

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

**Título del trabajo:**

Estandarización de técnicas de inmunohistoquímica para evaluar neuroplasticidad entérica en porcinos.

**Nombre del estudiante:**

María Paulina Agudelo Villa

**Director:**

Berardo de Jesús Rodríguez PhD

**Codirectora:**

Juliana Zapata Cardona PhD

**Asesores:**

Lynda Jhailú Tamayo PhD

Santiago Duque MSc

**Programa de posgrado:**

Maestría en Ciencias Veterinarias

Línea patobiología, biomusicología y salud

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Agrarias

Escuela de Medicina Veterinaria

2024

---

**Cita**

(Agudelo Villa, 2024)

---

**Referencia**

Agudelo Villa, María Paulina (2024). Estandarización de técnicas de inmunohistoquímica para evaluar neuroplasticidad entérica en porcinos. Universidad de Antioquia, Medellín.

---



27

28

29 Maestría en ciencias veterinarias, UdeA.

30 Grupo de investigación en patobiología QUIRÓN

31

32



33

34 **Repositorio Institucional:** <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

35 Universidad de Antioquia - [www.udea.edu.co](http://www.udea.edu.co)

36

37

38 El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento  
39 institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la  
40 responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

41

42

43

44

45

46 **Agradecimientos**

47           En primer lugar, quiero agradecer a mi familia por su amor incondicional,  
48           apoyo constante y paciencia infinita. Su confianza en mí me ha  
49           impulsado a seguir adelante incluso en los momentos más desafiantes.  
50           Sin ustedes, este logro no sería posible.

51           A mi pareja, por estar a mi lado durante todas las etapas de este recorrido.  
52           Su apoyo emocional y comprensión han sido fundamentales para  
53           mantener el equilibrio y la motivación. Su compañía y sus palabras me  
54           llenar de fortaleza y seguridad en cada paso que doy.

55           A mis maestros y asesores, su orientación experta, sabiduría y dedicación  
56           han sido cruciales para el desarrollo de este trabajo. Sus enseñanzas han  
57           enriquecido mi conocimiento y mi perspectiva, y estoy agradecida por la  
58           oportunidad de aprender de ustedes.

59           A mis compañeros de estudio y amigos, su apoyo mutuo y camaradería  
60           han sido una fuente constante de inspiración y fortaleza en los momentos  
61           más difíciles. Juntos, hemos compartido risas, desafíos y éxitos, y sin su  
62           constante apoyo y motivación nada de esto hubiera sido posible.

63           Al grupo de investigación en patobiología Quirón y al semillero de  
64           investigación Quirón, la participación activa de sus miembros en pro de  
65           este proyecto fue una pieza clave en el éxito del mismo. De igual manera,  
66           quiero extender mi agradecimiento al grupo de Neurociencias de  
67           Antioquia, quienes estuvieron siempre dispuestos a enseñarme y a  
68           apoyarme con su entrega y amor por la ciencia.

69           Finalmente, quiero agradecer a la universidad por regalarme la fortuna de  
70           continuar mi proceso educativo y apoyarme a cumplir mis sueños.

71           Con gratitud y cariño, María Paulina Agudelo Villa

72 **Dedicatoria**

73

74 Este trabajo de grado está dedicado a la ciencia, fuente que ha inspirado e  
75 incentivado mi curiosidad de querer entender los fenómenos, no tan simples de la  
76 vida. En ese sentido, también está dedicada a todos los seres vivos, desde las  
77 criaturas más pequeñas que habitan en los rincones más inhóspitos, hasta las  
78 majestuosas criaturas que habitan y comparten con nosotros, las tierras y mares.  
79 Esta maestría fue un recordatorio para, a través de la ciencia, ayudar a proteger y  
80 garantizar su bienestar y salud, buscando así un futuro más prometedor y equitativo  
81 para todos.

82 A las mujeres que han dejado una huella imborrable en la historia de la ciencia,  
83 dedico este trabajo en reconocimiento a su valentía y perseverancia. Sus  
84 contribuciones han iluminado el camino para las generaciones futuras y han  
85 sembrado una semilla prolífica en todas las mujeres que soñamos con ser parte de  
86 la historia del universo.

87 Deseo extender mi profundo agradecimiento a todos los animales que han  
88 participado de alguna manera, en nuestro esfuerzo por avanzar en el conocimiento  
89 científico. Valoramos su importancia en la búsqueda de soluciones que beneficien  
90 a las especies. Siempre nos esforzamos por encontrar alternativas y métodos que  
91 reduzcan al mínimo necesario el uso de animales en la investigación, respetando  
92 su bienestar y dignidad. Nuestro compromiso es continuar trabajando  
93 incansablemente para buscar nuevas vías que permitan alcanzar nuestros objetivos  
94 científicos sin causarles daño innecesario, en aras de un futuro donde su  
95 participación sea cada vez menos necesaria.

96 Con gratitud y admiración, María Paulina Agudelo

97

98



99	<b>Tabla de contenido</b>	
100	<b>Agradecimientos.....</b>	<b>3</b>
101	<b>Dedicatoria .....</b>	<b>4</b>
102	<b>Lista de tablas .....</b>	<b>7</b>
103	<b>Lista de figuras.....</b>	<b>8</b>
104	<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>9</b>
105	<b>Resumen general .....</b>	<b>10</b>
106	<b>Summary.....</b>	<b>12</b>
107	<b>Introducción general .....</b>	<b>14</b>
108	<b>Objetivos .....</b>	<b>18</b>
109	<b><i>Objetivo general.....</i></b>	<b>18</b>
110	<b><i>Objetivos específicos.....</i></b>	<b>18</b>
111	<b>Capítulo 1: Consideraciones generales: Entendiendo el sistema nervioso</b>	
112	<b>entérico como un actor importante de la salud intestinal. Estrategias de</b>	
113	<b>evaluación en la especie porcina. ....</b>	<b>19</b>
114	<b><i>Introducción.....</i></b>	<b>19</b>
115	<b><i>Marco conceptual.....</i></b>	<b>21</b>
116	<b><i>Migración y desarrollo.....</i></b>	<b>21</b>
117	<b><i>El SNE en la vida postnatal. Introducción a la neuroplasticidad adulta. ....</i></b>	<b>25</b>
118	<b><i>Métodos disponibles para la evaluación del sistema nervioso entérico en</i></b>	
119	<b><i>preparados de tejidos de cerdos.....</i></b>	<b>30</b>
120	<b>Bibliografía.....</b>	<b>32</b>
121	<b>Capítulo 2. Etapa preanalítica y analítica. Eutanasia, necropsia, toma y</b>	
122	<b>procesamiento de muestras orientadas al sistema digestivo.....</b>	<b>44</b>
123	<b><i>Introducción.....</i></b>	<b>44</b>
124	<b>Marco conceptual .....</b>	<b>46</b>
125	<b><i>Eutanasia en porcinos.....</i></b>	<b>46</b>
126	<b><i>Toma y manipulación de muestras del sistema digestivo .....</i></b>	<b>50</b>
127	<b><i>Métodos y protocolos de fijación de tejidos para inmunofluorescencia.....</i></b>	<b>53</b>



128	<i>Procesamiento inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.....</i>	<b>55</b>
129	<i>Preparado de membrana.....</i>	<b>58</b>
130	<b>Bibliografía.....</b>	<b>59</b>
131	<b>Capítulo 3. Metodología para el desarrollo de los objetivos específicos.</b>	
132	<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>69</b>
133	<i>Diseño metodológico.....</i>	<b>69</b>
134	<i>Comité de ética.....</i>	<b>71</b>
135	<i>Eutanasia y necropsia.....</i>	<b>71</b>
136	<i>Toma de muestras.....</i>	<b>73</b>
137	<i>Fijación y congelación de muestras.....</i>	<b>75</b>
138	<i>Procesamiento con técnicas de inmunohistoquímica.....</i>	<b>77</b>
139	<i>Preparado de membrana.....</i>	<b>80</b>
140	<b>Resultados.....</b>	<b>81</b>
141	<i>Estandarización de la técnica de fijación por inmersión.....</i>	<b>81</b>
142	<i>Estandarización de técnicas de inmunohistoquímica.....</i>	<b>82</b>
143	<i>Preparado de membrana.....</i>	<b>85</b>
144	<b>Productos adicionales.....</b>	<b>86</b>
145	<b>Discusión.....</b>	<b>87</b>
146	<i>Fijación por inmersión.....</i>	<b>87</b>
147	<i>Estandarización de técnicas de inmunohistoquímica.....</i>	<b>89</b>
148	<i>Preparado de membrana en tejidos de la especie porcina.....</i>	<b>93</b>
149	<b>Bibliografía.....</b>	<b>95</b>
150	<b>Conclusiones generales.....</b>	<b>101</b>
151	<b>Anexos.....</b>	<b>102</b>
152		
153		

154

155 **Lista de tablas**

156

157 Tabla 1 - Agentes y métodos de eutanasia aceptados en las diferentes especies  
158 animales traducido y adaptado de Leary et al. (2020).....47

159 Tabla 2 – Agentes y métodos no aceptados para la eutanasia en animales. Traducido y  
160 adaptado de Leary et al. (2020) .....48

161 *Tabla 3* - Tabla comparativa del método de fijación por perfusión e inmersión .....88

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178



179 **Lista de figuras**

180 Figura 1 - *Diferenciación de células de la cresta neural a neuronas y células gliales...*22

181 Figura 2 - Distribución de componentes histológicos en el intestino delgado.....23

182 Figura 3 - Poblaciones mientéricas en un ratón adulto sufriendo muerte celular  
183 programada y fagocitosis activa por macrófagos musculares.....28

184 Figura 4 - *Diseño metodológico para el muestreo..* .....70

185 *Figura 5 - Toma y manipulación de muestras obtenidas del sistema digestivo..* .....74

186 Figura 6 - Cambios de PFA cada 24 horas hasta completar 96 horas. ....75

187 Figura 7 - Gradiente de sacarosa al 7%, 25% y 30%, incrementando su porcentaje cada  
188 24 horas.....76

189 Figura 8 - *Diseño de la placa Multiwell para el procesamiento de IHQ e IF.....*78

190 Figura 9 - Imágenes histológicas del íleon porcino con coloración H&E.. .....81

191 Figura 10 - Imagen del revelado inmunofluorescente 600X.. .....83

192 Figura 11 - Arreglo inmunofluorescente 600X.....84

193 Figura 12 - *Preparado de membrana con azul de toluidina.....*85

194

195

196

197



198 **Lista de abreviaturas**

199

200 **SNE Sistema Nervioso Entérico**

201 **SNC Sistema Nervioso Central**

202 **PME Plexo Mientérico**

203 **PSM Plexo Submucoso**

204 **PFA Paraformaldehído**

205 **CN Cresta Neural**

206 **CCN Células de la Cresta Neural**

207 **IM Intra Muscular**

208 **IC Intra Cardíaco**

209 **IV Intra Venoso**

210 **IHQ Inmunohistoquímica**

211 **IF Inmunofluorescencia**

212 **IFD Inmunofluorescencia Directa**

213 **IFI Inmunofluorescencia Indirecta**

214 **PBS Tampón Fosfato Salino (siglas en inglés)**

215 **PB Tampón fosfato (siglas en inglés)**

216 **H&E Hematoxilina y Eosina**

217 **°C Grados centígrados**

218

219

220 **Resumen general**

221

222 El sistema de producción porcícola intensivo actual a nivel mundial,  
223 expone a los animales a diversos estresores (sociales, ambientales,  
224 inmunológicos, metabólicos y por manejo) con consecuencias que se  
225 manifiestan en respuestas fisiológicas y comportamentales alteradas,  
226 reflejándose en diferentes sistemas orgánicos, uno de ellos,  
227 frecuentemente afectado en los cerdos es el sistema gastrointestinal.  
228 Esta investigación se focaliza en este sistema orgánico, debido a que  
229 aloja al Sistema Nervioso Entérico (SNE), el cual incluye circuitos  
230 neuronales que controlan las funciones motoras, el flujo sanguíneo local,  
231 el transporte a través de mucosas, las secreciones, y modula funciones  
232 inmunológicas. Dicha red neuronal puede experimentar cambios  
233 estructurales y funcionales en respuesta a estímulos tanto intrínsecos  
234 como extrínsecos.

235 Como grupo de investigación nos hemos planteado evaluar los cambios  
236 neuroplásticos del SNE, sin embargo, la literatura disponible para la  
237 especie es limitada y no da cuenta de protocolos precisos que permitan  
238 evaluar los componentes del SNE. Por lo tanto, el objetivo de este  
239 estudio fue estandarizar técnicas de inmunohistoquímica que  
240 permitieran evaluar los componentes del SNE en el íleon de la especie  
241 porcina.

242 El proceso de estandarización incluyó la optimización en las condiciones  
243 de obtención, fijación y preparación de los tejidos, así como la evaluación  
244 de los componentes del sistema nervioso entérico. Se utilizaron muestras  
245 de intestinos (específicamente la porción del íleon) de ocho porcinos  
246 cruce comercial (C29 x PIC 410) entre los 30 y 35 días de nacidos. Los  
247 componentes del SNE se evaluaron mediante varias técnicas, incluyendo



248           histoquímica para los tejidos procesados con la técnica de preparado de  
249           membrana, así como con la técnica de inmunofluorescencia  
250           estandarizando un marcador específico de neuronas maduras anti-NeuN  
251           (1:500 EPR12763 Abcam, Australia) y un marcador de proliferación  
252           celular Ki67 (1:500 16667 Abcam, Australia). La evaluación de los  
253           protocolos se realizó a través de un análisis cualitativo de las secciones,  
254           centrándose en la especificidad y sensibilidad de los marcadores  
255           seleccionados.

256           Los resultados demostraron que la metodología usada para la obtención  
257           de las muestras garantizó una buena calidad del tejido, lo que se traduce  
258           en la posibilidad de aplicar los métodos histoquímicos e  
259           inmunohistoquímicos. Por otra parte, el protocolo estandarizado para la  
260           técnica de inmunofluorescencia es eficaz para visualizar algunos  
261           componentes del SNE en el íleon de porcinos con la expresión positiva  
262           de un marcador neuronal específico. La exploración del tejido con la  
263           técnica de preparado de membrana y coloración de Azul de Toluidina,  
264           permitió exponer y visualizar los cuerpos neuronales presentes en el  
265           plexo mientérico.

266           Como producto de esta estandarización, se desarrolló un manual de  
267           procedimientos que contiene toda la información transversal al  
268           procesamiento y análisis de muestras obtenidas del sistema digestivo  
269           porcino para la evaluación del SNE en la especie. El cual proporciona  
270           una noción metodológica para la evaluación del SNE en porcinos y pone  
271           a disposición una guía de procedimientos que pueden facilitar el abordaje  
272           del SNE en porcinos desde la etapa preanalítica hasta su análisis.

273

274 **Summary**

275 The current global intensive pig production system exposes animals to  
276 various stressors (social, environmental, immunological, metabolic, and  
277 management-related), resulting in altered physiological and behavioral  
278 responses. Chronic stress is widely recognized as a relevant cofactor in  
279 the onset of diseases. Its effects are reflected in different organ systems,  
280 one of which, frequently affected in pigs, is the gastrointestinal system.  
281 This research focuses on this organ system because it houses the Enteric  
282 Nervous System (ENS), which includes neural circuits that control motor  
283 functions, local blood flow, mucosal transport, secretions, and modulate  
284 immune functions.

285 This neural network, like the neurons in the central nervous system, can  
286 experience changes in its structure and function, meaning it can modify its  
287 activity in response to both intrinsic and extrinsic stimuli. This series of  
288 changes corresponds to the phenomenon of neuroplasticity, which  
289 encompasses the concept of neurogenesis, referring to the birth,  
290 proliferation, and maturation of new neurons.

291 The objective of this study was to standardize immunohistochemical  
292 techniques to evaluate neuroplasticity in the ileum of pigs, due to the  
293 limited information currently available for the assessment of the ENS in  
294 this species.

295 The standardization process included the optimization of conditions for  
296 tissue collection, fixation, and preparation, as well as the evaluation of the  
297 components of the enteric nervous system. Intestinal samples  
298 (specifically from the ileum) were obtained from eight commercial  
299 crossbred pigs (C29 x PIC 410) between 30 and 35 days of age. The  
300 components of the ENS were evaluated using a histochemical technique



301 with special Toluidine Blue staining on tissues processed with a  
302 membrane preparation technique, as well as immunofluorescence,  
303 standardizing a specific marker for mature neurons (anti-NeuN, 1:500  
304 EPR12763 Abcam, Australia) and a cell proliferation marker (Ki67, 1:500  
305 16667 Abcam, Australia). The evaluation of the protocols was performed  
306 through a qualitative analysis of the sections, focusing on the specificity  
307 and sensitivity of the selected markers.

308 The results demonstrated that the methodology used for sample  
309 collection ensured good tissue quality, allowing for the application of  
310 histochemical and immunohistochemical methods. Furthermore, the  
311 standardized protocol for the immunofluorescence technique proved  
312 effective in visualizing certain components of the ENS in the ileum of pigs,  
313 with positive expression of a specific neuronal marker. Examination of the  
314 tissue using the membrane preparation technique and Toluidine Blue  
315 staining enabled the exposure and visualization of neuronal cell bodies  
316 present in the myenteric plexus.

317 As a product of this standardization, a procedures manual was developed  
318 containing comprehensive information on the processing and analysis of  
319 samples obtained from the porcine digestive system for the evaluation of  
320 the ENS in this species. This manual provides a methodological  
321 framework for the assessment of the ENS in pigs and offers a guide to  
322 procedures that can facilitate the approach to the ENS from the pre-  
323 analytical stage to analysis.

324

325

326

327 **Introducción general**

328

329 La producción porcina es uno de los sectores ganaderos más  
330 importantes a nivel mundial. La carne de cerdo representa más de una  
331 cuarta parte del total de proteínas consumidas en todo el mundo y  
332 aproximadamente el 35% de toda la producción de carne (Maes et al.,  
333 2020). La producción porcina moderna se caracteriza por la  
334 intensificación, este factor incrementa la productividad animal, y como  
335 consecuencia contribuye a una mayor eficiencia económica. Sin  
336 embargo, causa graves problemas ecológicos y puede impactar  
337 negativamente los niveles de bienestar animal (descanso, confort  
338 térmico, facilidad de movimiento, etc.) y la salud en general. (Hernández-  
339 Antonio et al., 2021; Racewicz et al., 2021). La intensificación en la  
340 producción, representan un mayor riesgo en el aumento de los niveles de  
341 estrés en la especie, entre otras cosas por la inadecuada expresión de  
342 conductas naturales, así como, por el hacinamiento y la reagrupación, los  
343 cuales representan factores estresores que están presentes durante  
344 todas las etapas de producción (Brunberg et al., 2016; Martínez- Miró et  
345 al., 2016). El cerdo al ser una especie omnívora, tiene una capacidad  
346 bastante desarrollada para explorar el entorno (Lander et al., 2020). Por lo  
347 anterior, se ha sugerido que las especies omnívoras y herbívoras en  
348 condiciones de cría intensiva desarrollan estereotipias orales, como la  
349 aerofagia y moder y masticarse la cola entre ellos, lo que refleja una  
350 motivación frustrada para explorar y buscar comida (Brunberg et al.,  
351 2016). Esto, de acuerdo con Scipioni et al. (2009), se traduce en  
352 ausencia de bienestar.

353 Los efectos deletéreos del estrés se han descrito ampliamente y se sabe  
354 de sus repercusiones directas sobre la memoria, el aprendizaje, la



355           cognición, el sistema inmune, el sistema cardiovascular y endocrino  
356           (Yaribeygi et al., 2017). En humanos se ha descrito el efecto del estrés  
357           psicológico sobre la salud intestinal y su posible participación en la  
358           presentación de enfermedades inflamatorias intestinales (Sgambato et  
359           al., 2017; Araki et al., 2020). En la especie porcina se ha documentado  
360           que los factores estresantes asociados al destete temprano tienen el  
361           potencial de alterar los procesos normales del desarrollo epitelial,  
362           inmunitario y del sistema nervioso entérico aumentando el riesgo y la  
363           severidad de las enfermedades gastrointestinales en la vida adulta  
364           (Moeser et al., 2017; Pohl et al., 2015).

