos, Chile). Los cuales fueron certificados libres de cualquier patógeno de acuerdo con el reglamento sanitario establecido por SERNAPESCA. Además, todos los peces deberán contar con las mismas vacunas, tratamientos, consumo de probióticos y alimentación para que no existan variaciones en el estudio. Los peces a estudiar serán pre-smolt de entre 80 y 120gr.

4.2.2 Necropsia

La necropsia es un estudio sistémico post-mortem, que junto a la recopilación de muestras para laboratorio es una herramienta muy útil para determinar causa de muerte, lesiones pre y post-mortem (Morales et al., 2018). En este caso nos servirá como un método de exploración y diferenciación de las estructuras linfoides de los peces en estudio. Para lo cual necesitaremos: bandeja de disección, pinzas quirúrgicas y anatómicas, porta bisturí, hojas de bisturí del N°4, tijeras quirúrgicas y 10 frascos de vidrio con formalina al 10% neutralizada, además del implemento de seguridad para quien realizara la necropsia, lo que considera: guantes, cofia, mascarilla, overol, pechera impermeable y botas.

Para ello seguiremos una serie de pasos detallados en el protocolo de necropsia de la Universidad Austral de Chile (INSTRUCTIVO DE NECROPSIA Y TOMA DE MUESTRAS CÓDIGO: I-PRE-02, 2010).Comenzando con la evaluación morfométrica donde primero se mide y pesa al pez. Se realiza una evaluación de la anatomía, piel y escamas en la región cefálica, troncal y caudal, destacando la coloración, deformidades y lesiones, tanto en piel como en branquias y cavidad oral. Se sacarán 2 cm. de la piel de la base de ambas aletas y 2 cm. de la piel cercana a la línea media. En cuanto a la mucosa oral se resecará completamente y se extraerán 2 cm. de la mandíbula y 2 cm. de la maxila.

Cuentan con arco branquial, el cual es un armazón de tejido óseo por donde pasan venas y arterias, además de soportar a los filamentos donde ocurre el intercambio gaseoso y también hay presencia de tejido linfoide (Torres et al., 2010). De esta sección es de donde sacaremos una muestra para histología, seccionando el segundo arco branquial izquierdo.

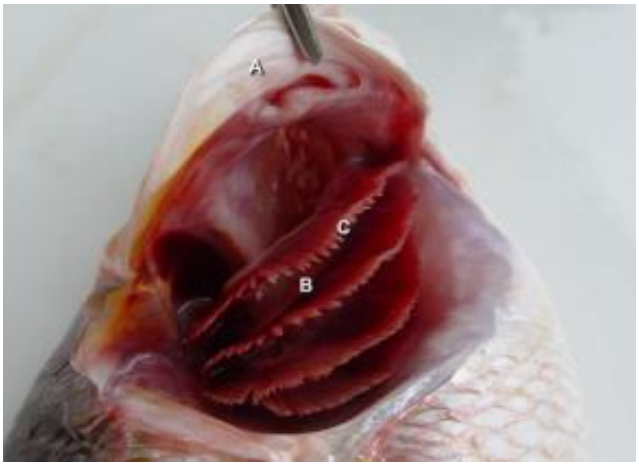


Figura 3: Partes de la branquia. A. Opérculo. B. Arco branquial. C. Filamentos branquiales. Fuente: (Ramírez, 2019).

Luego, procederemos a cortar aletas pectorales, e incidimos con el bisturí o tijeras quirúrgicas por atrás del opérculo trazando una recta siguiendo la línea lateral hasta llegar al ano evitando cualquier daño en los órganos y levantamos la pared lateral con mucho cuidado dejando las vísceras expuestas procurando no dañarlas, procedemos a inspeccionar las vísceras en busca de alguna alteración como liquido o

adherencias. Finalmente, se sacarán los órganos como el hígado, bazo, tracto gastrointestinal y páncreas, cortando cranealmente a nivel de esófago y caudalmente a nivel del orificio anal, dejando al descubierto riñón, vejiga natatoria y gónadas. Se deben sacar fotografías de los órganos para luego realizar la diferenciación macroscópica entre los ejemplares, dando énfasis a mucosa bucal, tracto gastrointestinal, piel y branquias (Morales et al., 2018). Finalmente se resecarán 2 cm. de la porción craneal del intestino, 2 cm. de la porción media y 2 cm. del intestino grueso que es la porción caudal cercana al orificio anal, además 2 cm. de cada ciego pilórico.

Si bien, macroscópicamente no se lograra ver MALT como tal, se compararán las zonas anatómicas de las cuales se tomarán muestras para después determinar si MALT se encuentra en la misma ubicación anatómica de ambas especies.

Figura 4: Imagen ilustrativa del corte a realizar en necropsia. Fuente: (Godoy M, 2023)

4.2.3 Histología

La histología es una rama de la anatomía la cual estudia los tejidos de los seres vivos por medio de microscopia (Mejía et al., 2019). Para el presente estudio nos guiaremos por el “Manual de procedimientos de laboratorio de histopatología veterinaria” por TM. Jeraldine Betsabé Poveda Tapia y Dr. Frank Vera Otárola (Anexo 1)(Asencio, 2023). De esta manera realizar un análisis comparativo del tejido linfoide

asociado a mucosas en las tres especies de salmónidos en estudio. Para ello se realizará los siguientes procedimientos:

I. Fijación de los tejidos: La finalidad de este primer paso es detener la putrefacción de los tejidos por lo que, una vez tomada la muestra, debe ser colocada en formalina al 10% neutralizada para su mantención.

