

# USO DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA EN LOS EVENTOS MÓRBIDOS DE PECES

## IMMUNOHISTOCHEMISTRY USE IN FISH MORBID EVENTS

Wilson Gómez Manrique

Profesor de Patología Veterinaria de la Universidad Camilo Castelo Branco.  
wilsongomezmanrique@yahoo.es

Universidad Camilo Castelo Branco. Campus de Descalvado –Sao Pablo, Brasil.

---

### RESUMEN

En la piscicultura, el aumento de la densidad poblacional para obtener mayor producción actúa como elemento estresante y compromete la calidad del agua. Esos factores aumentan la susceptibilidad de los peces a enfermedades infecciosas y parasitarias y facilita la proliferación de agentes con potencial patogénico en el ambiente de producción. Uno de los procesos fisiopatológicos de gran importancia para mantener la salud del hospedero es la respuesta inflamatoria, cuyos mecanismos son bien conocidos en mamíferos, pero poco claro en otras clases del reino animal. En los peces, este fenómeno también no es bien conocido y merece atención del punto de vista de la fisiopatología comparada, así como por el potencial socioeconómico que representan. Siendo así, el uso de diferentes técnicas de diagnóstico son necesarias para identificar el agente infeccioso y la respuesta del hospedero. La respuesta inflamatoria envuelve varios eventos, como la participación de células teciduales fijas, leucocitos, trombocitos, mediadores farmacológicos celulares y plasmáticos, además de diversos moduladores de origen hormonal y no hormonal. Así, la inmunohistoquímica es una que está surgiendo como una de las diversas herramientas que pueden contribuir para el mejor entendimiento de la respuesta celular y humoral ante un proceso infeccioso.

**Palabras clave:** Anticuerpo, epítipo, histopatología, inmunología, marcador celular, pez

**Keywords:** Antibody, cell marker, epitope, fish, histopathology, immunology

## Introducción

- En 2014 la acuicultura pasó por la primera vez la pesca por captura;
- La producción de la pesca de captura está estable desde el final de los años 80's

FAO, 2016



## Introducción

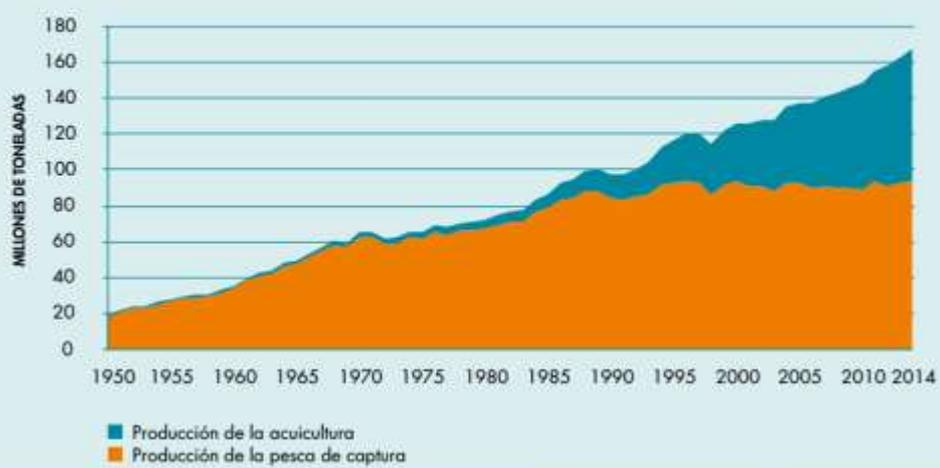
- La acuicultura suministraba para el consumo humano:
  - 7% en 1974
  - 26% en 1994
  - 39% en 2004 } **32% en 30 años**
- Aumento anual medio de 3,2% en el periodo 1961-2013, el doble de la tasa de crecimiento de la población mundial.

FAO, 2016

## Introducción

- En 2013, los peces fueron responsables por cerca del 17% de la ingestión de proteína animal y de 6,7% de la proteína total

## PRODUCCIÓN MUNDIAL DE LA PESCA DE CAPTURA Y LA ACUICULTURA



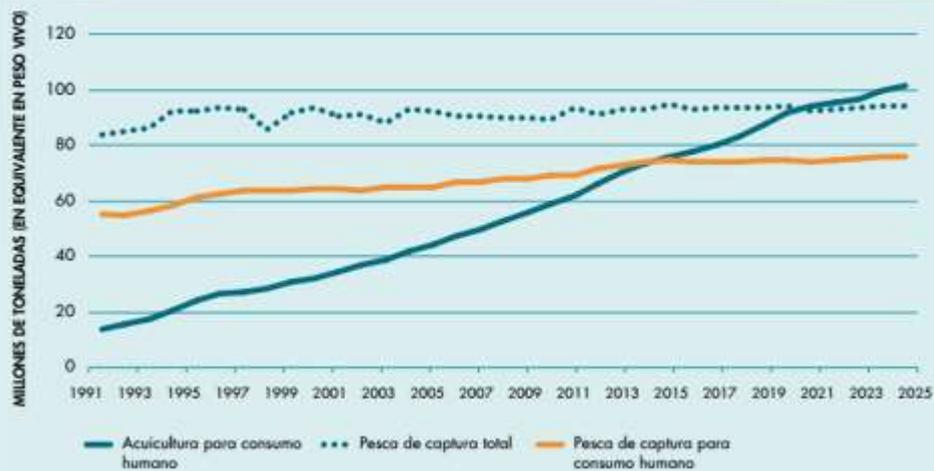
FAO, 2016

# Perspectivas



OCDE, FAO 2015

## PRODUCCIÓN MUNDIAL DE LA PESCA DE CAPTURA Y LA ACUICULTURA HASTA 2025



OCDE, FAO 2015

# Introducción



Producción y productividad;  
Presión ambiental y desafío animal;  
Aumento de desafíos al productor;