365           El sistema digestivo desempeña una serie de funciones que son  
366           esenciales para la supervivencia; la digestión mecánica y química de los  
367           alimentos, el tránsito del contenido luminal y la absorción de nutrientes  
368           son algunas de las más importantes, de igual manera realiza funciones  
369           inmunitarias al reconocer y combatir patógenos luminales. Estas  
370           complejas tareas están reguladas por una red autonómica de neuronas y  
371           células gliales denominada sistema nervioso entérico (Holland et al.,  
372           2021). Esta red se distribuye a lo largo del intestino mediante los plexos  
373           mientérico y submucoso. Las neuronas del plexo mientérico se agrupan en  
374           ganglios embebidos en tejido conectivo entre dos capas de la túnica  
375           muscular; y las neuronas del plexo submucoso residen entre el músculo y  
376           el epitelio (Mazzoni et al., 2023). En general, las neuronas del SNE  
377           interactúan con células entero endocrinas, inmunes, epiteliales y con el  
378           sistema nervioso autónomo. Las neuronas entéricas hacen sinapsis entre  
379           sí, pero también liberan neurotransmisores para regular la actividad  
380           celular relacionada con la motilidad intestinal, función epitelial, flujo  
381           sanguíneo y actividad inmunológica (Schneider et al., 2019). Entendiendo  
382           su importancia y el cumplimiento de funciones vitales, el SNE se



383 considera una pieza clave en la salud intestinal.

384 En las últimas cuatro décadas la perspectiva científica sobre el sistema  
385 nervioso ha cambiado significativamente, considerando como fenómenos  
386 de neuroplasticidad adulta los cambios o alteraciones morfológicas de las  
387 neuronas, cambios en su conectividad, cambios neurobioquímicos e  
388 incluso la generación de nuevas neuronas (neurogénesis) (Fuchs &  
389 Flügge, 2014). Este último concepto fue bastante controversial, ya que  
390 antes se creía en el dogma que las neuronas son un número finito de  
391 células que una vez mueren no pueden ser reemplazadas (Fuchs &  
392 Flügge, 2014). Sin embargo, diversos autores desde finales de 1960 hasta  
393 la fecha han demostrado que efectivamente las neuronas tienen la  
394 capacidad de realizar cambios adaptativos relacionados con la estructura  
395 y función del sistema nervioso, en respuesta a estímulos internos o  
396 externos (Watanabe 1992; Woolley et al., 1990; Ming & Song, 2011; Mc  
397 Ewen et al., 2015; Zilles, 1992).

398 La neuroplasticidad comprende una amplia gama de cambios  
399 estructurales y funcionales tanto en neuronas como en células gliales,  
400 como resultado a respuestas adaptativas a diferentes tipos de estímulos  
401 o condiciones, todo para mantener la homeostasis de las funciones  
402 gastrointestinales (Mawe et al., 2009). Teniendo en cuenta la importancia  
403 del SNE y su potencial neuroplástico, el estudio y abordaje de estos  
404 fenómenos es de fundamental importancia porque puede ayudar a  
405 dilucidar la fisiopatología de diversas enfermedades, y así contribuir al  
406 desarrollo de intervenciones terapéuticas dirigidas a la inervación  
407 intrínseca del intestino (Kruger et al., 2002).

408 A pesar de la importancia de la neuroplasticidad entérica, la falta de  
409 estandarización en las técnicas de inmunohistoquímica utilizadas para  
410 evaluar estos procesos en la especie limita la comparabilidad y



411 reproducibilidad de los resultados entre estudios. La variabilidad en los  
412 procedimientos, desde la fijación de tejidos hasta la elección de  
413 anticuerpos, así como las condiciones de tinción y análisis pueden  
414 afectar la interpretación de los datos, dificultando la identificación precisa  
415 de cambios neuroplásticos en el tejido entérico porcino.

416 Actualmente existen diversas técnicas para estudiar la neuroplasticidad *in*  
417 *vivo* y *ex vivo* que incluyen neuroimagen, neurofisiología, estudios  
418 moleculares y métodos de procesamiento de tejidos, en los cuales las  
419 técnicas de mayor aplicación son de naturaleza inmunoenzimática e  
420 inmunofluorescente (Aimone, 2014). En cerdos, la información disponible  
421 relacionada con la evaluación neuroplástica del sistema nervioso  
422 entérico, da cuenta principalmente de la evaluación de tejidos mediante  
423 inclusión en parafina y preparados de membrana para coloraciones  
424 histoquímicas, inmunohistoquímicas e inmunofluorescentes. Sin  
425 embargo, la descripción de las características metodológicas de los  
426 estudios que han realizado este tipo de ensayos es escasa y poco  
427 detallada (Montedónico et al., 2006; Yuan et al., 2023).

428 En este trabajo se presenta una guía metodológica completa que  
429 propone una ruta de trabajo detallada para la evaluación de los  
430 fenómenos de neuroplasticidad entérica en porcinos. En ella, se consigna  
431 la información relativa al proceso preanalítico y analítico que incluyen  
432 protocolos de muestreo, fijación y procesamiento de muestras, así como  
433 protocolos de inmunohistoquímica con la estandarización de los  
434 marcadores anti-NeuN y Ki67. Con esta guía se busca resolver una  
435 necesidad en términos de protocolos que pueda aplicarse en futuras  
436 investigaciones que se realicen en pro de entender la neuroplasticidad  
437 entérica y sus implicaciones en la salud intestinal.

438

439

440 **Objetivos**

441

442 **Objetivo general**

443 Estandarizar técnicas inmunoenzimáticas e inmunofluorescentes para  
444 evaluar neuroplasticidad en el íleon de porcinos.

445 **Objetivos específicos**

446 1. Normalizar la técnica de fijación por inmersión en  
447 paraformaldehído para inmunofluorescencia en el íleon.

448 2. Estandarizar la técnica de inmunofluorescencia e  
449 inmunohistoquímica en los plexos mientéricos del íleon, con  
450 marcadores inmunohistoquímicos de neuronas en proliferación y  
451 maduras.

452

453

454

455

456

457

458

459



460 **Capítulo 1: Consideraciones generales: Entendiendo el sistema nervioso**  
461 **entérico como un actor importante de la salud intestinal. Estrategias de**  
462 **evaluación en la especie porcina.**

463 **Introducción**

464 En este capítulo se presentará un marco conceptual entorno al objeto de  
465 estudio, dónde se contextualizará al lector sobre los componentes del  
466 SNE, su origen embriológico y su ubicación. De igual manera se resalta  
467 su importancia en la salud intestinal.

468 El sistema digestivo está innervado por un sistema nervioso intrínseco  
469 conocido como sistema nervioso entérico (SNE), el cual puede controlar  
470 las funciones del intestino incluso sin la influencia del sistema nervioso  
471 central (SNC) gracias a los circuitos reflejos locales (Furness, 2012;  
472 Fleming et al., 2020).

473 El SNE desempeña múltiples funciones como determinar los patrones de  
474 movimiento del tracto gastrointestinal, controlar la secreción de ácido  
475 gástrico, regular el movimiento de fluidos a través del epitelio de  
476 revestimiento, cambiar el flujo sanguíneo local, modificar la digestión de  
477 nutrientes e interactuar con los sistemas inmunitario y endocrino del  
478 intestino (Furness, 2012). Adicionalmente contribuye, junto con las  
479 células gliales, a mantener la integridad de la barrera epitelial entre el  
480 lumen intestinal y las células y tejidos de la pared intestinal (Rao &  
481 Gershon, 2016).

482 De acuerdo a lo anterior, se puede deducir la importancia del SNE para la  
483 salud intestinal. Este se ha reconocido como un modulador clave de la  
484 función de la barrera intestinal y un regulador de la homeostasis entérica.

485



486

487

488

489

490

491

Esto es importante, ya que un intestino permeable representa la puerta de entrada para la translocación de bacterias y toxinas generando cambios en el microbioma intestinal, el cual en conjunto con antecedentes genéticos individuales pueden contribuir al desarrollo de diversos trastornos intestinales (Niesler et al., 2021).

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

Para evaluar los cambios relacionados con el SNE existen diversos métodos que abarcan los estudios *in vivo*, análisis de comportamiento y estudios *ex vivo* (Niesler et al., 2021). En cerdos se han aplicado diferentes técnicas de análisis en estudios *ex vivo*, incluyendo técnicas inmunoenzimáticas e inmunofluorescentes, así como coloraciones histoquímicas (Mazzoni et al., 2020) (Van Ginneken et al., 1998). Sin embargo, y como se evidenciará en este trabajo, la descripción metodológica detallada de estas técnicas en la especie es escasa e imprecisa, incluso desde la etapa pre-analítica, la cual es determinante para obtener muestras de una calidad óptima y que sean aptas para realizar las técnicas previamente mencionadas.

503

504

505

En este capítulo se revisarán adicionalmente, algunos métodos y protocolos disponibles en la literatura y se denotarán algunas particularidades de los mismos.

506

507

508

509

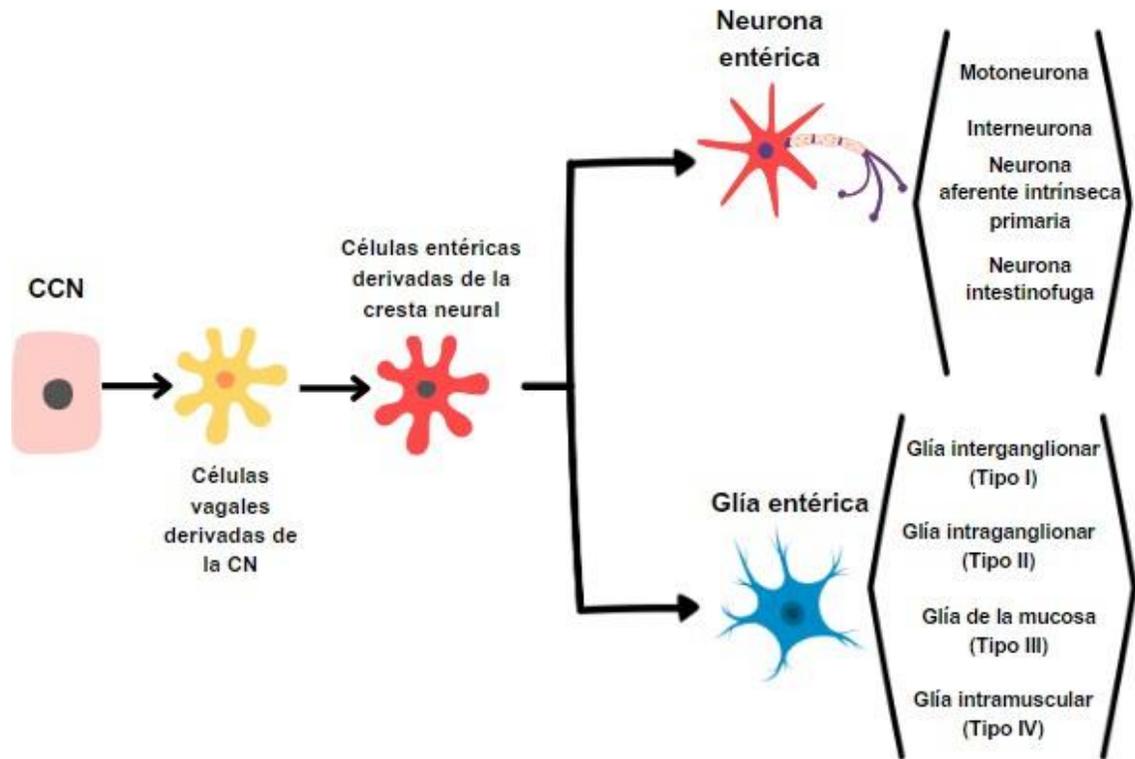
510

511 **Marco conceptual**

512 **Migración y desarrollo**

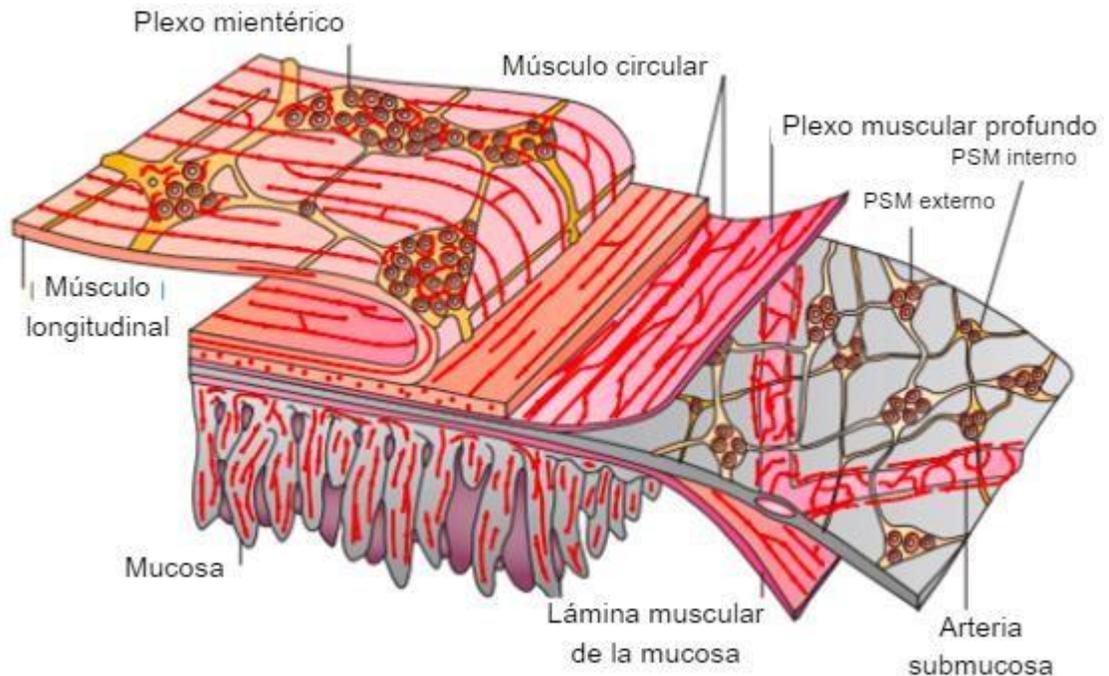
513 El SNE se deriva de la cresta neural (CN), donde reside una población  
514 celular precursora, multipotente y altamente migratoria conocida como  
515 células de la cresta neural (CCN), dicha población se origina en la unión  
516 de la placa neural y el ectodermo adyacente y migra a lo largo del  
517 embrión colonizando múltiples tejidos y diferenciándose a una gran  
518 variedad de células incluyendo neuronas y células gliales, las cuales una  
519 vez maduran y se diferencian en el tejido adquieren funciones específicas  
520 (Figura 1) ( Young et al., 2014; Nagy & Goldstein, 2017). En la actualidad,  
521 se reconocen distintos tipos de neuronas en el SNE, como las motoras,  
522 interneuronas, neuronas aferentes intrínsecas primarias y las neuronas  
523 intestinofugas. En cuanto a las células gliales, se han categorizado según  
524 su ubicación en el tejido, identificándose cuatro tipos principales: glía  
525 interganglionar, glía intraganglionar, glía de la mucosa y glía  
526 intramuscular (Lake & Heuckeroth, 2013; Nagy & Goldstein, 2017).

527 La migración de dicha población celular está regulada por una serie de  
528 factores que incluyen señales químicas, factores de crecimiento y  
529 expresión de proteínas; se reconocen dos fases: la fase transversa en la  
530 que las CCN migran desde el tubo neural a la región dorsolateral del  
531 embrión y la fase longitudinal en la que migran a lo largo del intestino en  
532 desarrollo (Young et al., 2014) (Nagy & Goldstein, 2017). En la mayoría de  
533 especies en las que se ha evaluado esta migración (peces cebra, aves,  
534 ratones, humanos, anfibios, reptiles, etc) se ha demostrado que se  
535 desarrolla primero el plexo externo conocido como plexo mientérico y  
536 posteriormente se da una migración secundaria radial hacia el epitelio  
537 para dar lugar al plexo submucoso (Figura 2) (Nagy & Goldstein, 2017).



538

539 Figura 1 - Diferenciación de células de la cresta neural a neuronas y células gliales. Las neuronas  
 540 entéricas y las células gliales se diferencian de acuerdo a su función en el tejido. Imagen adaptada y  
 541 traducida de Nagy & Goldstein (2017).



542

543 Figura 2 - Distribución de componentes histológicos en el intestino delgado. Disposición de *los plexos*  
544 *mentérico y submucoso. Imagen traducida de Rao & Gershon (2016).*

545 Sin embargo, no solo la migración es necesaria para que se establezcan  
546 estos componentes celulares. Se requieren las condiciones adecuadas  
547 para que se dé la supervivencia y su posterior diferenciación y  
548 maduración; etapas que deben ser estrictamente reguladas por el  
549 organismo para garantizar que todo el tracto gastrointestinal sea  
550 colonizado por la densidad y diversidad adecuada de neuronas y células  
551 gliales (Nagy & Goldstein, 2017). Cada una de estas etapas está regulada  
552 por diversos factores de transcripción, receptores de la superficie celular  
553 y señales neurotróficas y de igual manera, dependen de factores como el  
554 tamaño de la población de células progenitoras, la regulación de la  
555 apoptosis, la disponibilidad de factores neurotróficos, entre otros (Kang et  
556 al., 2021).

557 Una vez que una región intestinal está poblada por células precursoras,



558            estas comienzan a agruparse en ganglios y a medida que estos se van  
559            formando, los progenitores se diferencian en células de la glía y diversos  
560            subtipos de neuronas entéricas, entre ellas, sensoriales, interneuronas,  
561            neuronas motoras excitadoras e inhibitoras. En total se han identificado  
562            16 subtipos neuronales en el SNE maduro (Kang et al., 2021) y se han  
563            descrito densidades alrededor de los 400-600 millones de neuronas  
564            (Fleming et al., 2020). Sin embargo, aún no se han dilucidado por  
565            completo los mecanismos que controlan su desarrollo (Nagy & Goldstein,  
566            2017) (Hao & Young, 2009).

567

568

569 **El SNE en la vida postnatal. Introducción a la neuroplasticidad adulta.**

570

571 Durante la vida postnatal se dan cambios determinantes en el SNE,  
572 relacionados con la formación de circuitos funcionales, gangliogénesis y  
573 cambios neuroquímicos (Pohl et al., 2015). Todo lo anterior indica que  
574 durante este periodo el SNE exhibe un alto grado de plasticidad.

575 La neuroplasticidad se reconoce como la capacidad del sistema nervioso  
576 para cambiar, modificar o reorganizar su actividad en respuesta a  
577 estímulos intrínsecos o extrínsecos mediante la reorganización de su  
578 estructura, funciones o conexiones. La neuroplasticidad se puede dividir  
579 en dos mecanismos principales que incluyen la regeneración neural  
580 (neurogénesis y plasticidad sináptica) y la reorganización funcional  
581 (Puderbaugh & Emmady, 2023; Cramer et al., 2011; Quartarone et al.,  
582 2022; Shaffer, 2012). La neuroplasticidad estructural o regeneración  
583 neural implica alteraciones en las características físicas de las neuronas  
584 y sus conexiones, como la cantidad, la forma, la intensidad y la  
585 interconexión de la sinapsis; lo que permite que el cerebro se ajuste a  
586 diferentes entornos y experiencias; este fenómeno se compone de cuatro  
587 fases: proliferación, migración, diferenciación y maduración. La  
588 neurogénesis está regulada en el SNC por los niveles de neurotrofinas,  
589 como el factor neurotrófico derivado de cerebro (Viel et al., 2021). La  
590 neuroplasticidad funcional, en cambio, se refiere a modificaciones en las  
591 características de las redes neuronales, por ejemplo variaciones en la  
592 eficiencia, intensidad y sincronización de las sinapsis. Este tipo de  
593 plasticidad se manifiesta de manera rápida y tiene un impacto en  
594 diversos procesos cognitivos y conductuales, como la atención, la  
595 memoria y la percepción (Marzola et al., 2023; Murciano-Brea et al.,



596 2021; Vasina et al., 2006).

597 En humanos se han descrito varios factores postnatales que pueden  
598 influir en el neurodesarrollo y la neuroplasticidad. El estado nutricional por  
599 ejemplo, es un factor crítico para el crecimiento y desarrollo del cerebro.  
600 Se ha descrito como dietas altas en grasa y el consumo de edulcorantes  
601 pueden afectar negativamente la cognición, promover la neuro  
602 inflamación y activación glial, y disminuir la neurogénesis hipocampal  
603 (Marzola et al., 2023).

604 A nivel molecular se ha relacionado la proteína-43 (GAP-43) con el  
605 crecimiento y la regeneración neuronal, cuya expresión es especialmente  
606 alta en el sistema nervioso durante el desarrollo. En organismos adultos,  
607 su expresión disminuye, aunque todavía se detecta en regiones del  
608 cerebro con capacidad de plasticidad estructural o funcional, como el  
609 hipocampo. En el sistema nervioso autónomo, y en particular en el  
610 sistema nervioso entérico (SNE), el GAP-43 se expresa de manera  
611 prominente en los ganglios mientéricos y submucosos a lo largo de toda  
612 la vida lo que subraya la capacidad del SNE para adaptarse a nuevos  
613 desafíos a lo largo de la existencia (Schäfer et al., 2009).