II. Inclusión de la muestra: Se continua deshidratando la muestra, para esto, se sumerge en una batería de alcoholes etílicos ascendente (70°, 95° y 100°) para reemplazar todo el agua de las células, luego viene el aclaramiento, donde se pasa por xilol que le otorga transparencia a la muestra, se sigue con la infiltración de parafina liquida a altas temperaturas (58 a 65°C) para que ingrese a las células, finalmente se coloca en moldes de metal y se deja enfriar para la formación del taco de parafina con la muestra dentro.

III. Microtomía: Se usa el microtomo para cortar el taco de parafina en una lámina fina de no más de 5µm idealmente, luego a esta tira se le realiza un baño de flotación que consiste en estirarla en agua tibia (40°C) para estirar la muestra con la parafina para adherirlos al portaobjetos y se deja secar a 70°C por una hora.

IV. Desparafinación: En esta etapa se elimina toda la parafina por medio del xilol dejando solo el tejido en el vidrio para su posterior tinción, eso se realiza mediante una batería de alcoholes etílicos descendente (100°, 95° y 70°) y finaliza con agua destilada.

V. Tinción: Se utiliza la tinción de rutina que consta de hematoxilina que tiñe el núcleo y eosina que tiñe componentes del citoplasma (HE).

VI. Deshidratación y montaje: Para que las muestras duren mucho más tiempo se vuelven a deshidratar post tinción con la batería de alcoholes ascendente (70°, 95° y 100°) y un último baño con xilol para volver a aclarar la muestra. Finalmente, se cubre la muestra con un cubreobjetos con resina sintética.

Para evaluar y comparar cantidad de MALT se medirán ancho y alto de los acúmulos de células linfoides presentes.

4.3 Cálculo de estudio

El estudio transversal descriptivo es un tipo de investigación en el que se recolectan datos en algún momento específico dentro de un estudio, como en el caso de este trabajo, donde tendremos un tamaño muestral de 10 peces sanos, los cuales serán: 5 salmones del Atlántico (*Salmo salar*) y 5 truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Los 5 ejemplares de cada especie serán seleccionados al azar dando así un diseño de estudio de tipo aleatorio con el cual podemos tener una comparación de los tejidos linfoides asociados a mucosas más eficaz entre las tres especies de salmónidos.

5 RESULTADOS

5.1 Identificación de las estructuras anatómicas e histológicas en las dos especies de salmónidos.

Dentro de los 10 peces analizados, se tomaron muestras de boca (mandíbula y maxila), branquias, aletas, línea lateral y tracto gastrointestinal.

Figura 5: Comparación anatómica externa entre salmón del atlántico (a) y trucha arcoíris (b). Las muestras fueron tomadas desde la boca (tanto maxila como mandíbula) (1), branquia (2), aleta pectoral (3) y línea lateral (4).

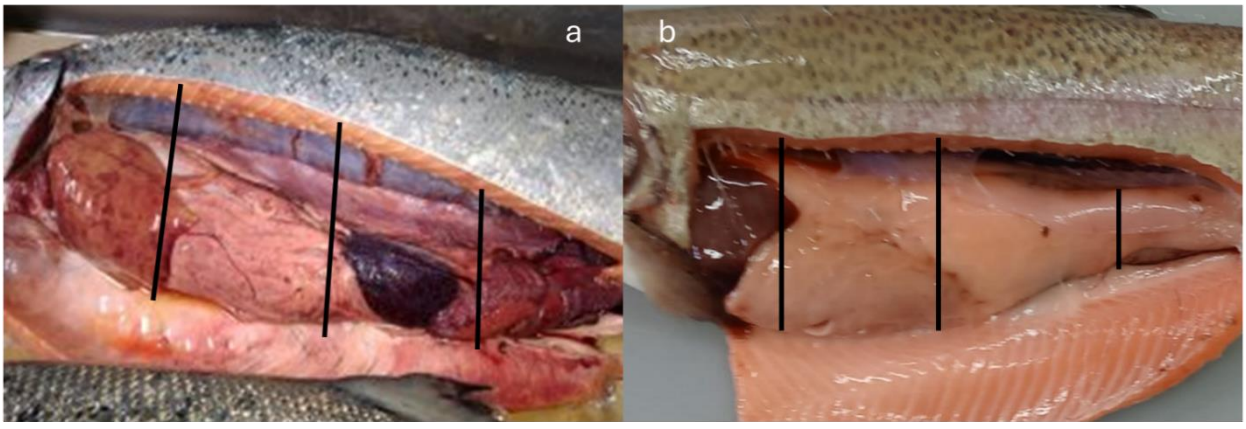


Figura 6: Comparación anatómica interna del tracto gastrointestinal de salmón del atlántico (a) y trucha arcoíris (b). Las líneas demarcan las 3 secciones anatómicas de donde se sacaron muestras para histología.

5.2 Comparación de las estructuras anatómicas en tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) en las dos especies de salmones antes mencionados.