- ❖ Alimentación
- ❖ Agua
- ❖ Densidad
- ❖ Uso de fármacos

ESTRÉS

ENFERMEDADES

# CARACTERÍSTICAS BÁSICAS

IMUNOLOGIA

HISTOLOGIA

BIOQUÍMICA

IHQ



IDENTIFICAR ANTÍGENOS  
PROTEÍNAS Y POLISACÁRIDOS

## Antígeno

- Sustancia capaz de inducir una respuesta inmune

## Anticuerpo

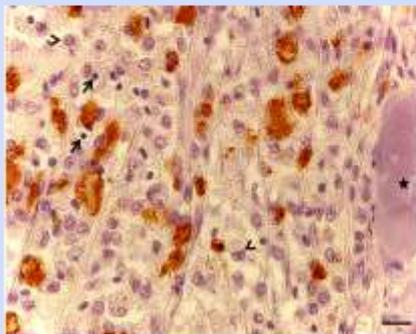
- Proteínas solubles utilizadas por el sistema inmune para identificar y neutralizar antígenos (Inmunoglobulinas)

## REACCIÓN ANTÍGENO ANTICUERPO

## PRINCÍPIO DE LA TÉCNICA

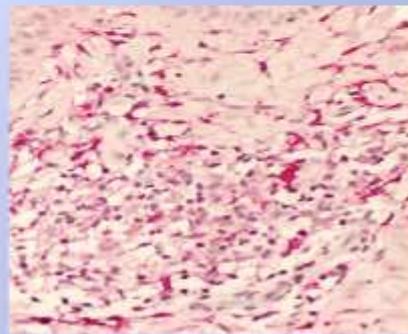
El anticuerpo es marcado con una sustancia fluorescente, elemento radioactivo, oro coloidal o enzima.

Las muestras son incubadas con sustratos enzimáticos, produciendo un producto que sufre precipitación directa.



DAB

Archivo personal



Fucsina

Carneiro et al. (2005)

## CARACTERÍSTICAS BÁSICAS

### ❖ Ventajas

- Costo bajo a moderado.
- Alta sensibilidad e especificidad.
- Permite el análisis de 1 o múltiples antígenos simultáneamente.
- Posibilidad de detección y localización de proteínas intracelulares (Triton).
- Identificar un antígeno particular en varios tejidos en una misma lámina.
- Aplicable en células vivas.
- Estandarización y realización simple.
- Pequeñas cantidades de tejido.

## CARACTERÍSTICAS BÁSICAS

### ❖ Desventajas

- Necesidad de mano de obra especializada.
- Procesamiento demorado de la muestra.
- Preparaciones no permanentes.
- Técnicas especiales para fijación e inclusión.
- Necesidad de microscopia especializada (fluorocromos).
- Variabilidad del resultado conforme la lectura realizada por el lector en la IHQ por fluorescencia.

## PRINCIPIO DE LA TÉCNICA

La técnica es realizada en láminas de microscopia e la observación es realizada en microscópio de luz común o fluorescente.

Anticuerpo de detección es biotinilado (conjugado con biotina, alta afinidad por estreptoavidina) en los ensayos enzimáticos.

Fluorocromo	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Color
DAPI	365	420	Azul
Fluoresceína (FITC)	495	525	Verde
R-ficoeritrina	480, 545, 565	578	Anaranjado, rojo
Rodamina (TRICT)	552	570	Rojo
Texas red	596	620	Rojo

## ENZIMAS Y SUS CROMÓGENOS

Enzima	Cromógeno	Color producto final
Peroxidasa horseradish	3-amino-9-etilcarbazol	Rojo
	4-cloro-1-naftol	Azul
	Reactivo Hanker-Yates	Azul oscuro
	Pironina alfa-naftol	Rojo púrpura
Fosfatasa alcalina	Naftol-AS-BI-Fosfato / Nova Fucsina (NABP/NF)	Rojo intenso
	Bromocloroindolil Fosfato / Tetrazolina Nitro Azul (BCIP/NBT)	Púrpura oscuro intenso
Beta-D-galactosidasa derivada de bacteria	5-bromo-4-cloro-3 indolil beta-D-galactopiranosideo (BCIG)	Azul intenso

## PASOS DE LA TÉCNICA



## PREPARO DE LA MUESTRA

### 1) Colecta de la muestra biológica

- Necropsia, biopsia, fluidos

### 2) Preservar por fijación o congelamento

- Formaldeído buferado 10%, paraformaldeído 4%, Bouin, glutaraldeído, Carnoy.

### 3) Desidratação

- Etanol

## PREPARO DE LA MUESTRA

### 4) Clareamiento (diafanización)

- Xileno

### 5) Incluir en parafina

- Temperatura no pasar de 60°C

### 6) Obtener cortes en micrótopo

- 3-5  $\mu\text{m}$
- Rehidratar en series crecientes de etanol

## MUESTRAS



Células (pellet)



Células en monocamada



Secciones tisulares con varios tipos celulares y componentes de la matriz extracelular

## RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA

- La formalina, puede enmascarar algunos epítomos antigénicos, causar ligación cruzada o destruirlos.

- Digestión enzimática proteolítica: tripsina, quimotripsina, pepsina, proteinasa K.

- Por calor: microondas, baño María, olla a presión, steamer.

- Forma combinada: digestión enzimática + calor.

## BLOQUEIO DE ENZIMA ENDÓGENA - PEROXIDASA

Normalmente ocurre actividad de peroxidasa en eritrocitos, granulocitos, hepatocitos, sistema nervioso central y tejidos sensibles al estrógeno.

La citocromo oxidasa y catalasa producen productos de reacción con DAB.