614 Estos cambios fenotípicos, estructurales, funcionales o químicos son  
615 resultado de respuestas adaptativas a diferentes tipos de estímulos o  
616 condiciones para mantener la homeostasis de las funciones  
617 gastrointestinales (Mawe et al., 2009). Sin embargo, teniendo en cuenta  
618 que el individuo está expuesto a diferentes contextos (p ej., la nutrición y  
619 la interacción social), estas señales ambientales pueden modificarse o  
620 perturbarse provocando desviaciones en la función gastrointestinal a largo  
621 plazo y aumentando la susceptibilidad a enfermedades (Moeser et al.,  
622 2017).



623

624 Durante el desarrollo postnatal y posterior a la neurogénesis y la  
625 gangliogénesis, el sistema nervioso entérico (SNE) experimenta una  
626 pérdida natural de neuronas. Este proceso, conocido como "poda del  
627 SNE", se produce a través de la apoptosis, o muerte celular programada  
628 (García-Ródenas et al., 2006; Schäfer et al., 1999). Los mecanismos  
629 exactos de la poda del SNE no están completamente claros, pero se cree  
630 que pueden estar relacionados con la pérdida de factores de  
631 supervivencia, como el factor de crecimiento nervioso y el factor  
632 neurotrófico derivado de la glía (Chalazonitis et al., 2012; Foong et al.,  
633 2012).

634 Además de la poda del SNE, su composición neuroquímica también  
635 cambia significativamente durante el desarrollo postnatal. De particular  
636 importancia es el aumento de la inervación colinérgica del intestino, que  
637 es responsable de la contracción muscular gastrointestinal (De Vries et  
638 al., 2010). En la madurez, la proporción de neuronas que expresan  
639 acetilcolina, el principal neurotransmisor colinérgico, representa  
640 aproximadamente el 44% de todas las neuronas del plexo submucoso y  
641 el 62% de todas las neuronas del plexo mientérico. El crecimiento de las  
642 neuritas del SNE es otro acontecimiento postnatal importante, ya que  
643 permite que las neuronas se comuniquen entre sí y con otras partes del  
644 cuerpo (Pohl et al., 2015).

645 Pero no sólo en la etapa postnatal se da la muerte celular programada de  
646 las células del SNE, sino también en la vida adulta, donde son removidas  
647 gracias a la acción de macrófagos musculares que están asociados  
648 anatómicamente y funcionalmente con el plexo mientérico (Figura 3). En este  
649 sentido, se establece la necesidad de que surjan nuevas neuronas para  
650 reemplazar aquellas que son fagocitadas. (Kulkarni et al., 2017). De esta

651 manera autores como Kulkarni et al. (2017) y Yarandi et al. (2020) han

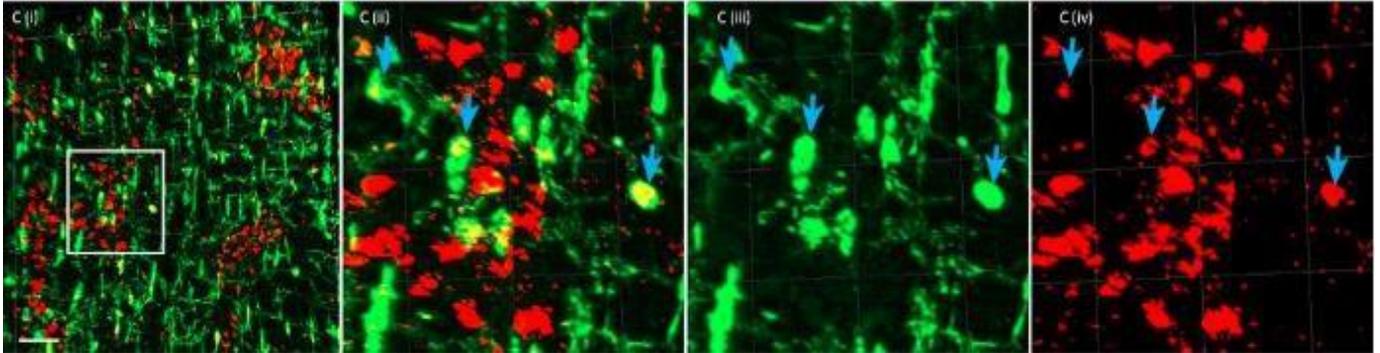


Figura 3 - Poblaciones mientéricas en un ratón adulto sufriendo muerte celular programada y fagocitosis activa por macrófagos musculares. De izquierda a derecha Ci. plexo mientérico a una escala de 10 um donde se observan neuronas colinérgicas en rojo y macrófagos musculares en verde, Cii. Escala de 50 um donde se observa la fagocitosis (flechas azules) del soma neuronal (rojo) al interior de macrófagos (verde), Ciii y Civ paneles separados a una escala de 10 um con macrófagos en verde y neuronas colinérgicas en rojo. (Kulkarni et al., 2017).

652 logrado demostrar la neuroplasticidad en el intestino adulto.

653

654 Como se expuso previamente la neuroplasticidad puede modularse a  
655 partir de estímulos tanto extrínsecos como intrínsecos. Dentro de ellos el  
656 estrés se ha reconocido como un estímulo capaz de modular  
657 negativamente este fenómeno (Aimone et al., 2014).

658 Todo lo mencionado anteriormente cobra una importancia crucial en los  
659 sistemas de producción porcina donde se ha establecido el destete  
660 temprano como un modelo estándar de destete con una edad promedio  
661 de 21 días, este modelo conlleva a un período de estrés intenso, el cual  
662 está vinculado al cambio de alimentación, representando un desafío tanto  
663 alimentario como inmunológico debido a la introducción de nuevos  
664 antígenos dietéticos (St-Pierre et al., 2023). Además, el reagrupamiento y  
665 la separación materna se perciben como estresores sociales y  
666 psicológicos respectivamente; de igual manera a lo largo del proceso



667                    productivo se continúan presentando eventos de este tipo (Martínez-Miró  
668                    et al., 2016). Es esencial destacar que un entorno estresante puede  
669                    alterar significativamente todos los procesos relacionados con el  
670                    desarrollo postnatal del SNE. Estos factores actúan de manera conjunta y  
671                    pueden desencadenar respuestas de mala adaptación intestinal con una  
672                    duración prolongada (Pohl et al., 2015). En este contexto, la salud  
673                    intestinal juega un papel vital para el desarrollo y la correcta conversión  
674                    alimenticia, lo que se traduce en parámetros productivos ideales (Szabó et  
675                    al., 2023).

676

677 **Métodos disponibles para la evaluación del sistema nervioso entérico en**  
678 **preparados de tejidos de cerdos**

679

680 Actualmente las preparaciones de tejidos son las muestras más usadas  
681 para evaluar los componentes del SNE (Cavin et al., 2023). Estos  
682 preparados se evalúan frecuentemente mediante microscopía óptica  
683 tradicional, microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal  
684 (Mazzuoli-Weber & Schemann, 2015; Dariel et al., 2020; Motegi et al.,  
685 2020; Boesmans et al., 2013; Kulkarni et al., 2020). En la especie porcina  
686 se han realizado evaluaciones del SNE que involucran desde el  
687 estómago hasta el colon, muchas de ellas se han centrado en la  
688 clasificación de los tipos neuronales y sus densidades, así como la  
689 influencia de algunos componentes presentes en la alimentación sobre  
690 sus características morfológicas y funcionales (Mozel & Arciszewski,  
691 2022) (Palus & Całka, 2019) (Paran et al., 2009). Estos estudios han  
692 realizado sus evaluaciones utilizando técnicas convencionales de  
693 preparación de tejido como la inclusión en parafina, crio congelación,  
694 preparados de membrana y otros métodos no especificados.

695 El método de procesamiento histoquímico de rutina para casi cualquier  
696 tejido es la hematoxilina y eosina (H&E), el cual se logra posterior al  
697 procesamiento de tejidos incluidos en parafina y permite la observación  
698 de componentes celulares como el núcleo, citoplasma y la membrana  
699 celular (Rivera et al., 2011). Sin embargo, el alcance de esta técnica está  
700 limitado a imágenes bidimensionales de estructuras que son  
701 tridimensionales (Portiansky, 2018), por ello, para el caso del plexo  
702 mientérico y su distribución irregular entre las tunicas musculares  
703 (Christensen, 1990), se indican otros métodos que consideren su  
704 estructura tridimensional. De todas formas, es importante someter las



705 muestras al procesamiento histoquímico con H&E para verificar la calidad  
706 de la muestra y valorar cualquier cambio *post mortem* (Slaoui et al.,  
707 2017).

708 Por otra parte, la técnica de preparado de membrana o “Whole mount”  
709 permite diseccionar y separar las capas histológicas de un tejido,  
710 facilitando la aproximación al tejido de interés. Para el caso del sistema  
711 nervioso entérico, esta técnica permite exponer el plexo mientérico y  
712 realizar valoraciones por cm<sup>2</sup> de tejido, lo cual es una ventaja para  
713 evaluaciones que consideren densidades (El-Nachef et al., 2021). Las  
714 muestras que resulten de esta técnica pueden ser sometidas a diversos  
715 análisis tanto para evaluación tridimensional como bidimensional, y se  
716 pueden aplicar diversas técnicas de tinción como histoquímica o  
717 inmunohistoquímica (Gfroerer & Rolle, 2013).

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729 **Bibliografía**

730

- 731 1. Aimone, J. B., Li, Y., Lee, S. W., Clemenson, G. D., Deng, W., &  
732 Gage, F. H. (2014). Regulation and function of adult neurogenesis:  
733 From genes to Cognition. *Physiological Reviews*, 94(4), 991-  
734 1026. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2014>
- 735 2. Araki, M., Shinzaki, S., Yamada, T., Arimitsu, S., Komori, M.,  
736 Shibukawa, N., Mukai, A., Nakajima, S., Kinoshita, K., Kitamura,  
737 S., Murayama, Y., Ogawa, H., Yasunaga, Y., Oshita, M., Fukui, H.,  
738 Masuda, E., Tsujii, M., Kawai, S., Hiyama, S., Takehara, T.  
739 (2020). Psychologic stress and disease activity  
740 in patients with inflammatory bowel disease: a multicenter cross-  
741 sectional study. *PLOS ONE*, 15(5), e0233365.  
742 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233365>
- 743 3. Boesmans, W., Martens, M., Weltens, N., Hao, M. M., Tack, J.,  
744 Cirillo, C., & Vanden Berghe, P. (2013). Imaging neuron-GLIA  
745 interactions in the enteric nervous system.  
746 *Frontiers in Cellular*  
747 *Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00183>
- 748 4. Brunberg, E., Rodenburg, T., Rydhmer, L., Kjaer, J., Jensen, P., &  
749 Keeling, L. J. (2016). Omnivores Going Astray: A review and new  
750 synthesis of abnormal behavior in pigs and laying hens. *Frontiers in*  
751 *Veterinary Science*, <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00057>
- 752 5. Cavin, J., Wongkrasant, P., Glover, J. B., Balemba, O. B.,  
753 MacNaughton, W. K., & Sharkey, K. A. (2023). Intestinal distension  
754 orchestrates neuronal activity in the enteric nervous system of adult



- 755 mice. The Journal of Physiology, 601(7), 1183-1206.  
756 <https://doi.org/10.1113/jp284171>
- 757 6. Chalazonitis, A., Gershon, M. D., & Greene, L. A. (2012). Cell death and  
758 the developing enteric nervous system. *Neurochemistry International*,  
759 61(6), 839- 847. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.01.028>
- 760 7. Christensen, J. (1990). Regional variations in the gross structure of the  
761 enteric nervous system: some new views. *PubMed*, 101, 21-  
762 27. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2486443>
- 763 8. Cramer, S. C., Sur, M., Dobkin, B. H., O'Brien, C., Sanger, T. D.,  
764 Trojanowski, J. Q., Rumsey, J. M., Hicks, R., Cameron, J. L., Chen,  
765 D., Chen, W. G., Cohen, L. G., deCharms, C., Duffy, C. J., Eden, G. F.,  
766 Fetz, E. E., Filart, R., Freund, M., Grant, S., Vinogradov, S. (2011).  
767 Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain*, 134(6),  
768 1591-1609. <https://doi.org/10.1093/brain/awr039>
- 769 9. Dariel, A., Grynberg, L., Auger, M., Lefèvre, C., Durand, T., Arnaúd, P.,  
770 Berre- Scoul, C. L., Venara, A., Suply, E., Leclair, M., De Vries, P.,  
771 Levard, G., Parmentier, B., Podevin, G., Schmitt, F., Couvrat, V., Irtan,  
772 S., Hervieux, E., Villemagne, T., . . . Neunlist, M. (2020). Analysis of  
773 enteric nervous system and intestinal epithelial barrier to predict  
774 complications in Hirschsprung's disease. *Scientific Reports*, 10(1).  
775 <https://doi.org/10.1038/s41598-020- 78340-z>
- 776 10. De Vries, P., Soret, R., Suply, E., Hérouy, Y., & Neunlist, M. (2010).  
777 Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and  
778 impact on neuromuscular transmission in the rat colon. *American Journal*  
779 *of Physiology- gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(2), G539-  
780 G547. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00092.2010>



- 781 11. El-Nachef, W. N., Hu, C., & Bronner, M. E. (2021). Whole gut imaging  
782 allows quantification of all enteric neurons in the adult zebrafish  
783 intestine. *Neurogastroenterology and*  
784 *Motility*, 34(2). <https://doi.org/10.1111/nmo.14292>
- 785 12. Fleming, M., Ehsan, L., Moore, S. R., & Levin, D. E. (2020). The enteric  
786 nervous system and its emerging role as a therapeutic target.  
787 *Gastroenterology Research and Practice*, 2020,  
788 1-13. <https://doi.org/10.1155/2020/8024171>
- 789 13. Foong, J. P. P., Van Nguyen, T., Furness, J. B., Bornstein, J. C., &  
790 Young, H. M. (2012). Myenteric neurons of the mouse small intestine  
791 undergo significant electrophysiological and morphological changes  
792 during postnatal development. *The Journal of Physiology*,  
793 590(10), 2375-2390. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.225938>
- 794 14. Fuchs, E., & Flügge, G. (2014). Adult Neuroplasticity: More than 40  
795 years of research. *Neural Plasticity*, 2014, 1-10.  
796 <https://doi.org/10.1155/2014/541870>
- 797 15. Furness, J. B. (2012). The Enteric nervous system and  
798 neurogastroenterology. *Nature Reviews Gastroenterology &*  
799 *Hepatology*, 9(5), 286-294. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>
- 800 16. Gfroerer, S., & Rolle, U. (2013). Interstitial cells of Cajal in the normal  
801 human gut and in Hirschsprung disease. *Pediatric Surgery*  
802 *International*, 29(9), 889-897. <https://doi.org/10.1007/s00383-013-3364->  
803 [y](https://doi.org/10.1007/s00383-013-3364-y)
- 804 17. García-Ródenas, C. L., Bergonzelli, G., Nutten, S., Schumann, A.,  
805 Cherbut, C., Turini, M., Ornstein, K., Rochat, F., & Corthésy-Theulaz, I.  
806 (2006). Nutritional approach to restore impaired intestinal barrier function



- 807 and growth after neonatal stress in rats. *Journal of Pediatric*  
808 *Gastroenterology and Nutrition*, 43(1), 16-24.  
809 <https://doi.org/10.1097/01.mpg.0000226376.95623.9f>
- 810 18.Hao, M. M., & Young, H. M. (2009). Development of enteric neuron  
811 diversity. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(7),  
812 1193-1210. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00813.x>
- 813 19.Hernández-Antonio, H. I., Vázquez-Luna, D., Lara-Rodríguez, D. A., &  
814 Martínez-Martínez, M. (2021). Cuantificación práctica del bienestar  
815 animal en porcinos de pequeños productores del sur de Veracruz,  
816 México. *Revista Mvz Cordoba*, 26(3), e2055.  
817 <https://doi.org/10.21897/rmvz.2055>
- 818 20.Holland, A. M., Bon-Frauches, A. C., Keszthelyi, D., Melotte, V., &  
819 Boesmans, W. (2021). The enteric nervous system in Gastrointestinal  
820 Disease etiology. *Cellular and Molecular Life Sciences*,  
821 78(10), 4713-4733. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03812-y>
- 822 21.Kang, Y., Fung, C., & Vanden Berghe, P. (2021). Gut innervation and  
823 enteric nervous system development: a spatial, temporal and molecular  
824 tour de force. *Development*, 148(3). <https://doi.org/10.1242/dev.182543>
- 825 22.Kruger, G. M., Mosher, J. T., Bixby, S., Joseph, N. M., Iwashita, T., &  
826 Morrison, S. J. (2002). Neural crest stem cells persist in the adult gut  
827 but undergo changes in Self-Renewal, neuronal subtype potential, and  
828 factor responsiveness. *Neuron*, 35(4), 657-669.  
829 [https://doi.org/10.1016/s08966273\(02\)00827-9](https://doi.org/10.1016/s08966273(02)00827-9)
- 830 23.Kulkarni, S., Micci, M. A., Leser, J., Shin, C., Tang, S., Fu, Y., Liu, L., Li,  
831 Q., Saha, M., Li, C., Enikolopov, G., Becker, L., Rakhilin, N., Anderson,  
832 M. J., Shen, X., Dong, X., Butte, M. J., Song, H., Southard-Smith, E. M.,



- 833 . . . Pasricha, P. J. (2017). Adult enteric nervous system in health is  
834 maintained by a dynamic balance between neuronal apoptosis and  
835 neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*  
836 *United States of America*, 114(18).  
837 <https://doi.org/10.1073/pnas.1619406114>
- 838 24. Kulkarni, S., Saha, M., Becker, L., Wang, Z., Liu, G., Leser, J., Kumar,  
839 M. R., Bakhshi, S., Anderson, M., Lewandoski, M., Slosberg, J.,  
840 Nagaraj, S., Vincent, E., Goff, L. A., & Pasricha, P. J. (2020). Age-  
841 associated changes in lineage composition of the enteric nervous  
842 system regulate gut health and disease. *bioRxiv (Cold Spring Harbor*  
843 *Laboratory)*. <https://doi.org/10.1101/2020.08.25.262832>
- 844 25. Lander, B., Schneider, M., & Brunson, K. (2020). A history of pigs in  
845 China: from curious omnivores to industrial pork. *The Journal of*  
846 *Asian Studies*, 79(4), 865-889.  
847 <https://doi.org/10.1017/s0021911820000054>
- 848 26. Lake, J. I., & Heuckeroth, R. O. (2013). Enteric Nervous System  
849 Development: migration, differentiation, and disease. *American Journal*  
850 *of Physiology-gastrointestinal and Liver Physiology*, 305(1), G1-G24.  
851 <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00452.2012>
- 852 27. Mazzoni, M., Cabanillas, L., Costanzini, A., Caremoli, F., Million, M.,  
853 Larauche, M., Clavenzani, P., De Giorgio, R., & Sternini, C. (2023).  
854 Distribution, quantification, and characterization of substance P enteric  
855 neurons in the submucosal and myenteric plexuses of the porcine colon.  
856 *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-023-03842-x>
- 857 28. Marzola, P., Melzer, T., Pavesi, E., Gil-Mohapel, J., & Brocardo, P. S.  
858 (2023). Exploring the Role of Neuroplasticity in Development, Aging,  
859 and Neurodegeneration. *Brain Sciences*, 13(12),