A nivel macroscópico, no se logró observar mayor diferencia que nos den indicios de la presencia de tejido linfoide asociado a mucosas, principalmente por el pequeño tamaño de los acúmulos, los cuales no median más de 4mm y en general fueron encontrados en capas celulares más profundas, por lo que la histología fue fundamental para obtener resultados precisos sobre la estructura y distribución de este tejido. La apariencia de los órganos a examinar era propia de cada especie, por tanto, la comparación anatómica macroscópica no fue concluyente.

5.3 Comparación de las estructuras histológicas en tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) en las dos especies de salmones antes mencionados.

Al analizar las muestras al microscopio se lograron ver diferencias entre especies, tales como: los acúmulos linfoides encontrados en boca, considerando maxila y mandíbula, se vieron presentes en mayor cantidad en el salmón del Atlántico que en la trucha, además de tener un tamaño promedio mayor, pero a la vez, se distribuían de manera más dispersa, estos estaban asociados en gran parte a la submucosa.

En aleta encontramos un patrón similar a lo que ocurre en boca, encontrándose más acúmulos en el salmón del Atlántico, pero con la diferencia que en trucha estos conglomerados eran más alargados y angostos, en cambio en salmón tienden a ser más circulares, este se ubicaba lateral al tejido muscular y en ocasiones asociado a tejido adiposo de la aleta.

En cuanto a la muestra branquial de la trucha, es donde se encontró mayor cantidad de tejido linfático, en promedio 4 acúmulos por muestra a diferencia del salmón donde solo se encontraron 2 aproximadamente, los cuales, si bien eran de mayor tamaño, presentaban una distribución dispersa, estos se podían localizar lateral a los filamentos branquiales y en la zona interseptal al centro del arco branquial.

En la piel fue difícil visualizar tejido linfoide, ya que no se encontraron en todas las muestras, sin embargo, los acúmulos encontrados se ubicaban en el subcutáneo o mayormente infiltrado entre la musculatura más superficial.

Finalmente, en el tracto digestivo, fue el lugar anatómico en donde más se encontraron acumulaciones linfoides en el caso del *Salmo salar*, encontrándose en promedio 3 acúmulos por muestra, no así en *Oncorhynchus mykiss* donde, si bien, encontramos presencia de tejido linfoide asociado a mucosas, este fue en mucho menor cantidad. En ambas especies se distribuye de forma similar, de manera difusa, en la mucosa luminal intestinal y también asociado a tejido adiposo circundante.

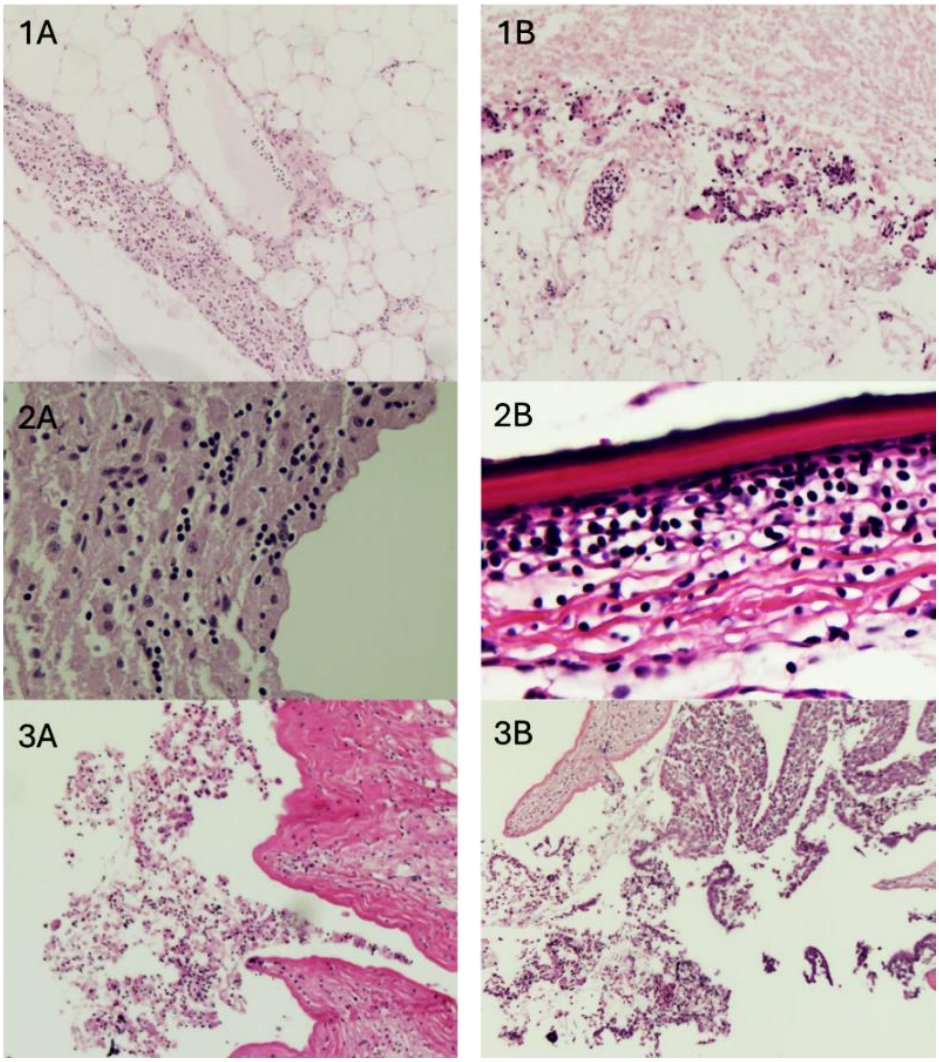


Figura 7: Comparación del tejido linfoide asociado a mucosas en Salmon del atlántico (A) y Trucha arcoíris (B). Las imágenes fueron tomadas de: tracto gastrointestinal a 10x (1), piel a 40x (2) y branquia a 10x (3).