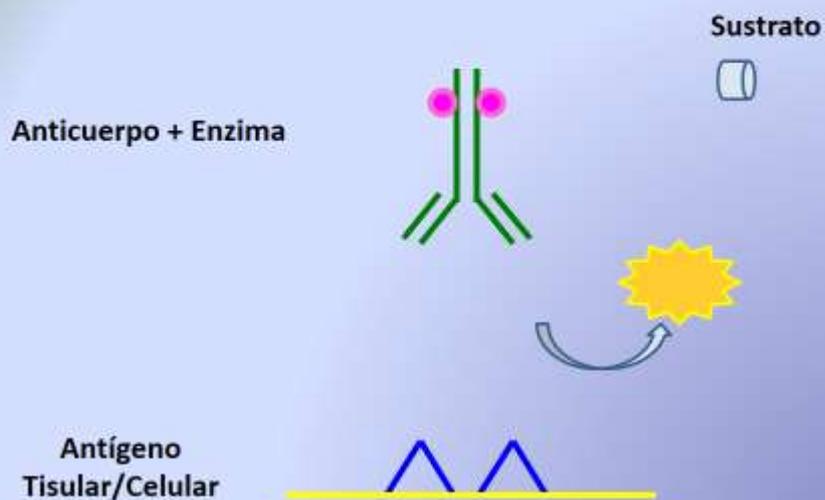
- Peróxido de hidrógeno (0,3-0,5%) en metanol.
- Trinitreto de sódio (0,1%) en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3%).

## BLOQUEO DE ENZIMA ENDÓGENA - BIOTINA

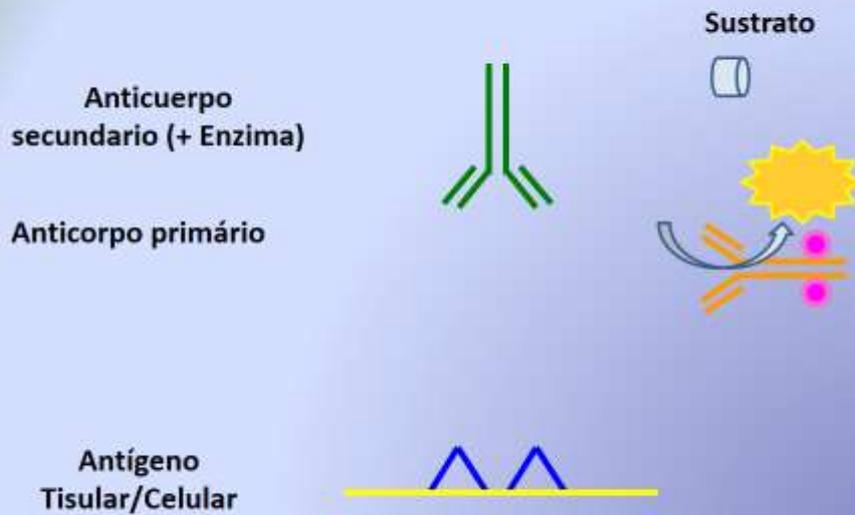
Vitamina y coenzima presente en diversos tejidos, particularmente hígado, pulmón, bazo, riñón, tejido adiposo, glándula mamaria y cerebro.

- Tampones alcalinos.
- Leche desnatada.
- Pré-incubación con avidina

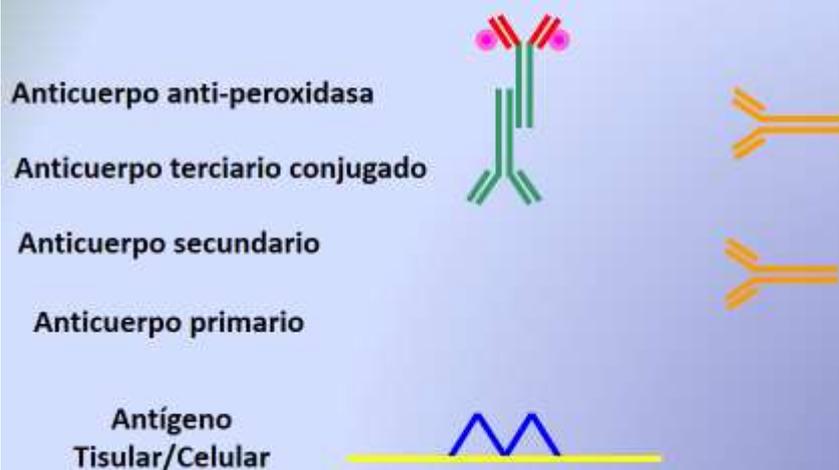
## MÉTODO DIRECTO



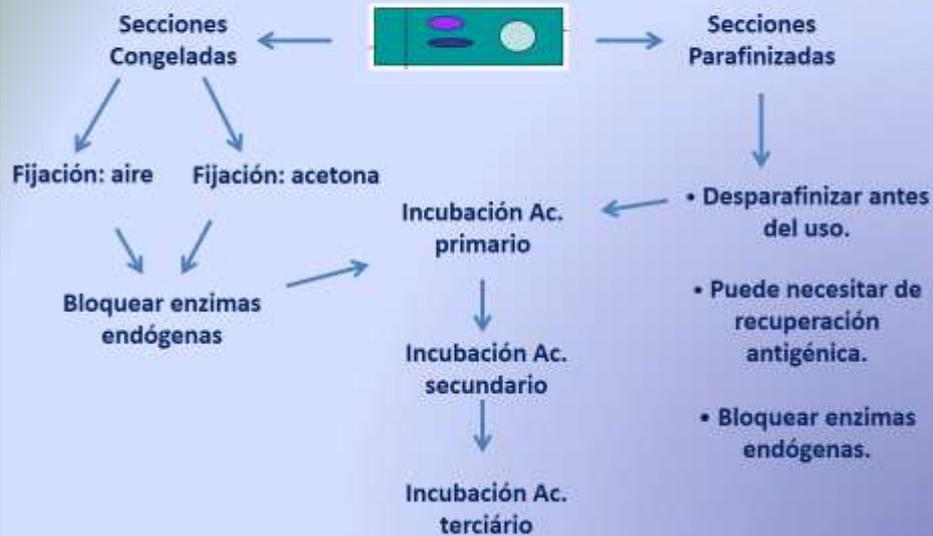
# MÉTODO INDIRECTO



# MÉTODO PAP (PEROXIDASA ANTI-PEROXIDASA)



## PASO A PASO



## PROBLEMAS EN IHQ

Inactivación inadecuada de enzimas endógenas.