- 860 1610. <https://doi.org/10.3390/brainsci13121610>
- 861 29. Maes, D., Dewulf, J., Piñeiro, C., Edwards, S., & Kyriazakis, I. (2020). A  
862 critical reflection on intensive pork production with an emphasis on  
863 animal health and welfare. *Journal of Animal Science*,  
864 98(Supplement\_1), S15-S26. <https://doi.org/10.1093/jas/skz362>
- 865 30. Martínez-Miró, S., Tecles, F., Ramón, M. B., Escribano, D., Hernández,  
866 F., Martínez-Subiela, S., Manteca, X., & Cerón, J. J. (2016). Causes,  
867 consequences and biomarkers of stress in swine: an update. *BMC*  
868 *Veterinary Research*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0791-8>
- 869 31. Mawe GM, Strong DS, Sharkey KA. Plasticity of enteric nerve functions  
870 in the inflamed and postinflamed gut. *Neurogastroenterol Motil*. 2009  
871 May;21(5):481-91. doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01291.x. Epub 2009  
872 Mar 11. PMID: 19368664; PMCID: PMC2717558.
- 873 32. Mazzoni, M., Caremoli, F., Cabanillas, L., De Los Santos, J., Million, M.,  
874 Larauche, M., Clavenzani, P., De Giorgio, R., & Sternini, C. (2020).  
875 Quantitative analysis of enteric neurons containing choline  
876 acetyltransferase and nitric oxide synthase immunoreactivities in the  
877 submucosal and myenteric plexuses of the porcine colon. *Cell and*  
878 *Tissue Research*, 383(2), 645-654. [https://doi.org/10.1007/s00441-020-](https://doi.org/10.1007/s00441-020-03286-7)  
879 [03286-7](https://doi.org/10.1007/s00441-020-03286-7)
- 880 33. Mazzuoli-Weber, G., & Schemann, M. (2015). Mechanosensitivity in the  
881 enteric nervous system. *Frontiers in Cellular*  
882 *Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00408>
- 883 34. McEwen, B. S., Nasca, C., & Gray, J. D. (2015). Stress effects on  
884 neuronal structure: hippocampus, amygdala, and  
885 prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 41(1),



- 886 3-23. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.171>
- 887 35.Ming, G. L., & Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian  
888 brain: Significant answers and significant questions. *Neuron*,  
889 70(4), 687-702. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001>
- 890 36.Moeser, A. J., Pohl, C. S., & Rajput, M. (2017). Weaning stress and  
891 gastrointestinal barrier development: Implications for Lifelong gut  
892 health in pigs.*Animal Nutrition*, 3(4), 313-321.  
893 <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.003>
- 894 37.Motegi, Y., Sato, M., Horiguchi, K., Ohkura, M., Gengyo-Ando, K.,  
895 Ikegaya, Y., Fusamae, Y., Hongo, Y., Suzuki, M., Ogawa, K., Takaki,  
896 M., & Nakai, J. (2020). Confocal and multiphoton calcium imaging of the  
897 enteric nervous system in anesthetized mice. *Neuroscience*  
898 *Research*, 151, 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2019.02.004>
- 899 38.Montedónico, S., Paran, T. S., Pirker, M. A., Rolle, U., & Puri, P. (2006).  
900 Developmental changes in submucosal nitrenergic neurons in the porcine  
901 distal colon. *Journal of Pediatric Surgery*, 41(5), 1029-  
902 1035. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2005.12.063>
- 903 39.Mozel, S., & Arciszewski, M. B. (2022). Immunodetection of P2X2  
904 receptor in enteric nervous system neurons of the small  
905 intestine of pigs. *Animals*, 12(24), 3576.  
906 <https://doi.org/10.3390/ani12243576>
- 907 40.Murciano-Brea, J., Garcia-Montes, M., Geuna, S., & Herrera-Rincón, C.  
908 (2021). Gut microbiota and neuroplasticity. *Cells*, 10(8),  
909 2084. <https://doi.org/10.3390/cells10082084>
- 910 41.Nagy, N., & Goldstein, A. M. (2017). Enteric Nervous system  
911 Development: a crest cell's journey from neural tube to colon. *Seminars*



- 912 in Cell & Developmental Biology, 66, 94-106.  
913 <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.01.006>
- 914 42. Niesler, B., Küerten, S., Demir, İ. E., & Schäfer, K. (2021). Disorders of  
915 the enteric nervous System — a Holistic view. *Nature Reviews*  
916 *Gastroenterology & Hepatology*, 18(6), 393-410.  
917 <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00385-2>
- 918 43. Palus, K., & Calka, J. (2019). Influence of acrylamide administration on  
919 the neurochemical characteristics of enteric nervous system (ENS)  
920 neurons in the porcine duodenum. *International Journal of Molecular*  
921 *Sciences*, 21(1), 15. <https://doi.org/10.3390/ijms21010015>
- 922 44. Paran, T. S., Rolle, U., & Puri, P. (2009). Age-related changes in the  
923 myenteric plexus of the porcine bowel. *Journal of Pediatric Surgery*,  
924 44(9), 1771-1777. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2008.12.018>
- 925 45. Pohl, C. S., Medland, J. E., & Moeser, A. J. (2015). Early-life stress  
926 Origins of gastrointestinal disease: animal models, intestinal  
927 pathophysiology, and translational implications. *American Journal of*  
928 *Physiology-gastrointestinal and Liver Physiology*, 309(12),  
929 G927-G941. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00206.2015>
- 930 46. Portiansky, E. L. (2018). Análisis Multidimensional de imágenes  
931 digitales. 2a edición. En Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP)  
932 eBooks. <https://doi.org/10.35537/10915/70938>
- 933 47. Puderbaugh M, Emmady PD. Neuroplasticity. [Updated 2023 May 1]. In:  
934 StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024  
935 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557811/>
- 936 48. Quartarone, A., Ghilardi, M. F., & Boller, F. (2022). Neuroplasticity:  
937 From Bench to Bedside. Elsevier.



- 938 49. Racewicz, P., Ludwiczak, A., Skrzypczak, E., Składanowska-Baryza, J.,  
939 Biesiada, H., Nowak, T., Nowaczewski, S., Zaborowicz, M., Stanis, M.,  
940 & Śłószarz, P. (2021). Welfare health and productivity in commercial pig  
941 herds. *Animals*, 11(4), 1176. <https://doi.org/10.3390/ani11041176>
- 942 50. Rao, M., & Gershon, M. D. (2016). The bowel and beyond: the enteric  
943 nervous system in neurological disorders. *Nature Reviews*  
944 *Gastroenterology & Hepatology*, 13(9), 517-528.  
945 <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.107>
- 946 51. Rivera, P., Osuna, A. K. P., Soto-Domínguez, A., & García-Garza, R.  
947 (2011). Comparación histológica e inmunohistoquímica de muestras  
948 de tejido procesadas por la técnica convencional o por el método  
949 simplificado de acetonas. *International Journal of*  
950 *Morphology*, 29(2), 575-580. [https://doi.org/10.4067/s0717-  
951 95022011000200046](https://doi.org/10.4067/s0717-95022011000200046)
- 952 52. Schäfer, K., Hänsgen, A., & Mestres, P. (1999). Morphological changes  
953 of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat.  
954 *The anatomical record*, 256(1), 20-28.  
955 [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0185\(19990901\)256:1](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0185(19990901)256:1)
- 956 53. Scipioni, R., Martelli, G., & Volpelli, L. A. (2009). Assessment of welfare  
957 in Pigs. *Italian Journal of Animal Science*, 8(sup1),  
958 117-137. <https://doi.org/10.4081/ijas.2009.s1.117>
- 959 54. Schäfer, K. S., Ginneken, C. V. G., & Copray, S. C. (2009). Plasticity  
960 and neural stem cells in the enteric nervous system. *American*  
961 *Association For Anatomy*, 292(12), 1940-  
962 1952. <https://doi.org/10.1002/ar.21033>
- 963 55. Schneider, S., Wright, C. M., & Heuckeroth, R. O. (2019). Unexpected



- 964 roles for the second brain: enteric nervous system as master regulator  
965 of bowel function. Annual Review of Physiology, 81(1),  
966 235- 259. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121515>
- 967 56. Sgambato, D., Miranda, A., Ranaldo, R., Federico, A., & Romano, M.  
968 (2017). The role of stress in inflammatory bowel diseases. Current  
969 Pharmaceutical Design, 23(27).  
970 <https://doi.org/10.2174/1381612823666170228123357>
- 971 57. Shaffer, J. (2012). Neuroplasticity and Positive Psychology in Clinical  
972 Practice: A review for Combined benefits. Psychology, 03(12), 1110-  
973 1115. <https://doi.org/10.4236/psych.2012.312a164>
- 974 58. Slaoui, M., Bauchet, A., & Fiette, L. (2017). Tissue sampling and  
975 processing for histopathology evaluation. En Methods in molecular  
976 biology (pp. 101-114). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7172-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7172-5_4)
- 977 59. St-Pierre, B.; Perez Palencia, J.Y.; Samuel, R.S. Impact of Early  
978 Weaning on Development of the Swine Gut Microbiome.  
979 *Microorganisms* 2023, 11, 1753.  
980 <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071753>
- 981 60. Szabó, C., Lugata, J. K., & Ortega, A. D. S. V. (2023). Gut health and  
982 influencing factors in pigs. *Animals*, 13(8),  
983 1350. <https://doi.org/10.3390/ani13081350>
- 984 61. Vasina, V., Barbara, G., Talamonti, L., Stanghellini, V., Corinaldesi, R.,  
985 Tonini, M., De Ponti, F., & De Giorgio, R. (2006). Enteric neuroplasticity  
986 evoked by inflammation. *Autonomic Neuroscience*, 126-127, 264-  
987 272. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.02.025>
- 988 62. Van Ginneken, C., Van Meir,  
989 F., Sommereyns, G., Sys, S. U., & Weyns, A. (1998). Nitric oxide



- 990                   synthase expression in enteric neurons during development in the  
991                   pig duodenum. *Anatomy and Embryology*, 198(5), 399- 408.  
992                   <https://doi.org/10.1007/s004290050192>
- 993                   63. Watanabe Y, Gould E, McEwen BS (1992). Stress induces atrophy  
994                   of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain*  
995                   *Res. Aug 21;588(2):341-5.* doi: 10.1016/0006-8993(92)91597-8.  
996                   PMID: 1393587
- 997                   64. Woolley, C. S., Gould, E., & McEwen, B. S. (1990). Exposure to  
998                   excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult  
999                   hippocampal pyramidal neurons. *Brain Research*, 531(1-2), 225-  
1000                   231. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90778-a](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90778-a)
- 1001                   65. Yarandi, S. S., Kulkarni, S., Saha, M., Sylvia, K. E., Sears, C. L., &  
1002                   Pasricha, P. J. (2020). Intestinal bacteria maintain adult enteric nervous  
1003                   system and nitrenergic neurons via toll-like receptor 2-induced  
1004                   neurogenesis in mice. *Gastroenterology*, 159(1), 200-213.e8.  
1005                   <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.03.050>
- 1006                   66. Woolley, C. S., Gould, E., & McEwen, B. S. (1990). Exposure to excess  
1007                   glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal  
1008                   pyramidal neurons. *Brain Research*, 531(1-2), 225-231.  
1009                   [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90778-a](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90778-a)
- 1010                   67. Yarandi, S. S., Kulkarni, S., Saha, M., Sylvia, K. E., Sears, C. L., &  
1011                   Pasricha, P. J. (2020). Intestinal bacteria maintain adult enteric nervous  
1012                   system and nitrenergic neurons via toll-like receptor 2-induced  
1013                   neurogenesis in mice. *Gastroenterology*, 159(1), 200-213.e8.  
1014                   <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.03.050>
- 1015                   68. Yaribeygi, H., Panahi, Y., Sahraei, H., Johnston, T. P., & Sahebkar, A.



- 1016 (2017). The Impact of stress on Body Function: A review. PubMed, 16,  
1017 1057-1072. <https://doi.org/10.17179/excli2017-48>
- 1018 69. Young, H. M., Bergner, A. J., Simpson, M. J., McKeown, S. J., Hao, M.  
1019 M., Anderson, C., & Enomoto, H. (2014). Colonizing while migrating:  
1020 How do individual enteric neural crest cells behave? BMC Biology,  
1021 12(1). <https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-23>
- 1022 70. Yuan, P., Li, T., Million, M., Larauche, M., Atmani, K., Bellier, J., &  
1023 Taché, Y. (2023). New insight on the enteric cholinergic innervation of  
1024 the pig colon by central and peripheral nervous systems: reduction by  
1025 repeated loperamide administration. Frontiers in Neuroscience, 17.  
1026 <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1204233>
- 1027 71. Zilles, K. (1992). Neuronal plasticity as an adaptive property of the  
1028 central nervous system. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*,  
1029 174(5), 383- 391. [https://doi.org/10.1016/s0940-9602\(11\)80255-4](https://doi.org/10.1016/s0940-9602(11)80255-4)
- 1030
- 1031
- 1032
- 1033
- 1034
- 1035
- 1036
- 1037
- 1038
- 1039

1040 **Capítulo 2. Etapa preanalítica y analítica. Eutanasia, necropsia, toma y**  
1041 **procesamiento de muestras orientadas al sistema digestivo.**

1042

1043 **Introducción**

1044

1045 En este capítulo se relatarán todas las características del proceso  
1046 preanalítico y analítico; se describirá el método de eutanasia, protocolo  
1047 de necropsia, tratamiento y procesamiento de las muestras.

1048 El primer objetivo específico de este trabajo plantea estandarizar el  
1049 método de fijación por inmersión de las muestras obtenidas del intestino  
1050 de los individuos. Este planteamiento nace de la necesidad de superar  
1051 una dificultad metodológica en la fijación de las muestras obtenidas de  
1052 intestino. De acuerdo a lo expresado por Piña et al. (2022), se debe  
1053 realizar la fijación de los tejidos a partir de la perfusión transcardial con la  
1054 solución fijadora, técnica estándar para roedores; esto para garantizar  
1055 resultados óptimos con las técnicas de IHQ. Sin embargo, el volumen de  
1056 solución fijadora, la disponibilidad de personal especializado, y las  
1057 condiciones de seguridad para el personal dificultan en gran medida la  
1058 implementación de esta técnica en la especie porcina.

1059 Para este trabajo se utilizó un método de eutanasia químico y el  
1060 procedimiento de necropsia se realizó por estaciones o mesas de  
1061 muestreo, para disminuir el tiempo de obtención de las muestras de tejido  
1062 y evitar artefactos derivados. Una vez obtenidas las muestras se  
1063 implementó el método de fijación por inmersión para el tratamiento de las  
1064 mismas.

1065 El segundo objetivo específico, plantea estandarizar la técnica de



1066 inmunofluorescencia e inmunohistoquímica en los plexos mientéricos del  
1067 íleon, con marcadores inmunohistoquímicos de neuronas en proliferación  
1068 y maduras. Este objetivo se plantea debido a la poca información  
1069 disponible para la evaluación del sistema nervioso entérico en la especie  
1070 y a las dificultades que representan este tipo de análisis, entre ellas una  
1071 de las más críticas es la reactividad del anticuerpo en la especie, dado el  
1072 alto grado de especificidad que usualmente muestran los anticuerpos  
1073 (Farady et al., 2009). Para ello se utilizó un tratamiento específico  
1074 posterior a la toma de muestras que incluye un protocolo de fijación,  
1075 congelación, corte y aplicación de las técnicas planteadas con un  
1076 marcador de neuronas maduras y un marcador de células en  
1077 proliferación.

1078 Adicionalmente se describe una técnica novedosa de preparación de  
1079 tejidos para la evaluación del SNE conocida como preparado completo o  
1080 preparado de membrana, que a través de una serie de manipulaciones al  
1081 tejido permite exponer de manera completa el plexo mientérico.

1082

1083

1084

1085

1086

1087

1088 **Marco conceptual**

1089

1090 **Eutanasia en porcinos**

1091

1092 La eutanasia en animales juega un papel importante en las prácticas  
1093 veterinarias y es una experiencia fundamental para los veterinarios y sus  
1094 clientes. Es importante contar con un personal entrenado para garantizar  
1095 prácticas acordes con el bienestar de los animales. En el campo de la  
1096 investigación se deben implementar métodos apropiados y éticamente  
1097 avalados que garanticen una total analgesia y la pérdida irreversible de la  
1098 consciencia (Parasuraman & Christopher, 2022).

1099 La Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA) en el 2020  
1100 publicó una guía de eutanasia para animales. En ella se aborda el deber  
1101 ético que tienen los médicos veterinarios en garantizar una muerte  
1102 humanitaria, tanto para los animales de compañía, los animales de abasto  
1103 y los animales de experimentación, esto significa utilizar métodos que  
1104 disminuyan al máximo el dolor y estrés y que la muerte ocurra lo más  
1105 rápido posible. En esta guía se detallan los métodos para grandes  
1106 mamíferos especificando cuales están aceptados y avalados, cuales son  
1107 aceptados bajo circunstancias especiales y cuales definitivamente no se  
1108 pueden practicar en ninguna circunstancia (Tabla1 y Tabla 2).

1109

1110

1111

1112

Tabla 1 - Agentes y métodos de eutanasia aceptados en las diferentes especies animales traducido y adaptado de Leary et al. (2020)

Agentes y métodos de eutanasia por especies

Especie	Aceptable	Aceptable con condiciones
Invertebrados acuáticos	Inmersión en solución anestésica ( sal de magnesio, etanol, aceite de clavo, eugenol)	Métodos complementarios: alcohol 70% y formalina neutra bufferada 10%, congelación o ebullición
Anfibios	Barbitúricos inyectados, agentes disociativos y anestésicos, mesilato de tricaina inyectado o tópico o hidrocloreto de benzocaina tópico	Anestésicos inhalados como CO <sub>2</sub> , trauma craneal, congelación rápida en pequeños individuos
Felinos y caninos	Barbitúricos intravenosos, sobredosis de anestésicos	Barbitúricos por otras rutas de administración, sobredosis de anestésicos inhalados
Bovinos y equinos	Barbitúricos intravenosos	Disparo, perno cautivo
Aves	Barbitúricos inyectados (IV), sobredosis de anestésicos	Dislocación cervical, decapitación, anestésicos inhalados, electrocución, perno cautivo, disparo.
Cerdos	Barbitúricos inyectados	Anestésicos inhalados CO <sub>2</sub> , electrocución, perno cautivo, disparo.

Tabla 2 – Agentes y métodos no aceptados para la eutanasia en animales. Traducido y adaptado de Leary et al. (2020)

Algunos agentes y métodos que son inaceptables como método primario de eutanasia

Agente o método	Comentarios
Embolismo gaseoso	El embolismo gaseoso puede estar acompañado de convulsiones, opistótonos y vocalizaciones. Uso solo en animales anestesiados
Asfixia	La privación física de la respiración es inaceptable
Quemadura	Quemaduras químicas o térmicas no son aceptables como método de eutanasia
Cloroformo	El cloroformo es hepatotóxico y se sospecha de su potencial cancerígeno, además es extremadamente peligroso para el personal.
Ahogo	El ahogo no representa un método de eutanasia y es inhumano
Descompresión	La descompresión es inaceptable como método de eutanasia
Exanginación	Solo se debe usar en animales inconscientes
Hipotermia	La hipotermia no es un método apropiado de eutanasia
Sulfato de magnesio o cloruro de potasio	Uso inaceptable como un agente de eutanasia en animales vertebrados conscientes
Congelamiento rápido	El congelamiento como método único de eutanasia no es considerado como humanitario. A excepción de pequeños reptiles y anfibios (<4g) y de ratones neonatos < 5 días de vida.

1116

1117

1118

1119

1120



1121

1122

1123

1124

1125

1126

1127

1128

1129

1130

1131

1132

1133

1134

1135

1136

1137

1138

1139

1140

1141

1142

De acuerdo con estas recomendaciones, en este trabajo se adoptaron los lineamientos y pautas recomendadas por la AVMA para garantizar el mínimo sufrimiento y estrés derivado del procedimiento. Se eligió el método químico y se seleccionaron medicamentos que no requieren un acceso venoso para evitar el estrés de la manipulación. Para ello se utilizaron como anestésicos una combinación de agentes sedantes y disociativos como lo son la azaperona y la ketamina, ambos de aplicación intramuscular (IM). La azaperona es un medicamento ampliamente utilizado en la industria porcina como sedante neuroléptico para el manejo del estrés del posparto y el transporte, así como premedicación anestésica con un efecto que dura entre 2 a 4 horas e inicia aproximadamente a los 20 minutos post aplicación intramuscular. La ketamina es un agente disociativo de gran uso en la especie porcina ya que produce una inmovilización rápida y segura de los animales con la mínima depresión cardiovascular (Daş et al., 2016). El agente eutanásico utilizado para este protocolo fue el pentobarbital sódico y la Difenilhidantoína sódica (Euthanex®), el cual se ha reportado como un agente barbitúrico con propiedades hipnóticas y anti convulsivas, y es el medicamento de elección para los protocolos de eutanasia ya que se ha demostrado que con la dosis adecuada puede provocar la muerte de los individuos (Worthington et al., 2022).