Respecto a la comparación morfológica celular de los linfocitos entre ambas especies, no se encontró gran diferencia, en todas las muestras se observaron células completamente redondeadas con un núcleo prominente y basofilico intenso, donde no se logra divisar la presencia de citoplasma, estas podían encontrarse muy juntas, en grandes concentraciones o presentar una distribución más difusa en ciertos tejidos, ambos acúmulos fueron considerados para el estudio.

		Salmón del Atlántico	Trucha arcoíris
Boca (mandíbula y maxila)	Número de tejido linfoide promedio	2	1
	Tamaño promedio alto	1,81mm	1,44mm
	Tamaño promedio ancho	0,9mm	0,5mm
Aleta pectoral	Número de tejido linfoide promedio	2	1
	Tamaño promedio alto	1,74mm	2,25mm
	Tamaño promedio ancho	0,76mm	0,45mm
Branquia	Número de tejido linfoide promedio	2	4
	Tamaño promedio alto	2,12mm	1,91mm
	Tamaño promedio ancho	0,92mm	0,67mm
Piel	Número de tejido linfoide promedio	1	1
	Tamaño promedio alto	1,72mm	1,3mm
	Tamaño promedio ancho	0,91mm	0,16mm
Tracto gastrointestinal	Número de tejido linfoide promedio	3	2
	Tamaño promedio alto	2,49mm	1,65mm
	Tamaño promedio ancho	0,82mm	0,66mm

Tabla 1: Comparación de número de acúmulos encontrados por muestra, tamaño largo y ancho promedio entre tejido linfoide asociado a mucosas entre salmón del Atlántico y trucha arcoíris.

6 DISCUSIÓN

En el análisis comparativo entre el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), la evaluación macroscópica inicial no reveló diferencias significativas en la apariencia de los órganos que pudieran sugerir la presencia de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT). Esto denota una limitación inherente de la observación a simple vista cuando se trata de identificar estructuras inmunitarias microscópicas, destacando la importancia del análisis histológico para obtener una comprensión detallada y precisa (Sanderson, 2020), además cabe destacar que el tamaño de los individuos usados de cada especie podría ser un factor importante por considerar del porque no se encontraron diferencias a la observación visual, al ser pre-smolt, aún están en crecimiento y desarrollo. Siendo esta una de las limitantes del estudio, en futuras investigaciones se sugiere utilizar peces adultos para poder comparar estructuras en tu total madurez, y denotar así diferencias en MALT de peces que ya hayan pasado por la etapa de smoltificacion, etapa muy importante en los salmónidos, donde se ve afectado y modificados diversos tejidos, órganos y sistemas (Salcedo, 2020). Siendo el inmunitario uno de ellos y de lo que seria interesante seguir indagando.

El análisis histológico mostró que el salmón del Atlántico presenta una mayor cantidad de acúmulos linfoides en la boca (considerando mandíbula y maxila), con un tamaño promedio superior y una distribución más dispersa en comparación con la trucha arcoíris. Estos acúmulos, predominantemente localizados en la submucosa, podrían sugerir una mayor necesidad de respuesta inmunitaria local en el salmón, posiblemente debido a diferencias en la dieta o en la exposición a patógenos orales. La dispersión de los acúmulos podría también indicar una estrategia de defensa más amplia contra posibles infecciones en la cavidad oral del salmón considerando la amplia variedad de patógenos orales presentes en agua de mar (García, 2021). Otro órgano relacionado en donde se describe la presencia de tejido linfoide es en la nasofaringe, la cual no fue incluida en este estudio, pero se sugiere considerarla en futuros estudios (Bjørgen & Koppang, 2021).

En la aleta pectoral, se observó un patrón similar al de la boca, hallándose más acúmulos linfáticos en el salmón del Atlántico, estos eran generalmente más circulares y estaban localizados lateralmente al tejido muscular y ocasionalmente asociados a tejido adiposo. En contraste, los acúmulos en la trucha arcoíris eran más alargados y angostos. Esta diferencia en la forma y localización de los acúmulos linfoides podría reflejar variaciones en la organización estructural del MALT y su funcionalidad en respuesta a estímulos ambientales o patógenos específicos en las aletas de ambas especies, considerando la susceptibilidad a distintas enfermedades según especie (Vidal Márquez, 2021).