Difusión del Ag investigado del local de síntesis para el tejido circundante.

Presencia de Ag en altas concentraciones en el plasma.

Daño físico del tejido por desecación o fijación inadecuada.

Autólise.

## PROBLEMAS EN IHQ

Pigmentos teciduales similares al producto final de la reacción.

Reacción cruzada inespecífica del Ac cuando el epítipo del Ag a ser teñido es compartido con otras proteínas.

Ingestión del Ag por fagócitos, resultando en coloración das células.

## APLICACIONES

- La IHQ puede ser aplicada:
  - En neoplasias
    - Diferenciar una proliferación celular maligna y benigna.
    - Diagnóstico histogenético de neoplasias morfológicamente indiferenciadas.
    - Subtipage de neoplasia para selección terapéutica.
    - Caracterización de productos de secreción de células neoplásicas.

## APLICACIONES

- Caracterizar el origen de carcinomas.
- Identificar micrometástasis.
- Evaluación pronóstica (ex: detección de receptores hormonales).
- Orientación terapéutica.

## APLICACIONES

- La IHQ puede ser utilizada:
  - Para detección de antígenos:
    - Virales
    - Bacterianos
    - De Hongos
    - De Protozoários:
    - De Helmintos

# COMERCIALIZACIÓN DE Ac

United States

GeneTex  
Quality Antibodies · Quality Results

Product search by keyword All categories My Account My Cart

Please login Product Support | Company News | Contact Us | SiteMap

Primary Antibodies Secondary Antibodies Proteins & Peptides Lysates & Slides Serum & Reagents Research Kits Isotype Controls

Home > Company > News

About Us  
News  
Rewards Program  
Recent Publications  
Contact Us  
Policy  
Guarantee  
Careers  
Shipping

The Leader in Zebrafish-Validated Antibodies

<http://www.genetex.com/>

SIGMA-ALDRICH  
A Part of Merck

PRODUCTS SERVICES INDUSTRIES

Home Sign In ACCOUNT SUPPORT ORDER

Home > Product Directory > Antibodies > Primary Antibodies > Zebrafish Antibodies

Life Science Home  
Life Science Products

ADME/Tox  
Antibodies  
BioAnalysis  
Cell Biology  
Cell Biology Products  
Learning Center  
Antibodies  
Antibody Products  
Prestige Antibodies  
Antibody Applications Center  
Immunofluorescence Tested Antibodies  
DuoLink® - Protein Interaction Technology

Zebrafish Antibodies

Zebrafish (*Danio rerio*), a minnow-like freshwater fish, has emerged as a popular animal model for research and development. Due to their striking genomic similarity to humans, regenerative abilities, and shortened life cycle, zebrafish have become an ideal tool for studying developmental processes, gene expression, and underlying mechanisms of cancer and other diseases.

Sigma Life Sciences offers over 300 zebrafish antibodies representing research areas such as Cancer, Neuroscience, and Stem Cell Development. All antibodies are highly validated and backed by our industry leading Bioguarantee Program.

<http://www.sigmaaldrich.com>

United States | Cat #886 77-ABCAM (22226) or contact us | Sign in or Register | My basket | Quick order

abcam | All | enter protein, target, biochemical, reagent... e.g. p53 | Search

Products | Custom | Support | Events | Pathways | Contact us | About us | Careers

## 551 product results

Refine by Clear All

Filtered by Reactivity Zebrafish

**Product types**

- Primary antibodies (24)
- Cellular and biochemical assays (1)

**Research areas**

- Signal transduction (22)
- Epigenetics and Nuclear Signaling (14)

**Anti-Histone H3 antibody - Nuclear Loading Control and ChIP Grade (ab1791)**

★★★★★ Abbreviations (180) | Specific References (857)

**Description:** Rabbit polyclonal to Histone H3 - Nuclear Loading Control and ChIP Grade

**Application:** ChIP, ChIP/ChIP, ChIPseq, Dot, EM, Flow Cyt, ICC, ICC/IF, MC - Wnt, MC-Fr, MC-P, IP, WB

**Reactivity:** Mouse, Rat, Chicken, Dog, Human, Saccharomyces cerevisiae, Xenopus laevis

<http://www.abcam.com/>

ANASPEC

Home | Account Login | My Cart | Ordering | About Us | Contact

Search by Cat #, CAS #, Sequence, or Keyword

Peptides | Amino Acids & Reagents | Oligos & Oligonucleotides | **Antibodies** | Assay Kits & Proteins | qPCR | Oligos

Antibodies > Primary Antibodies > Z-Fish™ (Zebrafish) > Alphabetical Listing of Zebrafish Antibodies