1143

1144

1145 **Toma y manipulación de muestras del sistema digestivo**

1146

1147 Para garantizar muestras intestinales de buena calidad es importante  
1148 realizar una toma y procesamiento correcto de los tejidos (Rieger et al.,  
1149 2020). Particularmente el sistema digestivo es un tejido muy frágil y su  
1150 morfología se puede alterar por la manipulación excesiva (Itzá-Ortíz et al.,  
1151 2018). Adicionalmente los cambios *post mortem* comienzan  
1152 inmediatamente después de la muerte del animal, por lo que es  
1153 imperativo realizar el muestreo en el menor tiempo posible (Segalés,  
1154 2001). De igual manera retirar el exceso de material orgánico de la luz  
1155 intestinal mejora la calidad del tejido al evitar el roce o presión del mismo  
1156 con la mucosa; para ello se instila agua destilada con una jeringa a través  
1157 de la luz intestinal hasta garantizar la eliminación del contenido.  
1158 Posteriormente se anuda uno de los extremos del fragmento y se aplica  
1159 la solución fijadora en la luz y se anuda el otro extremo para obtener  
1160 finalmente un cilindro que luego se sumerge en la solución fijadora (Itzá-  
1161 Ortíz et al., 2018).

1162 Obtener muestras viables del sistema digestivo es posible, siempre y  
1163 cuando se priorice su abordaje y muestreo durante el acto de necropsia.  
1164 La práctica de necropsia es una herramienta de diagnóstico común en  
1165 medicina veterinaria y se ha propuesto como un ejercicio sistemático y  
1166 ordenado (Küker et al., 2018). Sin embargo, dependiendo del interés  
1167 específico (toma de muestras, necropsia forense, etc) se pueden hacer  
1168 excepciones y realizar una necropsia dirigida de acuerdo al interés del  
1169 profesional (Suckow et al., 2012). En este trabajo se aplicó una  
1170 metodología novedosa que permite priorizar el abordaje del sistema  
1171 digestivo. Dicha metodología consiste en asignar estaciones de trabajo  
1172 que se encargan de un proceso específico; para el caso del sistema



1173            digestivo, corresponde a la segunda estación y allí únicamente se accede  
1174            a la cavidad abdominal en busca del tracto digestivo, desde la porción  
1175            distal de esófago hasta la porción final del recto procurando conservar un  
1176            margen de tiempo inferior a los 15 minutos posterior a la muerte del  
1177            animal. Posteriormente se procede al muestreo de acuerdo a lo expuesto  
1178            en la metodología.

1179            Todo lo anterior, se justifica precisamente en evitar los cambios *post*  
1180            *mortem*, ya que estos no solo afectan la morfología tisular, sino también  
1181            la expresión de proteínas constitutivas. Una vez se da la muerte, se  
1182            empieza a comprometer el suministro sanguíneo a los tejidos lo que  
1183            provoca lesiones tisulares agudas que se pueden manifestar como  
1184            degeneración hidrópica, reducción del ATP, daños en la integridad de la  
1185            membrana celular y aumento en los niveles de calcio intracitoplasmático,  
1186            todo esto conduce a la muerte celular y al inicio de la autólisis (auto  
1187            digestión). Estos cambios que marcan el inicio de la descomposición de  
1188            los tejidos incluyen la desnaturalización de proteínas intracelulares,  
1189            ácidos nucleicos, coagulación de proteínas y digestión enzimática del  
1190            núcleo y citoplasma (Wenzlow et al., 2021).

1191            Una vez garantizado un adecuado muestreo se procede al  
1192            procesamiento de tejidos, dentro del cual, la fijación es el paso más  
1193            crítico. La fijación desnaturaliza las proteínas, haciendo que la célula y  
1194            sus componentes sean resistentes a la autólisis (Suvarna et al., 2012).  
1195            Garantizar una fijación adecuada depende tanto del tiempo, como del  
1196            diámetro del tejido y la cantidad de solución fijadora. Es por esto que de  
1197            acuerdo con Compton et al. (2019) se recomienda utilizar muestras que  
1198            no superen los 5mm de espesor, para garantizar una penetración rápida  
1199            y uniforme de la solución fijadora considerando una velocidad de  
1200            penetración de 1mm por hora a temperatura ambiente. De igual manera,



1201 se debe garantizar una relación entre volumen de fijador y tejido de al  
1202 menos 4:1 o preferiblemente 10:1; en cuanto al tiempo se recomienda tan  
1203 inmediato como sea posible posterior a la muerte; por ejemplo, Loomis y  
1204 Alu (2016) sugieren un tiempo menor a 20 minutos entre la muerte y el  
1205 inicio de la fijación.

1206 A la fecha no existe un marco de tiempo completo entre la muerte y el  
1207 inicio de los cambios post mortem significativos del tejido gastrointestinal  
1208 ya que la mayoría de los estudios se centran en los cambios  
1209 macroscópicos (Brooks, 2016). Sin embargo, Muñoz et al. (1999)  
1210 lograron establecer cambios significativos en la estructura mitocondrial de  
1211 las células del miocardio dentro de los 15 a 45 minutos post mortem.

1212

1213 **Métodos y protocolos de fijación de tejidos para inmunofluorescencia**

1214

1215 La inmunofluorescencia (IF) es una técnica de inmunohistoquímica que  
1216 utiliza fluoróforos para demostrar la presencia de antígenos celulares en  
1217 los tejidos o el suero (Nithya et al., 2017) (Jalali, 2017).

1218 Se reconocen cuatro tipos de IF, de ellos la IFD y la IFI son los más  
1219 comunes: la IFD utiliza un solo anticuerpo marcado con un fluoróforo; la  
1220 IFI utilizado dos anticuerpos, el primario (no marcado) se une a la  
1221 molécula de interés y el anticuerpo secundario (marcado con fluoróforo)  
1222 reconoce y se une al anticuerpo primario; adicionalmente se reconoce la  
1223 inmunofluorescencia indirecta con fijación al complemento por sus siglas  
1224 en inglés IIF-CF y la técnica de doble inmunofluorescencia por el método  
1225 indirecto, la cual permite identificar la presencia de dos antígenos  
1226 diferentes en una célula o la identificación de una célula específica en un  
1227 tejido mediante dos anticuerpos marcados con diferentes fluoróforos  
1228 (Betterle & Zanchetta, 2012). Esta última técnica fue la de elección para  
1229 este trabajo, ya que se busca identificar aquellas células que expresan la  
1230 proteína celular de acuerdo a su estadio de maduración (neurona madura  
1231 e inmadura), así como la proteína que refleja su actividad proliferativa  
1232 (actividad del ciclo celular).

1233 La fijación es un paso preliminar esencial en la IF para prevenir la  
1234 autólisis y preservar la morfología celular conservando la antigenicidad.  
1235 El método de fijación ideal sirve para inmovilizar los antígenos sin alterar  
1236 la arquitectura celular y que, de esta manera, los anticuerpos puedan  
1237 acceder a cualquier componente celular objetivo (Im et al., 2018). Existen  
1238 dos métodos de fijación comúnmente utilizados, el primero y más  
1239 utilizado en la comunidad científica, específicamente en los protocolos de



1240 las neurociencias es la fijación con paraformaldehído al 4% por perfusión  
1241 intracardiaca y el segundo es la fijación por inmersión en para  
1242 formaldehído al 4% (Gage et al., 2012; Piña et al., 2022; Spiga et al.,  
1243 2011). El método de perfusión intracardiaca está muy bien establecido en  
1244 murinos, pero no en grandes mamíferos (Lu et al., 2023; Musigazi et al.,  
1245 2018). Este método utiliza la vasculatura para lograr la administración  
1246 sistémica del fijador en el animal vivo y consiste en anestésiar al animal,  
1247 abrir la pared torácica y exponer el corazón. Luego se inserta una aguja  
1248 en el ventrículo izquierdo para bombear el fijador al circuito sistémico.  
1249 Posteriormente se recolecta el tejido de interés y se coloca en un baño  
1250 fijador. Sin embargo, este método tiene varias desventajas, entre ellas,  
1251 que requiere mucho tiempo, grandes volúmenes de fijador (algunos de  
1252 los cuales se sospecha que son cancerígenos) y una metodología que  
1253 requiere mucha mano de obra y personal especializado (Kasukurthi et al.,  
1254 2009). Algunos autores proponen incluso, el uso de dispositivos  
1255 accionados por aire comprimido, sobre todo en mamíferos de talla grande  
1256 (Jonkers et al., 1984).

1257 Teniendo en cuenta estas desventajas y contemplando el primer objetivo  
1258 específico propuesto, se decidió seleccionar el método de fijación por  
1259 inmersión para estandarizar en fragmentos obtenidos de tejido del  
1260 intestino delgado en porcino, específicamente íleon. Esta porción  
1261 intestinal se seleccionó ya que diversos autores han reportado que es la  
1262 porción del intestino delgado donde se concentra la mayor densidad de  
1263 neuronas con promedios de  $6.52 \pm 2.31$  en el plexo mientérico, versus  
1264  $4.40 \pm 1.70$  y  $4.26 \pm 1.95$  en el yeyuno y el duodeno respectivamente  
1265 (Michel et al., 2022; Mozel & Arciszewski, 2022; Paran et al., 2009).



1266 El método de fijación por inmersión contempla un protocolo de recambios  
1267 de las soluciones fijadoras en las que se sumergen los tejidos, así como  
1268 un gradiente de sacarosa que básicamente prepara al tejido para su  
1269 posterior congelación.

1270 La congelación de tejidos es necesaria para mantener una antigenicidad  
1271 proteínica óptima durante el almacenamiento de los tejidos, y la  
1272 crioprotección con sacarosa se utiliza ampliamente para IHC e IF, ya que  
1273 proporciona una excelente preservación de las estructuras celulares y  
1274 mantiene la antigenicidad de las proteínas, al tiempo que minimiza la  
1275 formación de cristales de hielo durante la congelación de los tejidos  
1276 (Pushie et al., 2020).

1277 La congelación de tejidos se usa como estrategia para conservar  
1278 volúmenes de muestras que vayan a ser destinadas a un banco de  
1279 tejidos. Este proceso es crucial y se debe garantizar una congelación  
1280 rápida. Para ello, se deben sumergir las muestras en un medio de  
1281 congelación enfriado, como el isopentano, el cual las protege de la  
1282 desecación (Meng et al., 2014; Steu et al., 2008). Steu et al. (2008)  
1283 lograron demostrar que en las muestras congeladas con tratamiento  
1284 previo de isopentano no se observaron artefactos en contraste con otros  
1285 métodos de congelación.

1286

## 1287 **Procesamiento inmunohistoquímica e inmunofluorescencia**

1288

1289 La técnica tanto de inmunohistoquímica como de inmunofluorescencia  
1290 puede ser aplicada a tejidos en parafina o a tejidos congelados. Para ello  
1291 se deben realizar cortes al tejido en espesor de micras para poder



1292 evaluarlo a través del microscopio. Para el caso de los tejidos congelados  
1293 es preciso utilizar un criostato, que es un micrótomo incluido en una  
1294 cámara de congelación a -20 grados C°; con este criostato se realizan  
1295 varios cortes del tejido, los cuales se posicionan en pozos (Rodríguez  
1296 Quintana & Garzón Roza, 2021). Usualmente se realizan cortes entre 5 a  
1297 30 um. Teniendo en cuenta que en el ámbito de la investigación se  
1298 procesan varios individuos al tiempo, existe un formato que incluye  
1299 el uso de placas multipocillos o “Multiwell” permitiendo así la aplicación  
1300 de los reactivos a todos los tejidos al mismo tiempo y en el mismo  
1301 experimento (Becker et al., 2018). La técnica que utiliza estos pozos se  
1302 reconoce como” flotación libre”, esta implica la suspensión de las  
1303 secciones de tejido previamente cortadas en una solución de anticuerpos  
1304 (Partida & Walters, 2023).

1305 Tanto la inmunohistoquímica como la inmunofluorescencia utilizan  
1306 anticuerpos para “marcar “o reconocer las proteínas en un tejido (Magaki  
1307 et al., 2018). Para la evaluación de los componentes del sistema  
1308 nervioso, específicamente neuronas se han reconcido diversos  
1309 anticuerpos, dependiendo de su estado de maduración, el tipo de  
1310 neurotransmisor que liberen y el tipo de sinapsis (Fernández-Fournier  
1311 et al., 2022). Para el caso de este trabajo se seleccionó NeuN como  
1312 marcador de neuronas maduras (Miller-Rhodes, 2022); en porcinos, las  
1313 descripciones del uso de este marcador son escasas (Ragauskas et al.,  
1314 2022; Swier et al., 2020; Schwartz et al., 2005), y específicamente del  
1315 clon EPR12763 hay tres artículos publicados entre el 2013 y el 2019 ,  
1316 dos de ellos incluyen las descripciones de los protocolos para la técnica  
1317 de IHQ, y el otro describe la técnica para IF, sin embargo, este último  
1318 artículo aplica estos métodos en tejido de hipocampo (Miller et al., 2016;  
1319 Zacharko-Siembida et al., 2013; Wixey et al., 2019). Por otra parte, se



1320                    utilizó el marcador de proliferación celular Ki67, el cual está ampliamente  
1321                    reconocido como un antígeno nuclear asociado a la proliferación que se  
1322                    detecta en células en división (fases G1, S, G2 y M) y no en las células  
1323                    quiescentes (G0) (Li et al., 2014).

1324

1325

1326

1327

1328

1329

1330

1331 **Preparado de membrana**

1332

1333 Dado que el SNE está formado por plexos nerviosos tridimensionales que  
1334 se encuentran dentro de las capas de la pared intestinal, los métodos  
1335 rutinarios, como la preparación de criosecciones y cortes incluidos en  
1336 parafina, como los descritos previamente, muestran sólo una parte de las  
1337 secciones y pueden no ser los más adecuados para la evaluación  
1338 histopatológica e interpretación de todo el plexo nervioso (Huang et al.,  
1339 2021). En la década de los años 60 se introdujo un método conocido  
1340 como preparación completa (“whole mount”) el cual ha servido para revelar  
1341 las inervaciones intestinales (Gabella, 1971; Gunn, 1968), ya que permite  
1342 una visualización directa y completa en términos de distribución *in situ* y  
1343 morfología de las células y fibras nerviosas en los ganglios (Han et al.,  
1344 2017).

1345 Para este trabajo se adoptó la metodología de preparación de membrana  
1346 dada la ventaja de poner exponer completamente el plexo mientérico. Sin  
1347 embargo, surgieron dificultades considerables para replicarla de acuerdo  
1348 a la información disponible, ya que las descripciones se realizan  
1349 principalmente en tejidos de murinos (Appleton et al., 2009) y las  
1350 disponibles en porcinos son poco detalladas.

1351

1352

1353

1354 **Bibliografía**

1355

1356 1. Becker, A., Erfle, H., Gunkel, M., Beil, N., Kaderali, L., &  
1357 Starkuviene, V. (2018). Comparison of cell arrays and Multi-Well  
1358 plates in Microscopy-Based Screening. *High-throughput*, 7(2), 13.  
1359 <https://doi.org/10.3390/ht7020013>

1360 2. Betterle, C., & Zanchetta, R. (2012). The immunofluorescence  
1361 techniques in the diagnosis of endocrine autoimmune diseases.  
1362 *Auto-immunity Highlights*, 3(2), 67-78.

1363 3. Brooks, J. (2016). Postmortem changes in animal carcasses and  
1364 estimation of the postmortem interval. *Veterinary*  
1365 *Pathology*, 53(5), 929- 940.  
1366 <https://doi.org/10.1177/0300985816629720>

1367 4. Compton, C. C., Robb, J. A., Anderson, M. W., Berry, A. B.,  
1368 Birdsong, G. G., Bloom, K. J., Branton, P. A., Crothers, J. W.,  
1369 Cushman-Vokoun, A. M., Hicks,  
1370 D. G., Khoury, J. D., Laser, J., Marshall, C. B., Misialek, M. J., Natale,  
1371 K. E.,

1372 Nowak, J. A., Olson, D., Pfeifer, J. D., Schade, A. E., . . . Yohe, S.  
1373 (2019). Preanalytics and Precision Pathology: Pathology practices  
1374 to ensure molecular integrity of cancer patient  
1375 biospecimens for precision medicine. *Archives of*  
1376 *Pathology & Laboratory Medicine*, 143(11), 1346- 1363.  
1377 <https://doi.org/10.5858/arpa.2019-0009-sa>

1378



- 1379 5. De Las Heras Guillamón, M., & De Jalón, J. A. G. (2008). Guía de  
1380 diagnóstico de necropsia en patología porcina. SERVET.
- 1381 6. Huang, Z., Liao, L., Wang, Z., Lu, Y., Yan, W., Cao, H., & Tan, B.  
1382 (2021). An efficient approach for wholemout preparation of the  
1383 myenteric plexus of rat colon. Journal of Neuroscience  
1384 Methods, 348, 109012.  
1385 <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.109012>
- 1386 7. Han, X., Tang, S., Dong, L., Song, L., Dong, Y., Wang, Y., & Du, Y.  
1387 (2017). Loss of nitregeric and cholinergic neurons in the enteric  
1388 nervous system of APP/PS1 transgenic mouse  
1389 model. Neuroscience Letters, 642, 59 -  
1390 65. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.01.061>
- 1391 8. Farady, C. J., Sellers, B. D., Jacobson, M. P., & Craik, C. S.  
1392 (2009). Improving the species cross-reactivity of an antibody using  
1393 computational design. Bioorganic & Medicinal Chemistry  
1394 Letters, 19(14), 3744-  
1395 3747. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.05.005>
- 1396 9. Fernández-Fournier, M., Lacruz, L., Nozal, P., Chico, J. L.,  
1397 Barranco, A., Otero-Ortega, L., Corral, Í., & Carrasco, Á. (2022).  
1398 The Study of Neural Antibodies in Neurology: A Practical  
1399 summary. Frontiers in  
1400 Immunology, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1043723>
- 1401 10. Gabella, G. (1971). Neuron size and number in the myenteric  
1402 plexus of the newborn and adult rat.  
1403 PubMed, 109(Pt 1), 81 -  
1404 95. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5556678>

- 1405 11. Gunn, M. (1968). Histological and histochemical observations on  
1406 the myenteric and submucous plexuses of mammals. PubMed,  
1407 102(Pt 2), 223-  
1408 239. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4966913>
- 1409 12. Hewitt, S. M., Baskin, D. G., Frevert, C. W., Stahl, W. L., &  
1410 Rosa-Molinar, E. (2014). Controls for immunohistochemistry.  
1411 Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 62(10), 693-697.  
1412 <https://doi.org/10.1369/0022155414545224>
- 1413 13. Im, K., Mareninov, S., Díaz, M. F., & Yong, W. H. (2018). An  
1414 introduction to performing immunofluorescence staining. En  
1415 Methods in molecular biology (pp. 299-311).  
1416 [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5\\_26](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26)
- 1417 14. Itzá-Ortíz, M., Quezada-Casasola, A., Castillo-Castillo, Y.,  
1418 Rodríguez-Galindo, E., Carrera-Chávez, J. M., Martín-Orozco, U.,  
1419 Jaramillo-López, E., & Calzada-Nieves, A. (2018). Comparison of  
1420 three sampling procedures for evaluation of intestinal villi: Swine  
1421 model. Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias, 31(1), 3-9.  
1422 <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v31n1a01>
- 1423 15. Jalali, M. (2017). Basic science methods for clinical researchers.  
1424 En Elsevier eBooks.  
1425 [https://www.scholartext.com/book/88839516?\\_locale=en](https://www.scholartext.com/book/88839516?_locale=en)
- 1426 16. Jonkers, B., Sterk, J., & Wouterlood, F. G. (1984). Transcardial  
1427 perfusion fixation of the CNS by means of a compressed-air-driven  
1428 device. Journal of Neuroscience Methods, 12(2), 141-  
1429 149. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90013-x](https://doi.org/10.1016/0165-0270(84)90013-x)
- 1430

- 1431 17. Kasukurthi, R., Brenner, M., Moore, A. M., Moradzadeh, A., Ray,  
1432 W. Z., Santosa, K. B., Mackinnon, S. E., & Hunter, D. A. (2009).  
1433 Transcardial perfusion versus immersion fixation for assessment of  
1434 peripheral nerve regeneration. *Journal of Neuroscience*  
1435 *Methods*, 184(2), 303-  
1436 309. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.08.019>
- 1437 18. Küker, S., Faverjon, C., Furrer, L., Berezowski, J., Posthaus, H.,  
1438 Rinaldi, F., & Vial, F. (2018). The value of necropsy reports for  
1439 animal health surveillance. *BMC Veterinary Research*, 14(1).  
1440 <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1505-1>
- 1441 19. Krishnan, A., Areti, A., Komirishetty, P., Chandrasekhar, A., Cheng,  
1442 C., & Zochodne, D. W. (2022). Survival of compromised adult  
1443 sensory neurons involves macrovesicular formation. *Cell Death*  
1444 *Discovery*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01247-3>
- 1445 20. Leary, S. L., Underwood, W. U., Anthony, R. A., Cartner, S. C.,  
1446 Grandin, T. G., Greenacre, C. G., McCrackin, M. M., Meyer, R. M.,  
1447 Shearer, J. S., Turner, T. T., & Yanong, R. Y. (2020). AVMA  
1448 Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. [avma.org](http://avma.org).  
1449 Recuperado 14 de enero de 2024, de  
1450 [https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-](https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf)  
1451 [Euthanasia-2020.pdf](https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf)
- 1452 21. Li, L., Jiang, G., Chen, Q., & Zheng, J. (2014). KI67 is a promising  
1453 molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Molecular*  
1454 *Medicine Reports*, 11(3), 1566-  
1455 1572. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2914>
- 1456 22. Loomis, C. L., & Alu, M. A. (2016, 16 diciembre). Experimental  
1457 Pathology Research Laboratory Division of Advanced Research