Uno de los órganos con mayor presencia de tejido linfoide fueron las branquias, concentrándose en el arco branquial, específicamente en la zona interseptal, esto tiene sustento considerando que el agua es un muy buen medio para la proliferación de patógenos por lo que su vía respiratoria está en constante peligro de infección e ingreso de microorganismos, necesitando una respuesta inmune más activa y esto se logra concentrando tejido linfoide en la zona (Austbø et al., 2014; Rességuier et al., 2020; Xu et al., 2024). En el salmón, aunque los acúmulos eran más grandes, su distribución más dispersa podría indicar una estrategia inmunitaria diferente, posiblemente relacionada con la fisiología branquial o las condiciones ambientales específicas de su hábitat. Se han realizado estudios donde se resalta que gran parte del tejido branquial en salmón del Atlántico está conformado por células T siendo este su principal método de defensa contra patógenos ambientales (Dalum et al., 2016). También se ha estudiado el tejido linfoide asociado a branquia en pez cebra, el cual presenta una distribución bastante similar al resto de teleósteos se describe presencia de tejido linfoide en 5 zonas de la branquia, demostrando que a pesar de ser especies distintas comparten un sistema inmune bastante similar, ocupando las mismas estrategias de defensa contra patógenos (Dalum et al., 2021).

La dificultad para visualizar tejido linfoide en la piel en ambas especies resalta la variabilidad en la presencia de MALT en esta región. Los pocos acúmulos encontrados, se localizaron en el subcutáneo o infiltrados entre la musculatura superficial. Esta variabilidad sugiere que el papel del MALT en la piel puede ser menos prominente,

posiblemente influenciado por factores ambientales o por la naturaleza del epitelio cutáneo, que en peces conlleva a una rápida autolisis de los tejidos. Sin embargo, se ha reportado en otros estudios que la presencia de MALT en piel tiende a ser difusa por lo que es otra razón por la cual no se encontró tejido linfoide en todas las muestras (Salinas, 2015; Vidal Márquez, 2021).

El tracto gastrointestinal del salmón del Atlántico mostró la mayor cantidad de acúmulos linfoides, con un promedio de 3 acúmulos por muestra, en comparación con la trucha arcoíris. La distribución de estos acúmulos en la mucosa luminal intestinal y asociados a tejido adiposo circundante sugiere una función inmunitaria crucial en la defensa contra patógenos ingeridos. La diferencia en la cantidad de MALT entre las dos especies podría reflejar adaptaciones específicas del tracto digestivo a sus dietas y ambientes respectivos, indicando una variación en la necesidad de defensa inmunitaria local. Al igual que en piel, se describe que la presencia de estos acúmulos tiende a ser más difusa (Salinas, 2015).

Un inconveniente al realizar este estudio fue la rápida autolisis de los tejidos como en el caso de la piel, donde no se encontró gran cantidad de tejido linfoide como se describe en otros estudios, esto lo atribuimos al proceso natural de descomposición de los peces que tiende a ser más acelerado que en mamíferos, esto principalmente asociado a los altos niveles de actividad enzimática proteolítica de los peces, estas enzimas son las encargadas de degradar musculatura y órganos *post mortem* (Avelar et al., 1978; Tavares et al., 2021),por lo que para futuros estudios que repliquen esta metodología se recomienda realizar las necropsias y fijación de tejidos inmediatamente *post mortem*, que por problemas de logística no pudimos procesarlas inmediatamente después de realizar la eutanasia, haciendo que el análisis de algunas muestras fuera insatisfactorio.

Considerando todos estos datos recopilados de las especies *Salmo salar* y *Oncorhynchus mykiss,* es que aceptamos parcialmente la hipótesis “Existen diferencias anatómicas en el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) entre las especies de salmónidos, salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)” ya que anatómicamente no se encontraron diferencias relevantes que resaltar.

Sin embargo, si encontramos comparaciones de interés al análisis histológico que se vuelve importante al tomar decisiones prácticas, ya que podrían influir en la susceptibilidad a enfermedades y en la respuesta a tratamientos y vacunas, subrayando la necesidad de enfoques de manejo diferenciados para cada especie.

7 CONCLUSIÓN

El estudio comparativo entre *Salmo salar* y *Oncorhynchus mykiss* se realizó tomando muestras de distintas regiones anatómicas como lo son: boca (maxila y mandíbula), branquias, piel (tomado desde la línea lateral), aletas pectorales y 3 zonas del tracto gastrointestinal. Encontramos presencia de tejido linfoide asociado a mucosas en todas las secciones elegidas, en al menos 2 muestras de cada órgano, por especie.

Al realizar la comparación macroscópica no se revelaron diferencias claras en la presencia y distribución de MALT entre las especies, por lo que se necesitó de la técnica histológica para llegar a resultados claros, esto se puede deber a la edad y tamaño de los ejemplares escogidos para este estudio, ya que en otra etapa más adulta quizás si pudiéramos evidenciar diferencias macroscópicas considerables.

Sin embargo, los hallazgos microscópicos revelan que *Salmo salar* tiene una mayor abundancia y distribución de MALT en las mucosas de la boca y el tracto digestivo, lo que puede facilitar una respuesta inmune más robusta contra patógenos que ingresan por estas vías. En contraste de la mayor cantidad de MALT encontrados en las muestras de branquia de *Oncorhynchus mykiss* puede indicar una mayor capacidad de respuesta en este órgano crítico para la respiración y el intercambio con el medio acuático.

Considerando la información recaudada, donde macroscópicamente no se observaron diferencias y microscópicamente sí, es que aceptamos parcialmente la hipótesis. Por otra parte, estos hallazgos subrayan la importancia de considerar las características específicas del sistema inmune de cada especie en la gestión de salud en acuicultura. Las diferencias en la cantidad, tamaño y distribución de los acúmulos

linfoides sugieren adaptaciones particulares que podrían estar relacionadas con las diferentes estrategias ecológicas, como la dieta, hábitat e infecciones a los que son predisponentes o necesidades inmunitarias de cada especie.