Product	Size	Catalog #	US\$	
Anti - Lck (DN), Z - FISH® Leukocyte tyrosine kinase	250 uL	AS-55810	\$155	<a href="#">Large Quantity Quote</a>
Anti - Actin - 18 (N), Z - FISH® Neoplastic chromatin condensation inducer 18	250 uL	AS-55522	\$303	<a href="#">Large Quantity Quote</a>
Anti - Actin - beta (CT), Z - FISH®	250 uL	AS-55335	\$303	<a href="#">Large Quantity Quote</a>
Anti - Actin - beta (NT), Z - FISH®	250 uL	AS-55338	\$303	<a href="#">Large Quantity Quote</a>
Anti - AIC2A (CT), Z - FISH®	250 uL	AS-55389	\$303	<a href="#">Large Quantity Quote</a>
Anti - Aldh - 1A2 (N), Z - FISH® Aldehyde dehydrogenase 1 family, member 42	250 uL	AS-55698	\$303	<a href="#">Large Quantity Quote</a>
Anti - Atp1 (N), Z - FISH® Alkaline phosphatase, intestinal	250 uL	AS-55699	\$303	<a href="#">Large Quantity Quote</a>
Anti - Atp1 (NT), Z - FISH® Alkaline phosphatase, intestinal	250 uL	AS-55700	\$303	<a href="#">Large Quantity Quote</a>
Anti - Angptl - 4 (N), Z - FISH® Angiopoietin - like 4	250 uL	AS-55701	\$165	<a href="#">Large Quantity Quote</a>
Anti - Arx (N), Z - FISH® Arx/axis related homeobox	250 uL	AS-55702	\$165	<a href="#">Large Quantity Quote</a>
Anti - Arx - 1a (CT), Z - FISH®	250 uL	AS-55703	\$165	<a href="#">Large Quantity Quote</a>

<https://www.anaspec.com>

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY    SANTA CRUZ ANIMAL HEALTH    CALL TOLL FREE 1-800-457-3891    LIVE CHAT CONTACT US    SIGN IN / SIGN UP ACCOUNT    QUICK ORDER    CART ITEMS

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY    **Antibody Exchange Program**    GET A FREE SAMPLE    US Dollars

The Power to Question    All    FOLLOW US    Like    Share    Over 10,000 others like this

ANTIBODIES    SUPPORT PRODUCTS    GENE EDITING    CHEMICALS    LAB SUPPLIES

Home / Antibodies / Primary / Non-Mammalian / Zebrafish Protein

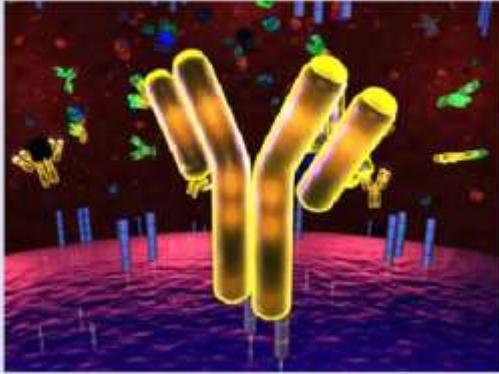
## Zebrafish Protein Antibodies

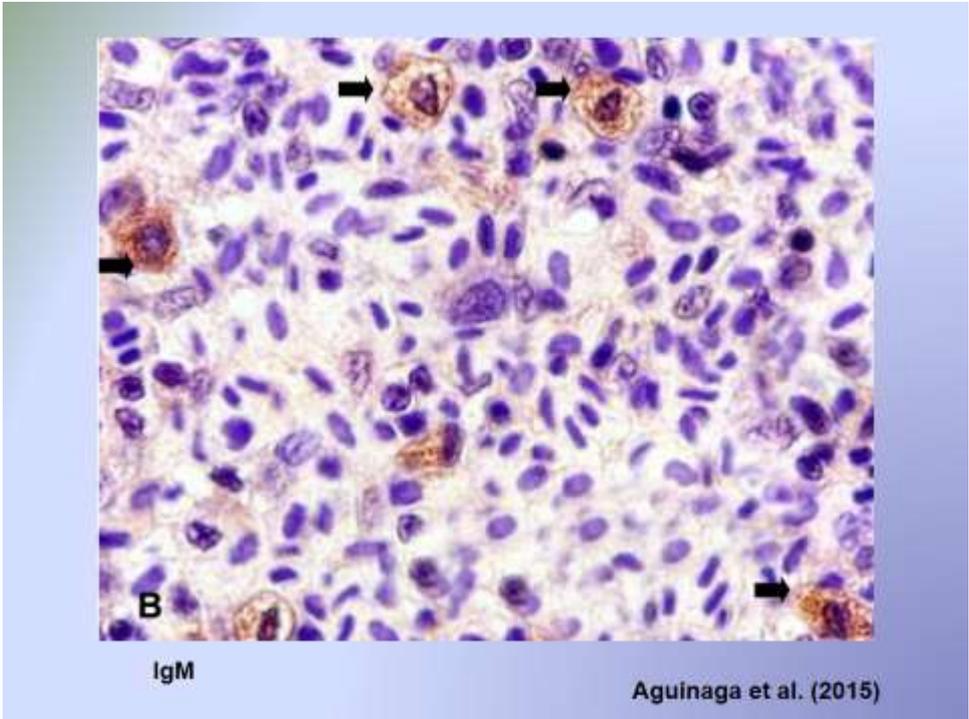
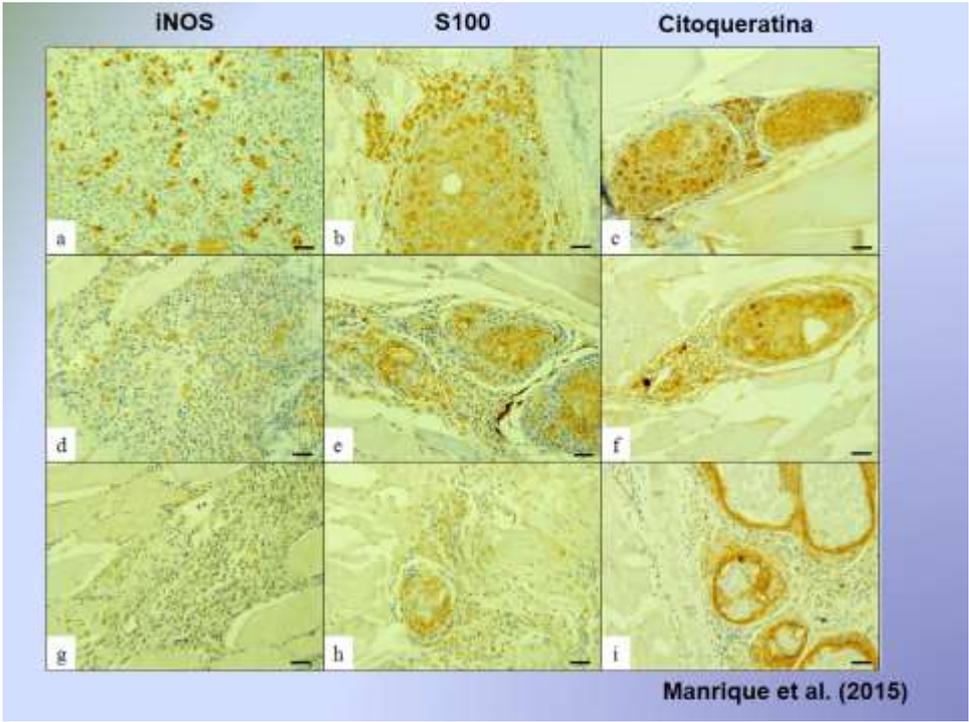
Santa Cruz Biotechnology, Inc. offers a broad range of Zebrafish Protein antibodies. Select Zebrafish Protein antibodies from several monoclonal and/or polyclonal antibodies listed below. View detailed Zebrafish Protein antibody specifications by linking to the specific product blocks. Select appropriate Zebrafish Protein antibodies for your research by isotype, epitope, applications and species reactivity.