- 1458 Technologies: Detailed Discussion of Tissue Prep and  
1459 Formalin/Formaldehyde Fixation Recommendations: med.nyu.edu.
- 1460 23. Lu, X., Han, X., Meirovitch, Y., Sjöstedt, E., Schalek, R., &  
1461 Lichtman, J. W. (2023). Preserving extracellular space for high-  
1462 quality optical and ultrastructural studies of whole mammalian  
1463 brains. *Cell Reports Methods*, 3(7),  
1464 100520. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2023.100520>
- 1465 24. Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2018). An  
1466 introduction to the performance of immunohistochemistry.  
1467 In *Methods in molecular biology* (pp. 289-  
1468 298). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25)
- 1469 25. Mozel, S., & Arciszewski, M. B. (2022). Immunodetection of P2X2  
1470 receptor in enteric nervous system neurons of the small intestine of  
1471 pigs. *Animals*, 12(24), 3576. <https://doi.org/10.3390/ani12243576>
- 1472 26. Muñoz, D. R., De Almeida, M., Lopes, E. A., & Iwamura, E. S. M.  
1473 (1999). Potential definition of the time of death from autolytic  
1474 myocardial cells: *Forensic Science International*, 104(2-3), 81- 89.  
1475 [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(99\)00054-7](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(99)00054-7)
- 1476 27. Meng, H., Janssen, P. M. L., Grange, R. W., Yang, L., Beggs, A. H.,  
1477 Swanson, L. C., Cossette, S. A., Frase, A. R., Childers, M. K., Granzier, H.,  
1478 Gussoni, E., & Lawlor, M. W. (2014). Tissue triage and freezing for models of  
1479 skeletal muscle disease. *Journal of Visualized Experiments*, 89.  
1480 <https://doi.org/10.3791/51586>
- 1481 28. Michel, K., Kuch, B., Dengler, S., Demir, İ. E., Zeller, F., & Schemann,  
1482 M. (2022). How big is the little brain in the gut? Neuronal numbers in the  
1483 enteric nervous system of mice, guinea pig, and  
1484 human. *Neurogastroenterology and*



- 1485 Motility, 34(12). <https://doi.org/10.1111/nmo.14440>
- 1486 29. Miller-Rhodes, P. M. (2022, 14 septiembre). A Guide to Neuronal Cell  
1487 Markers. <https://www.biocompare.com/>. Recuperado 18 de enero de  
1488 2024, de [https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/589675-A-](https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/589675-A-Guide-to-Neuronal-Cell-Markers/)  
1489 [Guide-to-Neuronal-Cell-Markers/](https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/589675-A-Guide-to-Neuronal-Cell-Markers/)
- 1490 30. Miller, S. M. M., Sullivan, S. M. S., Ireland, Z. I., Chand, K. K. C.,  
1491 Colditz, P. B. C., & Bjorkman, S. T. B. (2016). Neonatal seizures are  
1492 associated with redistribution and loss of GABAA  $\alpha$ -subunits in the hypoxic-  
1493 ischaemic pig. *Journal of neurochemistry*, 139(3).  
1494 <https://doi.org/10.1111/jnc.13746>
- 1495 31. Musigazi, G. U., De Vleeschauwer, S., Sciot, R., Verbeken, E., &  
1496 Depreitere, B. (2018). Brain perfusion fixation in male pigs using a safer  
1497 closed system. *Laboratory Animals*, 52(4), 413-  
1498 417. <https://doi.org/10.1177/0023677217752747>
- 1499 32. Nithya, S., Sankarnarayanan, R., Hemalatha, V., & Sarumathi, T.  
1500 (2017). Immunofluorescence in oral lesions. *Journal of Oral and*  
1501 *Maxillofacial Pathology*, 21(3), 402.  
1502 [https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp\\_207\\_17](https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_207_17)
- 1503 33. Partida, C. M., & Walters, E. (2023). A novel immunohistochemical  
1504 protocol for paraffin embedded tissue sections  
1505 using free-floating techniques. *Frontiers in Neuroanatomy*, 17.  
1506 <https://doi.org/10.3389/fnana.2023.1154568>
- 1507 34. Pushie, M. J., Hollings, A., Reinhardt, J., Webb, S. M., Lam, V.,  
1508 Takechi, R., Mamo, J., Paterson, P. G., Kelly, M., George, G. N.,  
1509 Pickering, I. J., & Hackett, M. J. (2020). Sample preparation with  
1510 sucrose cryoprotection dramatically alters ZN distribution in the rodent  
1511 hippocampus, as revealed by elemental mapping. *Journal of Analytical*



- 1512 Atomic Spectrometry, 35(11), 2498- 2508.  
1513 <https://doi.org/10.1039/d0ja00323a>
- 1514 35.Parasuraman, S., & Christopher, P. V. (2022). Anesthesia and  
1515 euthanasia of experimental animals. En Introduction to Basics of  
1516 Pharmacology and Toxicology (pp. 65-75).  
1517 [https://doi.org/10.1007/978-981-19-5343-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-19-5343-9_5)
- 1518 36.Paran, T. S., Rolle, U., & Puri, P. (2009). Age-related changes in  
1519 the myenteric plexus of the porcine bowel. Journal of Pediatric  
1520 Surgery, 44(9), 1771-  
1521 1777. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2008.12.018>
- 1522 37.Ragauskas, T., Rysevaitė-Kyguolienė, K., Pauziene, N., Inokaitis,  
1523 H., & Dainius, P. H. (2022). Intrinsic cardiac neurons of the adult  
1524 pigs: chemical types, abundance, parameters and distribution  
1525 within ganglionated plexus. Annals of Anatomy - Anatomischer  
1526 Anzeiger, 243,151935. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2022.151935>
- 1527 38.Rieger, J., Pelckmann, L., & Drewes, B. (2020). Preservation and  
1528 processing of intestinal tissue for the assessment of  
1529 histopathology. En Methods in molecular biology (pp. 267-280).  
1530 [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1001-5\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1001-5_18)
- 1531 39.Rodríguez Quintana, L. P. R. Q., & Garzón Rozo, A. G.  
1532 R. (2021). Principios básicos en técnica histológica por  
1533 congelación para material obtenido en cirugía  
1534 micrográfica de mohs [Trabajo de grado]. Fundación Universitaria de  
1535 Ciencias de la Salud.
- 1536 40.Schwartz, P. H., Nethercott, H. E., Kirov, I. I., Ziaieian, B., Young,  
1537 M. J., & Klassen, H. (2005). Expression of neurodevelopmental  
1538 markers by cultured porcine neural precursor cells. Stem



- 1539 Cells, 23(9), 1286-1294. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004->  
1540 0306
- 1541 41. Segalés, J. S. (2001, septiembre). Enfoque del diagnóstico  
1542 laboratorial de la patología digestiva porcina a partir de la  
1543 necropsia. [portalveterinaria.com](http://portalveterinaria.com). Recuperado 14 de enero de  
1544 2024, de  
1545 <https://www.portalveterinaria.com/porcino/articulos/2791/enfoque->  
1546 [del- diagnostico-laboratorial-de-la-patologia-digestiva-porcina-a-](https://www.portalveterinaria.com/porcino/articulos/2791/enfoque-del-diagnostico-laboratorial-de-la-patologia-digestiva-porcina-a-partir-de-la-necropsia.html)  
1547 [partir-de-la- necropsia.html](https://www.portalveterinaria.com/porcino/articulos/2791/enfoque-del-diagnostico-laboratorial-de-la-patologia-digestiva-porcina-a-partir-de-la-necropsia.html)
- 1548 42. Suckow, M. A., Stevens, K. A., & Wilson, R. P. (2012). The  
1549 laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents.  
1550 Academic Press.
- 1551 43. Steu, S., Baucamp, M., Von Dach, G., Bawohl, M., Dettwiler, S.,  
1552 Storz, M., Moch, H., & Schraml, P. (2008). A procedure for tissue  
1553 freezing and processing applicable to both intra-operative frozen  
1554 section diagnosis and tissue banking in surgical pathology.  
1555 *Virchows Archiv*, 452(3), 305-  
1556 312. <https://doi.org/10.1007/s00428-008-0584-y>
- 1557 44. Spiga, S., Acquas, E., Puddu, M., Mulas, G., Lintas, A., & Diana,  
1558 M. (2011). Simultaneous Golgi-Cox and immunofluorescence using  
1559 confocal microscopy. *Brain Structure & Function*,  
1560 216(3), 171-182. <https://doi.org/10.1007/s00429-011-0312-2>
- 1561 45. Suvarna, K. S., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2012). Bancroft's  
1562 Theory and Practice of Histological Techniques E-Book. Elsevier  
1563 Health Sciences.
- 1564 46. Swier, V. J., White, K. A., Meyerholz, D. K., Chefdeville, A.,

- 1565 Khanna, R., Sieren, J. C., Quelle, D. E., & Weimer, J. M. (2020).  
1566 Validating indicators of CNS disorders in a Swine model of  
1567 neurological disease. PLOS ONE, 15(2),  
1568 e0228222. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228222>
- 1569 47. Tanaka, A., Watanabe, Y., Kato, H., & Araki, T. (2007).  
1570 Immunohistochemical changes related to ageing in the mouse  
1571 hippocampus and subventricular zone. *Mechanisms of Ageing and  
1572 Development*, 128(4), 303-310.  
1573 <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.01.002>
- 1574 48. Viel, T., Toricelli, M., Pereira, A. R., Abrao, G. S., Malerba, H., Maia, J.,  
1575 & Buck, H. (2021). Mechanisms of neuroplasticity and brain  
1576 degeneration: strategies for protection during the aging process. *Neural  
1577 Regeneration Research/Neural Regeneration Research*, 16(1), 58.  
1578 <https://doi.org/10.4103/1673-5374.286952>
- 1579 49. Wixey, J. A., Lee, K. M., Miller, S. M., Goasdoué, K., Colditz, P. B.,  
1580 Björkman, S. T., & Chand, K. K. (2019). Neuropathology in intrauterine growth  
1581 restricted newborn piglets is associated with glial activation and  
1582 proinflammatory status in the brain. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1).  
1583 <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1392-1>
- 1584 50. Zacharko-Siembida, A., Piedra, J. V., Szymańczyk, S., &  
1585 Arciszewski, M. B. (2013). Immunolocalization of NOS, VIP, galanin  
1586 and SP in the small intestine of suckling pigs treated with red kidney  
1587 bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin. *Acta Histochemica*, 115(3), 219-  
1588 225. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.06.010>
- 1589 51. Wenzlow, N., Neal, D., Stern, A. W., Prakoso, D., Liu, J. J.,  
1590 Delcambre, G. H., Beachboard, S., & Long, M. T. (2021).



- 1591 Feasibility of using tissue autolysis to estimate the postmortem  
1592 interval in horses. Journal of Veterinary Diagnostic  
1593 Investigation, 33(5), 825-  
1594 833. <https://doi.org/10.1177/10406387211021>
- 1595
- 1596



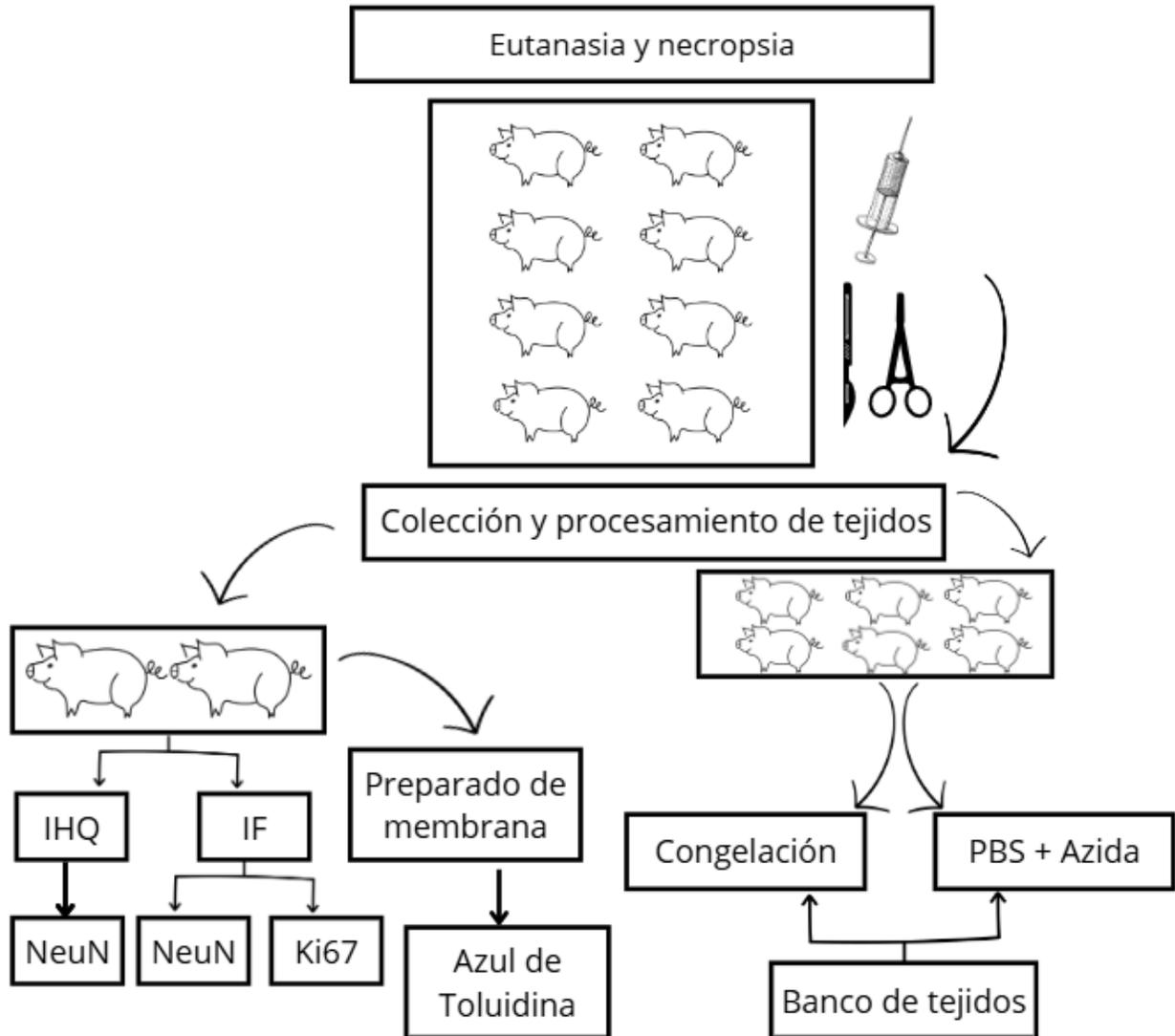
1597 **Capítulo 3. Metodología para el desarrollo de los objetivos específicos.**  
1598 **Resultados y discusión.**

1599

1600 **Diseño metodológico**

1601 Este diseño consta de ocho individuos de la especie porcina cruce  
1602 comercial (C29 x PIC 410), en la etapa productiva de precebo (entre los  
1603 30 a 35 días de edad) a los cuales se les aplicó el protocolo de eutanasia  
1604 y necropsia dirigida al sistema digestivo. Así mismo, se recolectaron  
1605 fragmentos de íleon de los ocho individuos. De estos, se seleccionaron  
1606 dos para la estandarización de las técnicas de inmunohistoquímica y  
1607 preparado de membrana, la mitad de los tejidos de los cuatro individuos  
1608 restantes se conservan en congelación y la otra mitad en solución Buffer  
1609 de PBS + Azida 0.1% y se catalogaron como banco de tejidos, el cual  
1610 queda disponible para la estandarización de nuevos inmunomarcadores  
1611 (Figura 4).

1612



1613

1614 **Figura 4** Diseño metodológico para el muestreo. Se seleccionaron 8 individuos de los cuales dos se  
 1615 utilizaron para la estandarización de técnicas inmunohistoquímicas. Adicionalmente algunos de los tejidos  
 1616 se usaron para una técnica novedosa llamada preparado de membrana que permite la exposición completa  
 1617 del plexo mientérico. Los tejidos de los seis individuos restantes reposan en un banco de tejidos, donde  
 1618 unos están en congelación y otros en refrigeración con PBS + Azida 0,1%.

1619

1620

1621

1622

1623 **Comité de ética**

1624

1625 Este diseño fue presentado al CICUA (comité para el cuidado y uso de  
1626 animales) de la Universidad Visión de las Américas, quienes otorgaron su  
1627 aval en el acta número 51 del año 2022.

1628

1629

1630 **Eutanasia y necropsia**

1631

1632 Para la eutanasia se utilizó como anestésicos una combinación de  
1633 agentes sedantes y disociativos como lo son la azaperona (2mg/kg) y la  
1634 ketamina (4,4mg/kg), ambos de aplicación intramuscular (IM). El agente  
1635 eutanásico utilizado para este protocolo fue el pentobarbital sódico y  
1636 Difenilhidantoína sódica (Euthanex), la dosis de elección para este  
1637 protocolo fue de 78 mg/kg y la vía de administración fue intracardiaca con  
1638 el animal en decúbito lateral izquierdo, procurando ubicar el punto de  
1639 mayor intensidad entre el tercer y quinto espacio intercostal. La duración  
1640 del protocolo es de aproximadamente 10 minutos, conservando un  
1641 margen de 5 a 8 minutos para producir la sedación e insensibilización  
1642 completa y un minuto máximo entre la aplicación del barbitúrico y la  
1643 muerte del individuo. Durante todo el protocolo se realiza monitorización  
1644 constante de los signos vitales y la presencia de reflejos de dolor tanto  
1645 superficiales como profundos.



1646

1647 La técnica de necropsia utilizada, se realizó por estaciones de trabajo. En  
1648 una de ellas se hacía necropsia dirigida únicamente al sistema digestivo.  
1649 Para el caso de este trabajo se utilizó una técnica de necropsia dirigida al  
1650 sistema digestivo procurando no sobrepasar los 15 minutos posterior a la  
1651 muerte del animal.

1652 Para el abordaje del sistema digestivo, se posiciona al individuo en  
1653 decúbito dorsal y se realiza una incisión en los pliegues axilares e  
1654 inguinales y se desarticula la cabeza del fémur, posteriormente se incide  
1655 la piel por la línea alba desde el mentón hasta el esfínter anal y se  
1656 disecciona toda la musculatura abdominal, esto permite la observación  
1657 del peritoneo, el cual se incide de caudal a craneal por la línea media  
1658 hasta observar las vísceras abdominales; allí se ubica anatómicamente el  
1659 esófago en su porción más caudal y se anuda con nylon o material de  
1660 sutura, así como la porción más caudal del recto y de igual manera se  
1661 anuda para separarlas de la carcasa. Una vez expuestas se localiza el  
1662 ciego y el esfínter ileocecal que corresponde a la unión con el intestino  
1663 delgado y específicamente la porción de interés que es el íleon y se  
1664 anuda en esa ubicación, luego se evalúa el fragmento hacía craneal  
1665 hasta donde sea evidente la membrana ileocecal que determina la  
1666 separación de este fragmento con el yeyuno y se realiza un corte con  
1667 tijeras de tejido. El protocolo de necropsia se adoptó con algunas  
1668 modificaciones del propuesto por De Las Heras Guillamón y De Jalón  
1669 (2008) en su libro guía. (Ver Manual de procedimientos para revisar el  
1670 protocolo con más detalles).

1671



1672 **Toma de muestras**

1673

1674           Para este trabajo se utilizó una técnica de toma de muestras adaptada a  
1675           la descrita por Itzá-Ortíz et al. (2018). La cual consiste en instilar solución  
1676           salina en la luz del fragmento y posteriormente anudar un extremo,  
1677           aplicar solución fijadora, anudar el otro extremo y sumergir por completo  
1678           el fragmento en la misma solución (Figura 5).