8 BIBLIOGRAFIA

Asencio, L. (2023). *Hallazgos histopatologicos en organos de Salmon del Atlantico (Salmo salar) infectados experimentalmente con dos cepas de Piscirickettsia salmonis*.

Austbø, L., Aas, I. B., König, M., Weli, S. C., Syed, M., Falk, K., & Koppang, E. O. (2014). Transcriptional response of immune genes in gills and the interbranchial lymphoid tissue of Atlantic salmon challenged with infectious salmon anaemia virus. *Developmental & Comparative Immunology*, *45*(1), 107–114. https://doi.org/10.1016/J.DCI.2014.02.007

Avelar, P. M. F., Giacometti, D., & Bacila, M. (1978). Comparative levels of muscle glycolytic enzymes in mammals, fish, echinoderm and molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, *60*(2), 143–148. https://doi.org/10.1016/0305-0491(78)90119-0

Bjørgen, H., & Koppang, E. O. (2021). Anatomy of teleost fish immune structures and organs. In *Immunogenetics* (Vol. 73, Issue 1, pp. 53–63). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/s00251-020-01196-0

Bjørndal, T., & Aarland, K. (1999). Salmon aquaculture in Chile. *Aquaculture Economics and Management*, *3*(3), 238–253. https://doi.org/10.1080/13657309909380251

Consejo del Salmón. (2023). *Consejo del Salmón Chile*.

Dalum, A. S., Griffiths, D. J., Valen, E. C., Amthor, K. S., Austbø, L., Koppang, E. O., Press, C. M. L., & Kvellestad, A. (2016). Morphological and functional development of the interbranchial lymphoid tissue (ILT) in Atlantic salmon (Salmo salar L). *Fish and Shellfish Immunology*, *58*, 153–164. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.013

Dalum, A. S., Kraus, A., Khan, S., Davydova, E., Rigaudeau, D., Bjørgen, H., López-Porras, A., Griffiths, G., Wiegertjes, G. F., Koppang, E. O., Salinas, I., Boudinot, P., & Rességuier, J. (2021). High-Resolution, 3D Imaging of the Zebrafish Gill-Associated Lymphoid Tissue (GIALT) Reveals a Novel Lymphoid Structure, the Amphibranchial Lymphoid Tissue. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.769901

Dornburg, A., Ota, T., Criscitiello, M. F., Salinas, I., Sunyer, J. O., Magadán, S., Boudinot, P., Xu, Z., Flajnik, M. F., Singer, A., Gambón-Deza, F., Hansen, J. D., & Yoder, J. A.

(2021). From IgZ to IgT: A Call for a Common Nomenclature for Immunoglobulin Heavy Chain Genes of Ray-Finned Fish. In *Zebrafish* (Vol. 18, Issue 6, pp. 343–345). Mary Ann Liebert Inc. https://doi.org/10.1089/zeb.2021.0071

Ekaitz Maguregui. (2020, June 15). El sistema inmune de los peces: mejora la producción acuícola a través de la inmunidad. *Veterinaria Digital*.

Fernández, A., De Blas, I., & Ruiz, I. (2002). *El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos*.

García, S. (2021). *Efecto de la dieta con concentrados de proteína vegetal en el crecimiento y respuesta inmune en crías de trucha arcoíris (Oncorhynchus mykiss Walbaum,1792)*.

Godoy, M. (2014). *Proliferación de melanomacrófagos en riñón de Salmón del Atlántico (Salmo salar), afectado por cuadro crónico de Enfermedad bacteriana del riñón (Renibacterium salmoninarum): histopatología.* Marcos Godoy Patologia En Acuicultura.

Godoy M. (2023). *Hígado en nuez moscada en salmónidos: patología macroscópica - MARCOS GODOY*. https://marcosgodoy.com/higado-en-nuez-moscada-en-salmonidos-patologia-macroscopica/

Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación* (6th ed.).

INSTRUCTIVO DE NECROPSIA Y TOMA DE MUESTRAS CÓDIGO: I-PRE-02. (2010).

Mejía, D., Paredes, F., Licona, T., & Salinas, L. (2019). HISTOLOGÍA: DESDE SU ORIGEN HASTA LA ACTUALIDAD. *Revista Científica de La Escuela Universitaria de Las Ciencias de La Salud*, *3*(1), 47–57. https://doi.org/10.5377/rceucs.v3i1.7025

Morales, A., Molina, M., Brito, Y., Moreno, Y., & Mendez, O. (2018). Técnicas de necropsia y toma de muestras en animales de experimentación: Una revisión bibliográfica y actualización. *Revista Del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel,"* 52–63.

Olabuenaga, S. E. (2000). SISTEMA INMUNE EN PECES. *Gayana (Concepción)*, *64*(2), 205–215. https://doi.org/10.4067/S0717-65382000000200010

OpinionDual. (2023). *¿cuáles son las diferencias entre salmón coho y salar?* OpinionDual.

Orrego, R. (2018, February 24). *Análisis del desarrollo de la producción de smolt: escenario productivo, calidad y normativa*. Salmonexpert.

Penagos, G., Barato, P., & Iregui, C. (2009). SISTEMA INMUNE Y VACUNACIÓN DE PECES Immune System And Vaccination In Fish. In *Acta biol. Colomb* (Vol. 14, Issue 1).