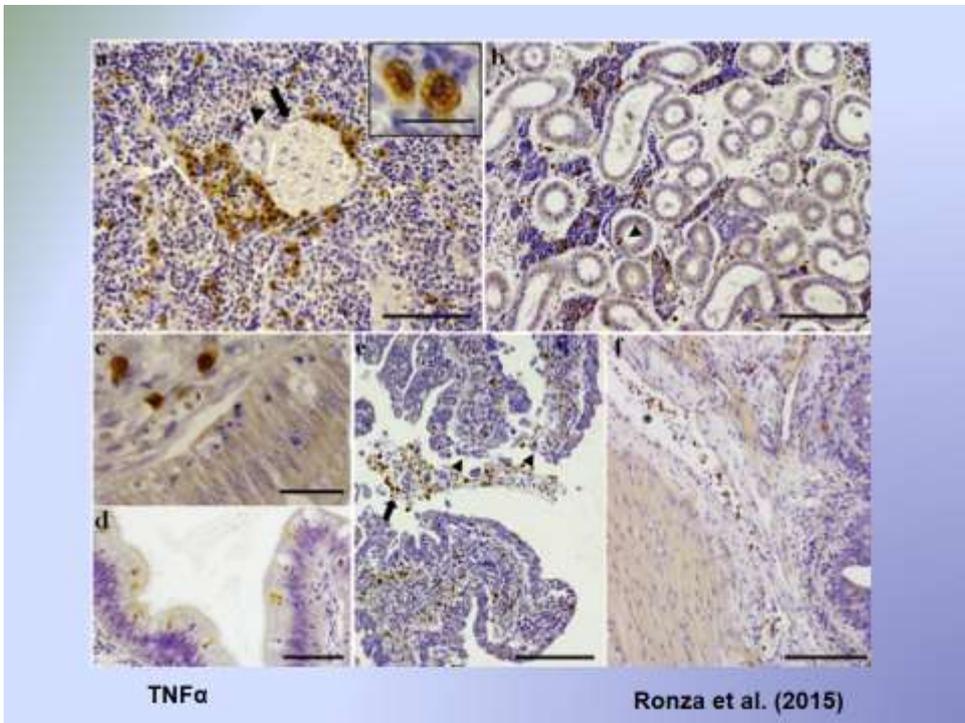
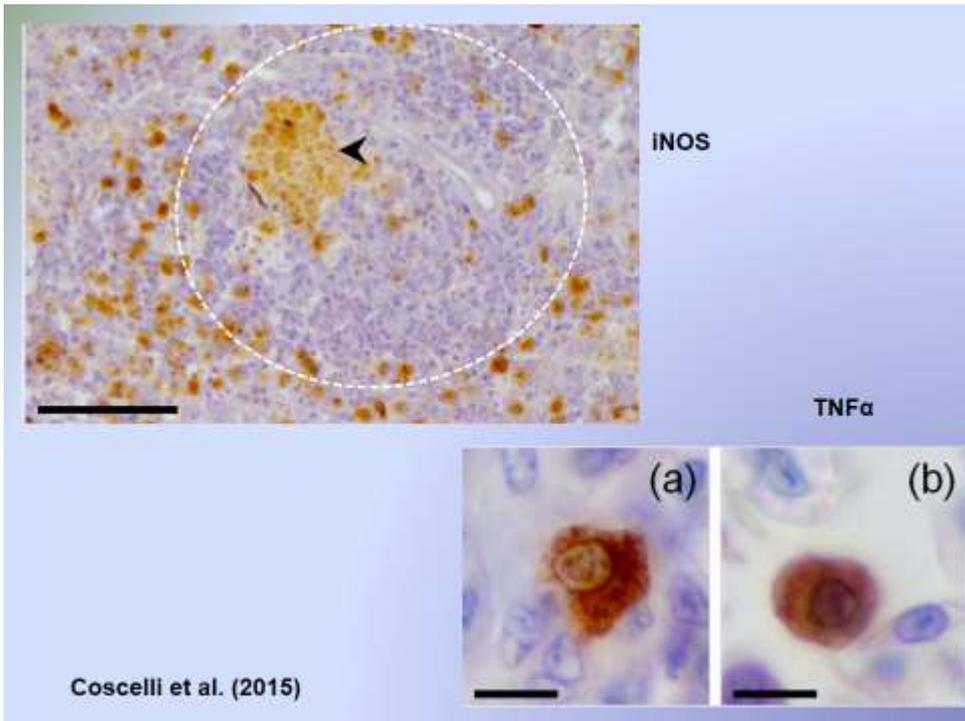
### Zebrafish Protein Antibodies