1679



1680

1681

1682 *Figura 5 - Toma y manipulación de muestras obtenidas del sistema digestivo. A. Separación del íleon de*  
1683 *todo el paquete visceral digestivo. B. Lavado con agua destilada de los fragmentos de íleon muestreados. C.*  
1684 *Medición de los fragmentos de íleon obtenidos. D. Instilación de solución fijadora PFA 4% en la luz de los*  
1685 *fragmentos obtenidos del íleon. E. Fragmentos de íleon anudados en cada extremo con solución fijadora en su*  
1686 *interior. F. Inmersión de fragmentos anudados en frascos con PFA 4%.*

1687 **Fijación y congelación de muestras**

1688

1689 El protocolo de fijación utilizado en este trabajo consistió en realizar cuatro  
1690 cambios de la solución fijadora. Para ello se utilizó PFA al 4%, el cual se  
1691 preparó como se relata en el manual de procedimientos adjunto, previos  
1692 al muestreo y se conservó en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los cambios se  
1693 realizaron de la siguiente manera, el primero a las 48 horas y luego cada  
1694 24 horas hasta completar 120 horas. Para este procedimiento se sacaba  
1695 el tejido del frasco, se desechaba la solución y se llenaba con PFA  
1696 nuevo, almacenado en congelación a  $-20$  grados y atemperado previo a  
1697 su uso (figura 5). Durante este proceso el frasco con el fijador y los tejidos se  
1698 mantienen a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ .

1699

1700

1701

1702

1703



1704

Figura 6 - Cambios de PFA cada 24 horas hasta completar 96 horas.

1705

1706

1707

1708

1709

De acuerdo a lo anterior, una vez cumplidas las 120 horas en PFA se  
procede al gradiente de sacarosa, el cual consiste en sumergir el tejido  
en una solución azucarada en agitación; y mínimo cada 24 horas o  
hasta que se hundan los

1710 fragmentos, se incrementa el porcentaje de sacarosa iniciando en 7%, luego 25% y  
1711 finaliza al 30% (Figura 6).



**Figura 7** - Gradiente de sacarosa al 7%, 25% y 30%, incrementando su porcentaje cada 24 horas. En la parte superior se observa el primer gradiente de sacarosa. Este gradiente consiste en sumergir los tejidos en una solución saturada de sacarosa a diferentes concentraciones, la primera al 7%, la segunda al 25% y la tercera al 30%, el cambio de solución se da cada 24 horas, los tejidos inicialmente flotan en la solución y una vez saturados por la sacarosa se precipitan al fondo del frasco.



1731

1732

Una vez se recuperan los tejidos del gradiente se procede con el proceso de congelación, el cual se realiza con una solución crio preservante llamada isopentano. Esta sustancia debe ser enfriada previamente con hielo seco o nitrógeno líquido, los fragmentos de interés se sumergen en este medio y posteriormente se almacenan a -20 grados.

1733

1734

1735

1736

1737

1738

### **Procesamiento con técnicas de inmunohistoquímica**

1739

1740

Los cortes de tejido en criostato por lo general son entre 5  $\mu\text{m}$  a 30  $\mu\text{m}$ , sin embargo, para el caso de este trabajo, los cortes se realizaron a 50  $\mu\text{m}$  teniendo en cuenta la fragilidad del tejido.

1741

1742

1743

Los fragmentos de tejido utilizados fueron de 1 cm de diámetro, por lo tanto, de cada fragmento se podrían obtener hasta 200 cortes. Sin embargo, para este trabajo se utilizaron en promedio 20 cortes.

1744

1745

1746

Para iniciar el proceso de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia se realizó un diseño en placas *multiwell* de la siguiente manera (Figura 8):

1747

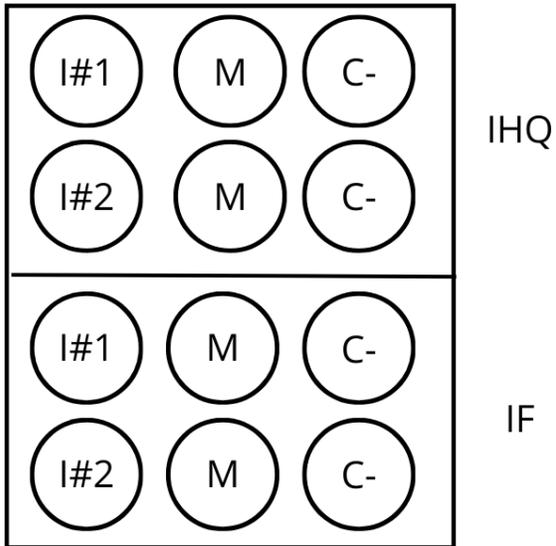


Figura 8 - Diseño de la placa Multiwell para el procesamiento de IHQ e IF.

1748

1749

1750

1751

1752

1753



1754 En este diseño se eligió una placa *Multiwell* de doce pozos y se destinaron los  
1755 pozos superiores para el procesamiento de IHQ y los seis pozos inferiores  
1756 para el procesamiento de IF. Los pozos marcados como I#1 hacen referencia  
1757 al fragmento de íleon del individuo número 1, los pozos marcados como I#2  
1758 contienen fragmentos de íleon del individuo número 2; los pozos marcados  
1759 como M contienen los fragmentos del preparado de membrana y los últimos  
1760 pozos que están marcados como C- se refieren a los controles negativos.  
1761 Estos últimos son parte fundamental del diseño, ya que sin ellos este carece  
1762 de validez y reproducibilidad (Hewitt et al., 2014). Estos controles negativos  
1763 consisten en la aplicación del anticuerpo secundario con la solución de  
1764 incubación.

1765

1766 Los anticuerpos utilizados en esta ocasión fueron Anti NeuN monoclonal  
1767 de la casa comercial Abcam clon EPR12763 (ab177487) 1:500 como  
1768 marcador de neuronas maduras (Tanaka et al., 2007). Así como el  
1769 Anticuerpo Ki67 Policlonal de la casa comercial Abcam clon SP6  
1770 (ab16667) 1:500 como marcador de proliferación celular (Krishnan et al.,  
1771 2022).

1772 El protocolo para la IF inicia con la incubación en cloruro de amonio  
1773 (NH<sub>4</sub>CL). Posteriormente se realizan tres lavados con PB 0.1M Se  
1774 continua con la preincubación con solución tampón fosfato (PB) 0.1M,  
1775 0,3% TRITON x-100, 1% BSA, luego se incuba con el anticuerpo primario  
1776 a una concentración de 1:500 tanto para NeuN como Ki67,  
1777 posteriormente se aplica el anticuerpo secundario a una concentración de  
1778 1:700 y se adiciona el colorante fluorescente de ADN Hoechst en una  
1779 relación de 1:10000. Para el montaje se seleccionan láminas  
1780 gelatinizadas donde se posicionan los tejidos con ayuda de un pincel y se  
1781 sellan con laminillas cobre objetos y gel Mount®.

1782

1783 **Preparado de membrana**

1784

1785 Para este trabajo se realizaron varios ensayos (cinco en total) en los  
1786 cuales se quería encontrar la manera más efectiva de realizar una  
1787 disección de la túnica muscular longitudinal externa, sobre la cual reposa  
1788 el plexo mientérico. Para ello se utilizaron primero tejidos de prueba de  
1789 individuos que anteriormente habían ingresado al servicio de necropsia  
1790 del Laboratorio de Patología Animal de la Universidad de Antioquia, y a  
1791 los cuales se les aplicó la misma técnica de muestreo previamente  
1792 relatada. Adicionalmente se utilizó un estereomicroscopio Carl Zeiss DV4  
1793 con luz LED y un kit de disección de entomología con pinzas rectas y  
1794 curvas de microdisección. Para el abordaje se inicia la disección por la  
1795 capa más externa del fragmento, es decir la serosa, una vez retirada por  
1796 completo se presiona el fragmento contra la mucosa y se observará  
1797 como la túnica muscular se arruga en el eje longitudinal, allí se pellizca  
1798 con una pinza uno de los extremos del fragmento donde se observará la  
1799 separación entre ambas túnicas musculares y se empieza a halar  
1800 lentamente hacia arriba la túnica más externa separándose del resto del  
1801 fragmento (Ver anexo).

1802

1803 **Resultados**

1804

1805 **Estandarización de la técnica de fijación por inmersión**

1806

1807 En este trabajo se obtuvieron muestras de muy buena calidad histológica  
1808 con el protocolo de muestreo y fijación implementado. Esto se determinó  
1809 por la ausencia de cambios *post mortem* en el tejido evaluado. Utilizar  
1810 este protocolo respetando los tiempos de muestreo, la manipulación de  
1811 los tejidos y la fijación utilizada demostró ser fundamental para garantizar  
1812 la integridad y calidad de las muestras obtenidas, esto permite un análisis  
1813 preciso y fiable en investigaciones posteriores, tanto histológicas como  
1814 morfométricas.

1815 En la figura 9 se presenta las muestras obtenidas, en ellas se puede apreciar  
1816 la integridad de los componentes tisulares, el adecuado contraste entre  
1817 núcleos y citoplasmas y la ausencia de contaminación bacteriana. En la figura  
1818 9 se resalta de igual manera la integridad de los componentes del plexo  
1819 mientérico (especialmente neuronas).

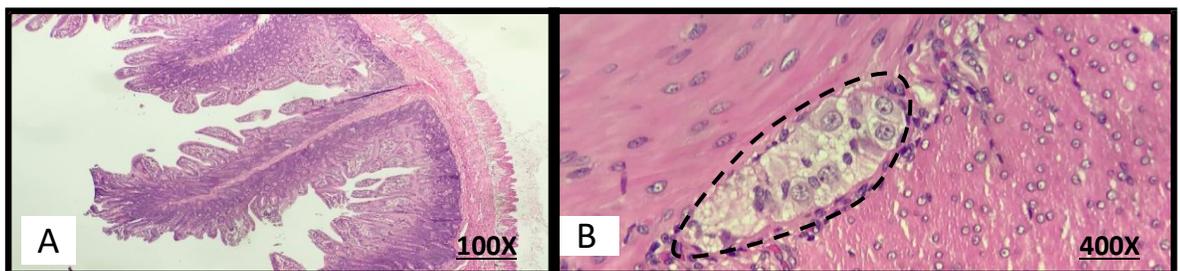


Figura 9 - Imágenes histológicas del íleon porcino con coloración H&E. A. Porción del íleon con todas sus capas histológicas (mucosa a serosa, de izquierda a derecha) con aumento de 100X en microscopio Olympus CX43. B. Ganglio del plexo mientérico (ovalado con línea punteada) donde se observan núcleos y cuerpos neuronales con aumento de 400X en microscopio Olympus CX43.

1820 **Estandarización de técnicas de inmunohistoquímica**

1821

1822 Con respecto a estos resultados es importante aclarar que la  
1823 inmunohistoquímica engloba ambos inmunoensayos, el ensayo con  
1824 fluorocromos conocido como inmunofluorescencia (IF) y otro con el  
1825 complejo avidina-biotina (ABC).

1826 Con la técnica de inmunofluorescencia se obtuvieron imágenes con una  
1827 calidad de marcación óptima y aceptable para análisis, observando una  
1828 mínima cantidad de interferencias. Esto se logró con la técnica de fijación  
1829 por inmersión y el protocolo de Inmunofluorescencia previamente  
1830 descrito. La meticulosa aplicación de este protocolo como se expuso  
1831 previamente logró preservar la integridad estructural de las muestras, lo  
1832 que permite la correcta interacción antígeno- anticuerpo para así evitar  
1833 señales fluorescentes equivocadas, auto fluorescencia o excesivo ruido  
1834 de fondo.

1835 En la figura 10 se puede apreciar un preparado de inmunofluorescencia  
1836 correspondiente a un fragmento obtenido del íleon de un porcino. Allí se  
1837 muestra en el lado izquierdo (A) el control negativo, en él se observan núcleos  
1838 azules inmunomarcados con la tinción fluorescente de ADN Hoechst  
1839 (Bucevičius et al., 2018); y en el lado derecho (B) corresponde al arreglo de  
1840 inmunofluorescencia con los dos marcadores utilizados (comarcaje) NeuN y  
1841 Ki67. Es importante resaltar de estas imágenes que se observa escaso “ruido  
1842 de fondo” o interferencias y los componentes celulares se pueden evaluar sin  
1843 ningún inconveniente. La imagen B hace referencia a la lámina propia del  
1844 tejido, indicando la presencia de células NeuN positivas, así como Ki67  
1845 positivas, éstas últimas asociadas a las células epiteliales glandulares.

1846

1847

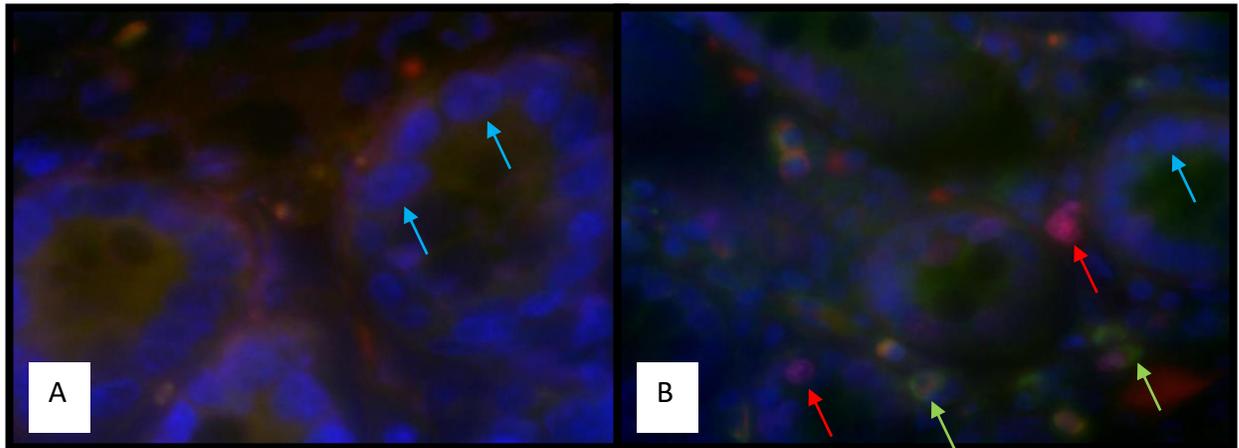
1848

1849

1850

1851

1852



1853

1854

1855

1856

1857

1858

1859

1860

1861

1862

1863

1864

1865

1866

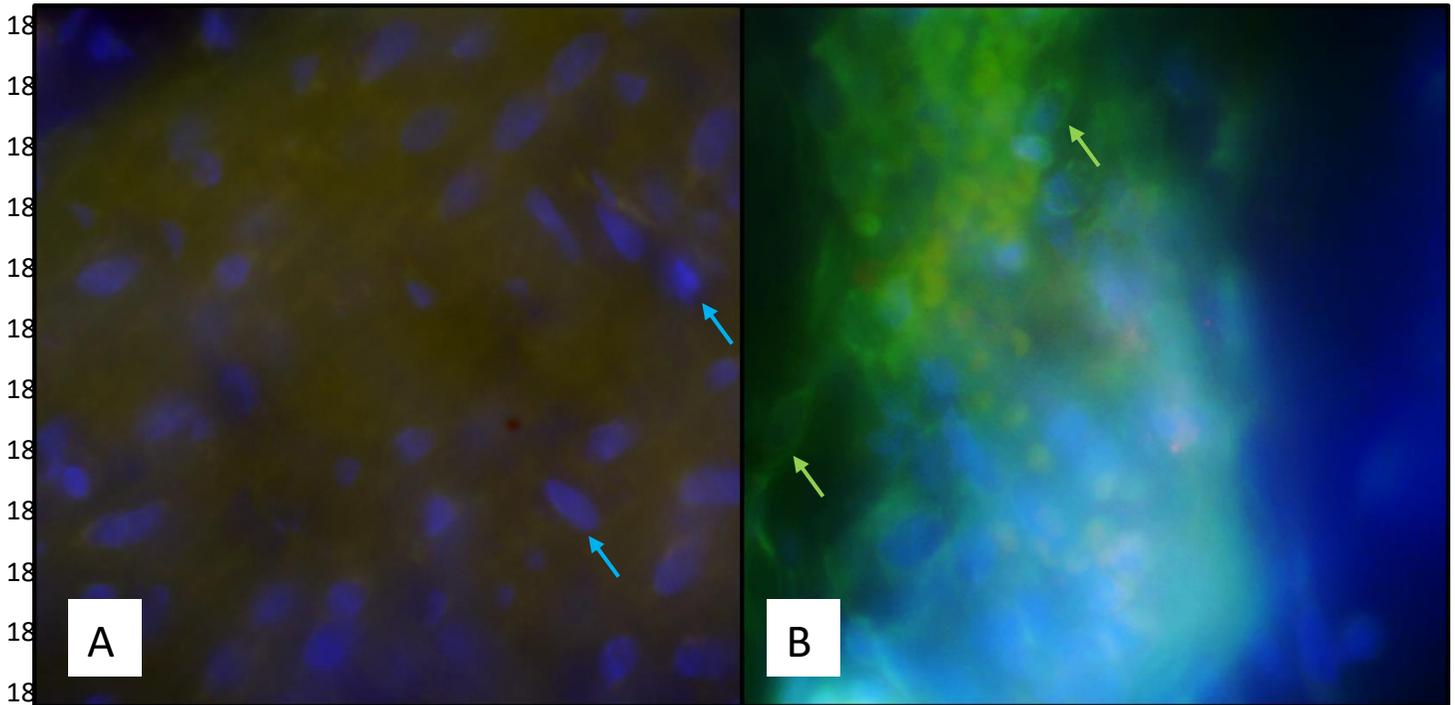
1867

1868

1869

Figura 10 - Imagen del revelado inmunofluorescente 600X. La imagen marcada como A corresponde al control negativo del arreglo de marcadores con núcleos teñidos con el colorante Hoechst azul (flechas azules). La imagen marcada con B corresponde a la unión (merge) de los tres filtros de color del preparado de inmunofluorescencia con los marcadores NeuN1 (verde, flechas verdes) y Ki67 (rojo, flechas rojas).

La figura 11 está contextualizada en el plexo mientérico y en ella se ilustra en el lado izquierdo (A) el control de este arreglo y en el lado derecho (B) comarcaje de NeuN y Ki67, con células NeuN positivas que se reconocen por el color verde en sus citoplasmas (flechas verdes), en este arreglo no se observó marcación positiva para Ki67.



1884  
1885  
1886  
1887  
1888  
1889  
1890  
1891  
1892  
1893  
1894  
1895  
1896

Figura 11 - Arreglo inmunofluorescente 600X. En la figura A. Control plexo mientérico, núcleos marcados con Hoechst (flechas azules). Figura B. Plexo mientérico comarcaje NeuN (verde) y Ki67 (rojo). En esta imagen solo se observa positividad para NeuN, esta se expresa en el citoplasma de las células presentes en el tejido.

1884

1885 Con la técnica de inmunohistoquímica se realizaron dos ensayos, uno  
1886 con tejidos de 30 um de grosor y otra con tejidos de 50 um de grosor.  
1887 Para ambos ensayos se utilizaron los marcadores Ki67 y NeuN1. Sin  
1888 embargo, no se logró una marcación satisfactoria ya que al observar las  
1889 placas con el microscopio óptico no se evidenció marcación positiva a los  
1890 anticuerpos empleados. Con los fragmentos de tejido a 30 um de espesor,  
1891 los tejidos exhibían rasgaduras y en algunas áreas estaban sobrepuestos,  
1892 faltando algunos de sus componentes, entre ellos fragmentos de las  
1893 tónicas musculares. Esto último limita en gran medida la interpretación ya  
1894 que el tejido disponible para evaluar es muy escaso. En estos ensayos se  
1895 incluyó un control positivo y uno negativo utilizando el tejido del  
1896 hipocampo de los mismos individuos.

1897

1898 **Preparado de membrana**

1899

1900 Los componentes del plexo mientérico (neuronas y células gliales)  
1901 pueden ser evaluados bien sea en fragmentos sumergidos en bloques de  
1902 parafina o en preparados completos o “preparado de membrana” como  
1903 se ha denominado. La estandarización de esta técnica se sometió a  
1904 coloración con azul de toluidina para evaluar la correcta exposición del  
1905 plexo mientérico y se realizó un registro fotográfico que expuso los  
1906 cuerpos neuronales dispuestos en ganglios. En la figura 12 se observa  
1907 una fotografía de un preparado de membrana con la coloración de azul  
1908 de toluidina visualizada en un microscopio Olympus CX33 en un aumento  
1909 de 400X. De derecha a izquierda se observa como con cada ensayo se  
1910 logra exponer mucho mejor los cuerpos neuronales (flechas blancas).