Ramirez, E. (2019). *"BIOACUMULACIÓN DE METALES PESADOS DEL PEZ DIABLO (PTERYGOPLICHTHYS PARDALIS) EN EL RÍO GRIJALVA" – Instituto Tecnológico de*

Tuxtla Gutiérrez. https://www.tuxtla.tecnm.mx/bioacumulacion-de-metales-pesados-del-pez-diablo-pterygoplichthys-pardalis-en-el-rio-grijalva/

Rességuier, J., Dalum, A. S., Du Pasquier, L., Zhang, Y., Koppang, E. O., Boudinot, P., & Wiegertjes, G. F. (2020). Lymphoid tissue in teleost gills: Variations on a theme. *Biology*, *9*(6), 1–14. https://doi.org/10.3390/biology9060127

Rozas Serri, M. (2024). *Respuesta inmune adaptativa humoral*.

Salcedo, S. (2020). Osmorregulación en peces teleósteos. *Universidad de Cadiz Facultad de Ciencias Del Mar y Ambientales Grado En Ciencias Del Mar*.

Salinas, I. (2015). The mucosal immune system of teleost fish. In *Biology* (Vol. 4, Issue 3, pp. 525–539). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/biology4030525

Sanderson, J. (2020). Fundamentals of Microscopy. *Current Protocols in Mouse Biology*, *10*(2), e76. https://doi.org/10.1002/CPMO.76

SUBPESCA. (2020a). *Subsecretaria de pesca y agricultura - Salmon del Atlantico*. SUBPESCA.

SUBPESCA. (2020b). *Subsecretaria de pesca y agricultura - Trucha Arcoiris*. SUBPESCA.

Tavares, J., Martins, A., Fidalgo, L. G., Lima, V., Amaral, R. A., Pinto, C. A., Silva, A. M., & Saraiva, J. A. (2021). Fresh Fish Degradation and Advances in Preservation Using Physical Emerging Technologies. *Foods 2021, Vol. 10, Page 780*, *10*(4), 780. https://doi.org/10.3390/FOODS10040780

Torres R., G. A., González P., S., & Peña S., E. (2010). Descripción Anatómica, Histológica y Ultraestructural de la Branquia e Hígado de Tilapia (Oreochromis niloticus). *International Journal of Morphology*, *28*(3), 703–712. https://doi.org/10.4067/S0717-95022010000300008

Vega, M., Lopez-Santiago, R., & Moreno, M. (2010). Respuesta inmune en peces. In J. Gutierrez (Ed.), *Inmunologia Veterinaria* (pp. 309–314).

Vidal Márquez, A. (2021). Composición, mecanismos e importancia del microbioma mucoso en organismos marinos. *The Biologist, ISSN-e 1994-9073, ISSN 1816-0719, Vol. 19, Nº. 2, 2021 (Ejemplar Dedicado a: The Biologist (Lima)), Págs. 283-298*, *19*(2), 283–298. https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9398075&info=resumen&idioma=ENG

Xu, H., Wang, Z., Li, Y., & Xu, Z. (2024). The distribution and function of teleost IgT. *Fish & Shellfish Immunology*, *144*, 109281. https://doi.org/10.1016/J.FSI.2023.109281

9 ANEXOS

Anexo 1. “Manual de procedimientos de laboratorio de histopatología veterinaria”.

UNIVERSIDAD SAN SEBASTIAN

Facultad de Medicina Veterinaria
Carrera Medicina Veterinaria
Sede de la Patagonia

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE HISTOPATOLOGÍA VETERINARIA

TM. Jazmín Muena Meneses – Dr. Frank Vera Otárola

Puerto Montt, 2021

2. Procedimientos Técnicos

2.1 Fijación Tisular:

La fijación de tejidos o células consiste en la detención de los procesos de putrefacción y autólisis que inician inmediatamente después de la muerte, estos pueden producir cambios morfológicos y estructurales indeseados para el correcto análisis y diagnóstico. Por tanto, el tiempo que transcurre desde la toma de muestra hasta el contacto con el fijador debe ser el mínimo posible.

Existen métodos de fijación físicos y químicos, siendo los más efectivos los de tipo químicos, entonces hablaremos principalmente de líquidos fijadores. Si bien existen diversos tipos de líquidos fijadores, en el Laboratorio de Histopatología veterinaria de la USS utilizamos el fijador de rutina, es decir, Formalina al 10% neutralizada.

El Formaldehído comercialmente obtenido al 37 o 40%, es un fijador que forma enlaces con las proteínas de los tejidos y su efecto es conseguido de forma segura cuando es diluido con agua al 10%. Por tanto, de la solución comercial se diluye 1 parte del fijador en 9 partes de agua y es neutralizado a saturación con carbonato de calcio, esta mezcla es conocida como formol o formalina al 10% neutralizada. La preparación debe ser con elementos de protección y bajo campana de extracción de gases.

Para lograr una correcta fijación de la muestra se debe tener en cuenta que la proporción muestra fijador debe ser 1:10 y el tiempo que demora en fijar depende del tamaño de la misma muestra, por tanto, para muestras mas pequeñas (menos a 5 mm) deben permanecer embebidas en formalina por al menos 24 horas a temperatura ambiente.