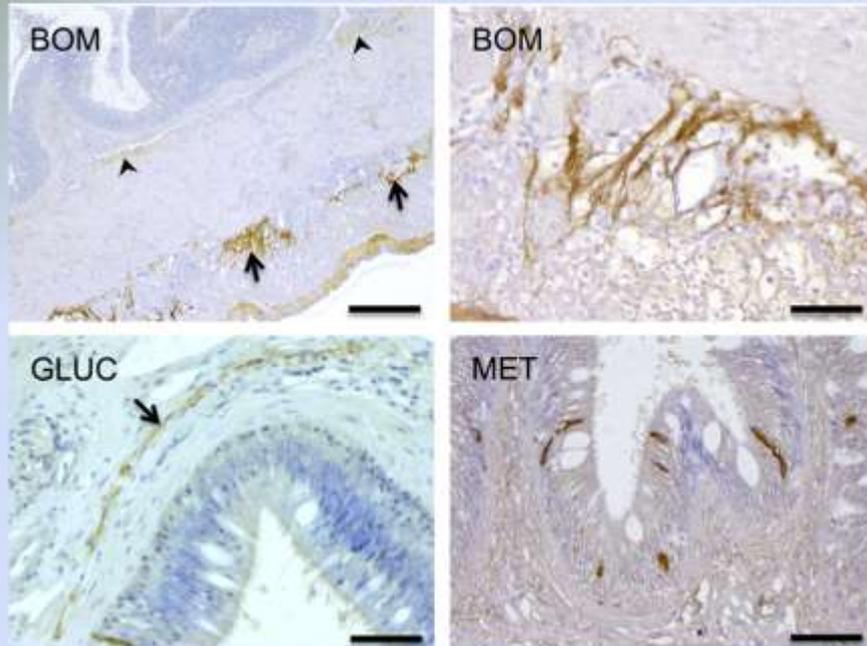
<https://www.scbt.com/scbt/home>

# APLICACIONES EN PECES



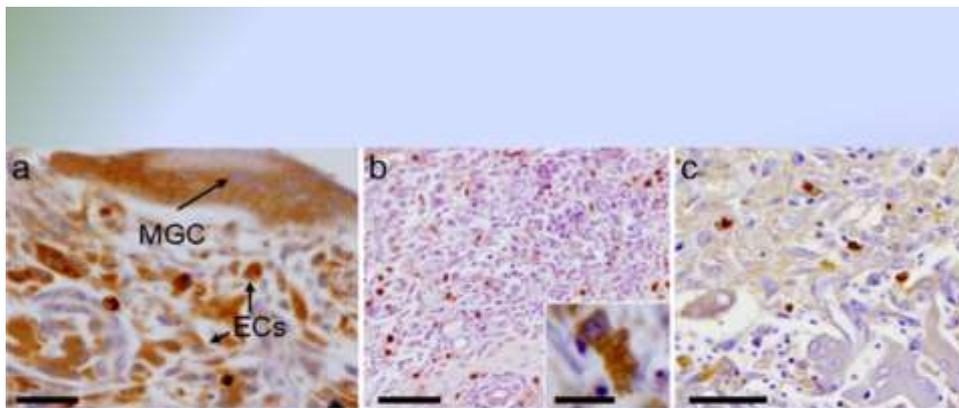






Losada et al. (2014)

bombesin, glucagon, met-enkefalin

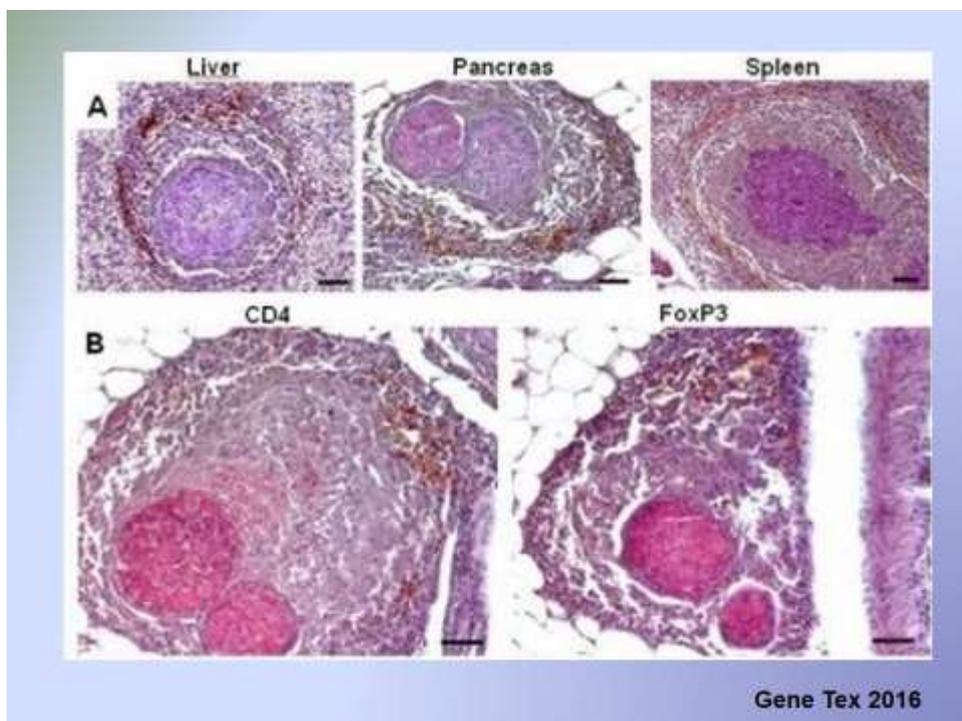
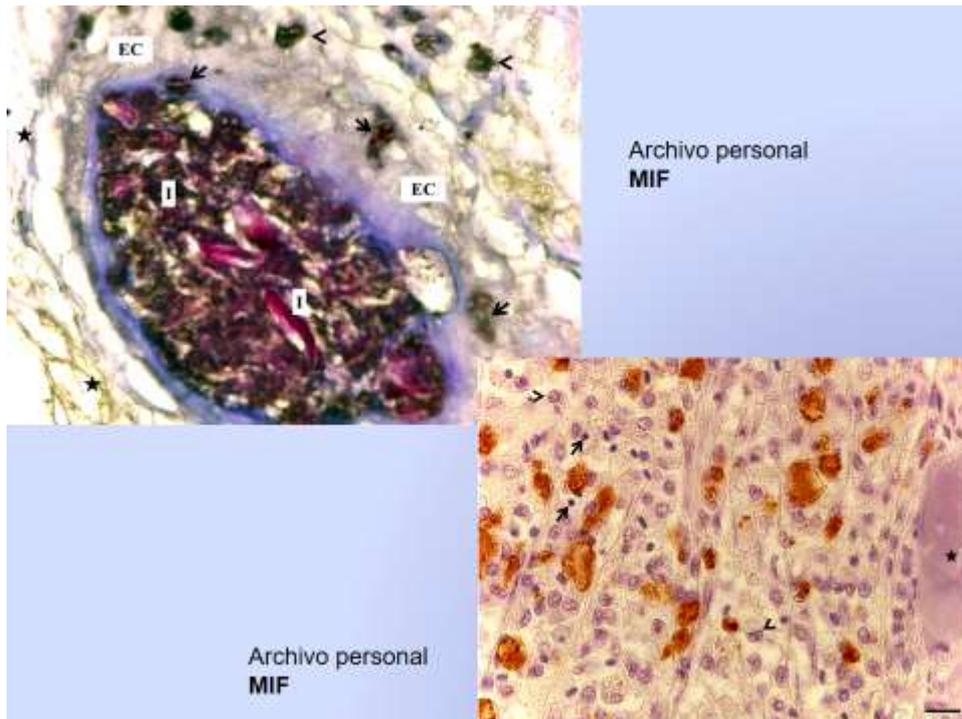


Citoqueratina

iNOS

IgM

Coselli et al. (2014)



## CONCLUSIÓN

El uso de anticuerpos direccionados para peces son cada vez más usados para la comprensión de los diferentes eventos fisiopatológicos que ocurren en peces, principalmente en enfermedades.

Los anticuerpos que no son elaborados con la finalidad de ser usados en tejido de pez, puede eventualmente marcar las células de interés, siempre y cuando el protocolo esté bien establecido.

## BIBLIOGRAFIA

Aguinaga JY, Claudiano GS, Marcusso PF, Marrique WG, Engracia de Moraes J, de Moraes FR, Fernandes JBK. *Uncaria tomentosa* increases growth and immune activity in *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus agalactiae*. *Fish and Shellfish Immunology* (2015). doi: 10.1016/j.fsi.2015.09.051.

Coscelli GA, Bermúdez R, Silva ARS, Océnda MVR, Quiroga MI. Granulomatous dermatitis in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) associated with natural *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* infection. *Aquaculture* 428-429 (2014) 111-116.

Cameiro SCS, Medeiros R, Magalhães GM, Alves C, Cuzzi T, Sott MN. Effects of pentoxifylline on dermal dendrocytes FXIIIa using psoriasis plaques as a model. *An Bras Dermatol*. 2005;80(Supl3):5314-22.

Coscelli G, Bermúdez R, Ronza P, Losada AP, Quiroga MI. Immunohistochemical study of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor alpha response in turbot (*Scophthalmus maximus*) experimentally infected with *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunology* (2016). doi: 10.1016/j.fsi.2016.07.022.

FAO. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. 2016. Acceso: <http://www.fao.org/3/a-i5796s.pdf>

Gene Tex. <http://www.genetex.com/c04-antibody-GTX16589.html#>

Losada AP, Bermúdez R, Falke LD, Di Giancamillo A, Domeneghini C, Quiroga MI. Effects of *Enteromyxum scophthalmi* experimental infection on the neuroendocrine system of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Fish & Shellfish Immunology* 40 (2014) 577e583.

Marrique WG, da Silva Claudiano G, de Castro MF, Petriño TR, Figueiredo MAP, de Andrade Belo MA, et al. (2015) Expression of Cellular Components in Granulomatous Inflammatory Response in *Platydictyus mesopotamicus* Model. *PLoS ONE* 10(3): e0121625. doi:10.1371/journal.pone.0121625

OCDE-FAO PERSPECTIVAS AGRÍCOLAS 2014 © OCDE/FAO 2015. Acceso: <http://www.fao.org/3/a-i4738x.pdf>

Ronza P, Bermúdez R, Losada AP, Sija-Bobadilla A, Pardo B G, Quiroga MI. Immunohistochemical detection and gene expression of TNF-alpha in turbot (*Scophthalmus maximus*) enteromyxosis. *Fish Shellfish Immunol*. 2015, 47, 368-376.