Otro fijador en el laboratorio es el metanol, este es utilizado para fijar los extendidos citológicos. Y su manipulación es mínima, su forma comercial esta lista para usar, los portaobjetos se sumergen por unos segundos en el liquido y se dejan secar al aire.

2.2 Microscopia y Dictado:

Corresponde al inicio del procesamiento histopatológico, se realiza a muestras provenientes de biopsias o necropsias que han cumplido con el tiempo óptimo de fijación. Este item es importante para guiar al análisis y posterior diagnóstico del caso.

Es llevado a cabo por el MV Patólogo en conjunto con la TM, en este paso el médico observa macroscópicamente y hace una descripción de la muestra en cuanto a forma, color, consistencia y otros, además se realiza medición del tamaño y registro fotográfico. La TM toma dictado y anota los antecedentes en la hoja de solicitud del caso.

Por último, el MV Patólogo procede a seccionar la/las muestras y selecciona uno o más fragmentos de aproximadamente 2 mm de espesor que será representativo de la lesión, se encapsulan en histocassette de plástico identificados con el número de caso correspondiente para continuar con el procesamiento.

2.3 Inclusión de la muestra:

Este paso del procesamiento histológico tiene por objetivo reemplazar toda el agua del interior del tejido por un medio mas consistente, en este caso se forman tacos de parafina que contienen en su interior la muestra de tejido. Esto permitirá obtener cortes de tejido finos (3 a 5 µm) y seriados para ser observados bajo el microscopio óptico.

La inclusión requiere de una serie de sub-pasos para lograr su propósito final:

a) Deshidratación: se realiza con una batería de alcoholes etílicos ascendente (70°, 95° y 100°), las muestras se sumergen en cada estación.
b) Aclaramiento: se utiliza xilol, un líquido intermediario que es miscible tanto con el alcohol absoluto como con la parafina, las muestras son sumergidas en este líquido que además proporciona al tejido un poco de transparencia.
c) Impregnación o infiltración: con parafina en estado líquido, a altas temperaturas (58 a 65 °C), las muestras son sumergidas para que la parafina ingrese en su interior.
d) Formación del taco o molde: posterior a la completa infiltración y con la ayuda de moldes de metal, la muestra se introduce en parafina que será sólida a temperatura ambiente.

2.4 Microtomía:

Consiste en obtener cortes finos y seriados, idealmente de no mas 5 µm de espesor y obteniendo una cinta de parafina con tejido. Para lograr este paso se utiliza el micrótomo, un instrumento mecánico y de precisión que permite obtener este tipo de cortes. En el Laboratorio contamos con un microtomo de rotación, lo que significa que la muestra es móvil y la navaja de corte fija.

Una vez obtenidos los cortes, las cintas deben ser estiradas sobre agua tibia (40 °C aprox.) que se mantiene en un recipiente eléctrico llamado baño de flotación. La temperatura del agua permite calentar la parafina junto con el tejido y así estirar los cortes, permitiendo como parte final de esta etapa adherir los cortes sobre portaobjetos que se dejan secar en estufa a 70 °C por mínimo una hora.

2.5 Desparafinación:

Es el proceso mediante el cual se retira toda la parafina del tejido, infiltrada y que encapsula. La parafina no permite el ingreso de los colorantes hacia el tejido, entonces se utiliza xilol que en este caso disuelve el medio consistente dejando solo el tejido adherido al vidrio.

Este proceso termina una vez que la muestra de tejido es nuevamente hidratada, para esto se sumergen los portaobjetos en una batería de alcoholes descendente (100°, 95° y 70°) que finaliza con agua destilada.

2.6 Tinción o Coloración:

El tejido debe ser teñido o coloreado para observar contraste entre los diferentes componentes estructurales, se aplica la tinción de rutina hematoxilina y eosina (HE), la cual proporciona diferenciación entre núcleo y citoplasma principalmente. Se aplican ambos colorantes de forma sucesiva.

La hematoxilina es considerada un colorante nuclear, tiñe principalmente los componentes ácidos del tejido como los ácidos nucleicos que se encuentran en el núcleo de la célula. Cuando un componente es teñido por este colorante se dice que es basofílico, es decir, que tiene afinidad por la hematoxilina que es un colorante que se comporta de forma básica.

La eosina es considerada como el colorante citoplasmático, tiñe principalmente componentes básicos del tejido y la mayoría de los componentes del citoplasma son de este tipo, además de diversos elementos extracelulares. Cuando un componente es

teñido por este colorante se dice que es eosinofílico o acidofílico, ya que, tiene afinidad por la eosina que es un colorante ácido.

2.7 Deshidratación y Montaje:

Con el propósito de conservar las muestras teñidas de forma permanente, luego de la coloración se realiza nuevamente una deshidratación, con una batería de alcoholes ascendente (70°, 95° y 100°) se elimina el agua en el interior del tejido que esta vez es de un espesor mucho menor (micrones).

Posteriormente se aclara en xilol, esta vez el líquido intermediario tiene la principal función de transparentar un poco el tejido. Lo que faculta una observación al microscopio óptico de mejor calidad, permite un mejor paso de la luz a través de la muestra.

Para finalizar el procesamiento histológico es necesario cubrir la muestra con un cubreobjetos, vidrio de menor espesor que es adherido a la muestra en el portaobjetos con la ayuda de una resina sintética, la cual, al secarse permite que la muestra quede completamente aislada y el preparado permanece en el tiempo.