1911

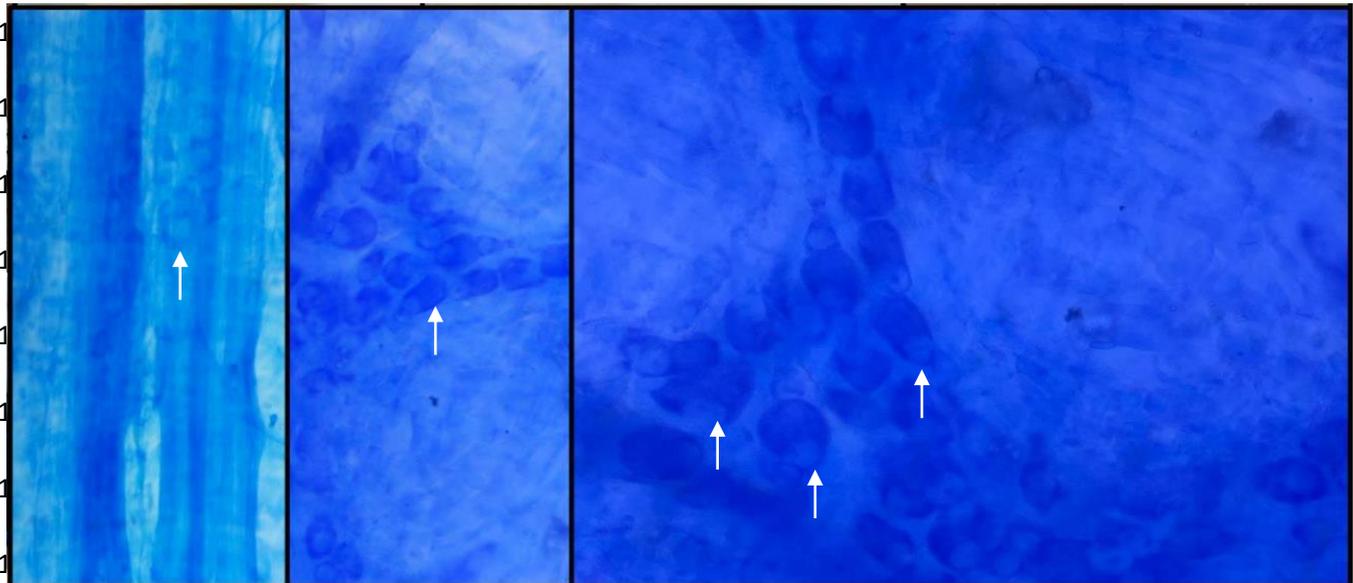


Figura 12 - Preparado de membrana con azul de toluidina, microscopio Olympus CX33 400X. Cuerpos neuronales (flechas blancas)



1921

1922

**Productos adicionales**

1923

1924

1925

1926

1927

1928

1929

1930

1931

1932

1933

1934

1935

1936

1937

Gracias al muestreo realizado para este trabajo se logró generar un banco de tejidos, de los cuales unos fragmentos se encuentran preservados en congelación y otros se encuentran en una solución de PB + Azida 1%, esta última se utiliza para garantizar su adecuado almacenamiento y evitar su contaminación. Todo el diseño metodológico en cuestión de protocolos y aplicación de técnicas servirá de insumo para algunos de los objetivos del proyecto que se plantea en el marco de la convocatoria 890 de Min ciencias con código de registro 82501 titulado: "Efecto del enriquecimiento sensorial, con estímulos musicales sobre respuestas emocionales, fisiológicas, neuroendocrinas y bienestar en cerdos en producción". De igual manera servirá para futuras investigaciones que quieran replicar estas evaluaciones en porcinos con otros enfoques.

.

1938 **Discusión**

1939 **Fijación por inmersión**

1940 Para este trabajo se había planteado en el objetivo específico número  
1941 uno, estandarizar la técnica de fijación por inmersión. El planteamiento de  
1942 este objetivo nació de una dificultad metodológica que surgió cuando se  
1943 decidió hacer la evaluación de los componentes celulares del plexo  
1944 mientérico mediante métodos inmunohistoquímicos.

1945 Teniendo en cuenta la información recolectada en este trabajo y  
1946 contrastándola con la investigación de Kasukurthi et al. (2009) es posible  
1947 reconocer la técnica de fijación por inmersión como válida para la  
1948 evaluación de componentes del plexo mientérico en porcinos con  
1949 técnicas histológicas e inmunohistoquímicas, superando así la dificultad  
1950 metodológica previamente expuesta

1951 Si bien el método de fijación por perfusión es el más recomendado para  
1952 obtener una buena calidad de muestra con el mínimo de alteraciones  
1953 (Piña et al., 2022), autores como Kasukurthi et al. (2009) han demostrado  
1954 en investigaciones previas que no existen diferencias histológicas o  
1955 morfométricas significativas entre ambos métodos.

1956 Realizando una comparación entre ambas técnicas se pudo identificar  
1957 diferentes puntos que favorecen el uso de la técnica de fijación por  
1958 inmersión, no solo por las características de los tejidos sometidos a esta  
1959 técnica, sino también por las condiciones de seguridad al manipular este  
1960 tipo de reactivos en los que se ha reportado un potencial cancerígeno  
1961 (Duarte, 2015). Para ello se realizó un cuadro comparativo que expone y  
1962 compara el método de perfusión y el método de inmersión (Tabla 3).



1963

1964

1965 *Tabla 3* - Tabla comparativa del método de fijación por perfusión e inmersión

1966

<b>MÉTODOS DE FIJACIÓN</b>	
<b>PERFUSIÓN TRANSCRANEAL</b>	<b>FIJACIÓN POR INMERSIÓN</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Personal especializado, condiciones de quitófano</li><li>• Altas cantidades de solución fijadora. hasta 1,5 l/kg en mamíferos pequeños y 4l/kg en mamíferos grandes</li><li>• Costos elevados por la alta cantidad de insumos</li><li>• Mayor riesgo de exposición a soluciones con potencial cancerígeno, así como mayor contaminación química</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Condiciones de muestreo más flexibles</li><li>• Menor cantidad de solución fijadora 1,5 litros por individuo</li><li>• Menores costos relacionados con el personal , los insumos y las instalaciones</li><li>• Manipulación de la solución fijadores en cámaras con extracción de gases, menor riesgo de contaminación química</li></ul>

1967

1968 **Estandarización de técnicas de inmunohistoquímica**

1969

1970 La inmunopositividad con la técnica de inmunofluorescencia observada  
1971 con el clon EPR12763 del marcador NeuN en porcinos para la evaluación  
1972 del plexo mientérico representa un avance significativo en la  
1973 caracterización celular de dicha región anatómica y contribuye al soporte  
1974 bibliográfico que utilizan las casas comerciales para ampliar o favorecer el  
1975 uso de un anticuerpo en diferentes especies. Sobre todo, si se considera  
1976 la escasa información en la literatura sobre el uso de este clon como  
1977 marcador de neuronas maduras (Wixey et al., 2019) (Zacharko-Siembida  
1978 et al., 2013) (Miller et al., 2016).

1979 En el plexo mientérico de los tejidos evaluados se observó marcación  
1980 citoplasmática positiva a NeuN1, el cual es un marcador de neuronas  
1981 maduras para el que se ha reportado un patrón principalmente nuclear.  
1982 Sin embargo, es importante tener en cuenta que la mayoría de las  
1983 descripciones de la positividad de estos marcadores se centran en el SNC  
1984 y poco se ha descrito sobre la inmunoreactividad en el sistema nervioso  
1985 periférico. A pesar de esto, existen algunas descripciones como las de  
1986 Gershon y Margolis (2021) y Van Nassauw et al. (2005) en las que se  
1987 reporta la expresión citoplasmática de esta estirpe celular tanto en SNC  
1988 como en SNP. Se ha debatido la presencia de dos isoformas de la  
1989 proteína NeuN (46 y 48 kDa), predominando la isoforma 46 kDa en el  
1990 núcleo y la isoforma 48 kDa presente a nivel citoplasmático (Gusel'nikova  
1991 & Korzhevskiy, 2015). Autores como Van Nassauw et al. (2005)  
1992 relacionan el patrón de marcación citoplasmático a NeuN1 en neuronas  
1993 del tracto gastrointestinal de conejillos de indias, con neuronas aferentes  
1994 primarias intrínsecas, las cuales comprenden un grupo importante de  
1995 neuronas mecano-sensoriales para el control neural primario de la



1996 motilidad gastrointestinal y de igual manera responden a cambios en el  
1997 contenido químico de la luz intestinal, y a la tensión de la pared intestinal  
1998 (Liao et al., 2020).

1999 La ausencia de registros previos del empleo del marcador NeuN en el  
2000 plexo mientérico en la especie porcina resaltaba la necesidad de explorar  
2001 y validar su utilidad en este contexto particular. La detección de  
2002 inmunopositividad en el tejido porcino proporciona una valiosa  
2003 herramienta para futuras investigaciones que busquen entender con  
2004 mayor precisión la composición celular del plexo mientérico en esta  
2005 especie. Este hallazgo no solo amplía el repertorio de marcadores  
2006 disponibles para estudios específicos en porcinos, sino que también  
2007 contribuye a la estandarización de técnicas inmunohistoquímicas  
2008 aplicadas a la evaluación del sistema nervioso entérico en esta especie.

2009 Es importante destacar que la incorporación del marcador NeuN en  
2010 porcinos abre nuevas perspectivas para investigaciones funcionales y  
2011 comparativas, permitiendo una mejor comprensión de las características  
2012 neurales en el contexto del sistema digestivo de esta especie. Estos  
2013 resultados tienen implicaciones prácticas relevantes en campos como la  
2014 biomedicina y la producción animal, teniendo en cuenta la importancia del  
2015 SNE en la salud intestinal y la salud en general.

2016 De igual manera, es importante resaltar que como resultado adicional se  
2017 observaron células NeuN positivas en la lámina propia. En esta ubicación  
2018 histológica específica, solo han sido reportadas células gliales  
2019 (Kabouridis et al., 2015) (Liu & Yang, 2022). Este hallazgo se puede  
2020 contrastar con lo relatado por Гусельникова y Korzhevskiy (2015),  
2021 quienes aseguran que este marcador no es expresado únicamente por  
2022 neuronas y que se han visto células positivas a Proteína Ácida Fibrilar  
2023 Glial (GFAP), una proteína específica de células de la astrogliá, lo que



2024 puede sugerir que esta población NeuN positiva en dicha ubicación  
2025 histológica pertenece a una población de células gliales de la mucosa.  
2026 Por otra parte, autores como De Ceglia et al. (2023) han reportado  
2027 astrocitos con expresión de maquinaria de tipo sináptico, lo que sugiere  
2028 una población celular “hibrida”. Sin embargo, todas estas son posibles  
2029 hipótesis que requieren un abordaje amplio en términos de realizar nuevos  
2030 arreglos inmunofluorescentes con otros marcadores como GFAP para  
2031 confirmar su estirpe de células gliales o complementar con otros  
2032 marcadores que permitan realizar una aproximación a su origen.

2033 Con respecto al marcador Ki67, con la técnica de IF se observaron  
2034 células positivas asociadas a la mucosa (lámina propia y glándulas) de  
2035 los fragmentos de íleon evaluados. Este hallazgo y en concordancia con  
2036 la literatura puede ser interpretado como procesos proliferativos  
2037 asociados a la lámina epitelial. En el intestino delgado, la lámina epitelial  
2038 se renueva constantemente y para ello existe un compartimiento con  
2039 células madre intestinales que se duplican produciendo una población  
2040 transitoria de células progenitoras. Estas células se encuentran en unas  
2041 invaginaciones del epitelio conocidas como criptas de Lieberkuhn y  
2042 migran de manera ascendente hacia el epitelio superficial  
2043 diferenciándose en células caliciformes, endocrinas y enterocitos (Rao &  
2044 Wang, 2011) (Kong et al., 2018). En este sentido, son células  
2045 metabólicamente activas que pueden encontrarse en diferentes estadios  
2046 de proliferación y por lo tanto pueden expresar marcación positiva a Ki67,  
2047 tal como se observó en este estudio. Sin embargo, en el plexo mientérico  
2048 en particular no se observaron células positivas a Ki67 o comarcadas con  
2049 Ki67 y NeuN1. De esta observación, se podría considerar que las células  
2050 evaluadas podrían encontrarse en una fase G0, G1 e incluso en una  
2051 transición entre la fase G1 y la fase S del ciclo celular, teniendo en



2052 cuenta las observaciones realizadas por Miller et al. (2018). La fase G0 o  
2053 GAP 0 del ciclo celular es un estadio en el que las células no sintetizan  
2054 ADN ni realizan división celular, aunque siguen desempeñando diversas  
2055 funciones relacionadas con su metabolismo (Stallaert et al., 2022). A este  
2056 ciclo en particular, históricamente se le ha atribuido la ausencia de  
2057 inmunoreactividad al anticuerpo Ki67. Sin embargo, autores como Miller  
2058 et al. (2018) y Uxa et al. (2021) han demostrado que células en fase G1 o  
2059 en la transición de G1 a S pueden no expresar o expresar débilmente  
2060 inmunoreactividad a Ki67, teniendo en cuenta que esta proteína se  
2061 degrada continuamente durante las fases G0 y G1 y que en la transición  
2062 a S están presentes en niveles mínimos, además proponen una variación  
2063 y es que en algunas células en las que el periodo de inactividad o fase  
2064 G0 fue muy prolongado, esta proteína puede ser indetectable.

2065 La ausencia de marcación para la técnica de inmunohistoquímica con el  
2066 complejo ABC se constató comparando los fragmentos de estudio con los  
2067 controles usados. El protocolo utilizado en este caso, como ya se ha  
2068 explicado, consistió en sumergir los tejidos congelados en las soluciones  
2069 incubadoras y en los anticuerpos. Sin embargo, existe otra técnica que  
2070 utiliza tejido embebidos en parafina y por lo general se usa una tinción  
2071 contraste de hematoxilina que tiñe los núcleos. Ante la ausencia de  
2072 positividad en los tejidos congelados se han iniciado una serie de  
2073 ensayos con los tejidos preservados en PB+ Azida al 1%, incluyéndolos  
2074 en parafina y aplicando el método convencional de IHQ con el contraste  
2075 de hematoxilina. A la fecha se han realizado tres ensayos con los  
2076 anticuerpos S100, HuC/HuD y Ki67 en diferentes concentraciones para  
2077 identificar en cual de ellos se obtiene una intensidad de marcación  
2078 adecuada. Estas observaciones se utilizarán para futuras  
2079 investigaciones.

2080 **Preparado de membrana en tejidos de la especie porcina**

2081

2082 La estandarización del preparado de membrana en tejidos de íleon en  
2083 porcinos constituye un logro significativo en el marco de esta  
2084 investigación. Primero porque las descripciones disponibles hasta ahora  
2085 en la literatura se centran en murinos, mientras que en porcinos son poco  
2086 detalladas, además la posibilidad de reproducirlas es baja (Paran et al.,  
2087 2009), segundo porque lograr visualizarlas gracias a la coloración  
2088 especial de azul de toluidina de acuerdo con los resultados expuestos por  
2089 Luo et al. (2014) permite garantizar una técnica relativamente sencilla y  
2090 económica para evaluar la densidad neuronal en plexos mientéricos.  
2091 Tener disponible esta técnica de evaluación del plexo mientérico  
2092 garantiza una aproximación accesible y reproducible. Poder documentar  
2093 un paso a paso en este proceso garantiza la posibilidad de realizar  
2094 análisis comparativos futuros y asegurar la validez de los hallazgos  
2095 resultantes.

2096 Cabe destacar que la estandarización exitosa de este procedimiento no  
2097 solo beneficia el presente estudio, sino que también sienta las bases  
2098 para investigaciones futuras que utilicen la misma metodología.

2099 En conclusión, el trabajo realizado ha permitido avanzar  
2100 significativamente en la estandarización de técnicas clave para la  
2101 evaluación histológica e inmunohistoquímica del plexo mientérico en  
2102 porcinos.

2103 La técnica de fijación por inmersión ha demostrado ser una alternativa  
2104 viable al método de fijación por perfusión, no solo por la calidad de las  
2105 muestras obtenidas, sino también por las ventajas en términos de  
2106 seguridad en el manejo de los reactivos.



2107 Además, la introducción y validación del marcador NeuN en el plexo  
2108 mientérico porcino representa un avance importante, ampliando las  
2109 herramientas disponibles para la caracterización de las neuronas en el  
2110 sistema nervioso entérico. Los hallazgos obtenidos no solo contribuyen a  
2111 la comprensión de la composición celular de esta región anatómica, sino  
2112 que también abren nuevas perspectivas para investigaciones funcionales  
2113 y comparativas.

2114 La estandarización del preparado de membrana y la implementación de  
2115 la tinción de azul de toluidina en los tejidos de íleon también han sido  
2116 logros significativos, garantizando una metodología accesible y  
2117 reproducible para evaluar la densidad neuronal en los plexos mientéricos,  
2118 lo cual facilitará futuras investigaciones comparativas.

2119 En resumen, los avances logrados en este estudio no solo resuelven  
2120 dificultades metodológicas previas, sino que establecen un marco sólido  
2121 para la exploración y caracterización del sistema nervioso entérico en  
2122 porcinos, contribuyendo tanto al conocimiento básico como a la  
2123 aplicación de estas técnicas en la biomedicina y la producción animal.

2124

2125

2126 **Bibliografía**

2127

2128 1. Appleton, P. L., Quyn, A., Swift, S., & Näthke, I. (2009).  
2129 Preparation of Wholemout mouse intestine for high-resolution  
2130 three-dimensional imaging using two-photon microscopy.  
2131 Journal of Microscopy, 234(2), 196-204.  
2132 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03163.x>

2133 2. Bucevičius, J., Lukinavičius, G., & Gerasimaitė, R. (2018). The use of  
2134 Hoechst dyes for DNA staining and beyond. Chemosensors,  
2135 6(2), 18. <https://doi.org/10.3390/chemosensors6020018>

2136 3. Daş, G., Vernunft, A., Görs, S., Kanitz, E., Weitzel, J. M., Brüssow,  
2137 K.-P., & Metges, C. C. (2016). Effects of general anesthesia with  
2138 ketamine in combination with the neuroleptic sedatives xylazine or  
2139 azaperone on plasma metabolites and hormones in pigs<sup>12</sup>. Journal  
2140 of Animal Science, 94(8), 3229– 3239.  
2141 <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0365>

2142 4. Duarte, J. (2015). Caracterización de la exposición ocupacional a  
2143 formaldehído en trabajadores del sector Salud y Educación en  
2144 Colombia 2004-2013. En instname: Universidad del Rosario.  
2145 <https://repository.urosario.edu.co/handle/10336/10667>

2146 5. De Ceglia, R., Ledonne, A., Litvin, D., Lind, B. L., Carriero, G.,  
2147 Latagliata, E. C., Bindocci, E., Di Castro, M. A., Savtchouk, I.,  
2148 Vitali, I., Ranjak, A., Congiu, M., Canonica, T., Wisden, W., Harris,  
2149 K. D., Mameli, M., Mercuri, N. B., Telley, L., & Volterra, A. (2023).  
2150 Specialized astrocytes mediate glutamatergic gliotransmission  
2151 in the CNS. Nature, 622(7981),120-129.



- 2152 <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06502-w>
- 2153 6. Gershon, M. D., & Margolis, K. G. (2021). The gut, its microbiome,  
2154 and the brain: connections and communications. *Journal of*  
2155 *Clinical Investigation*, 131(18). <https://doi.org/10.1172/jci143768>
- 2156 7. Gusel'nikova, V. V., & Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN As a  
2157 Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta*  
2158 *Naturae*, 7(2), 42-47. [https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-2-](https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-2-42-47)  
2159 [42-47](https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-2-42-47)
- 2160 8. Huang, Z., Liao, L., Wang, Z., Lu, Y., Yan, W., Cao, H., & Tan, B.  
2161 (2021). An efficient approach for wholemount preparation of the  
2162 myenteric plexus of rat colon. *Journal of Neuroscience Methods*,  
2163 348, 109012. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.109012>
- 2164 9. Piña, R., Santos-Díaz, A. I., Orta-Salazar, E., Aguilar-Vazquez, A.  
2165 R., Mantellero, C. A., Acosta-Galeana, I., Estrada-Mondragón, A.,  
2166 Prior- González, M., Martínez-Cruz, J. I., & Rosas-Arellano, A.  
2167 (2022). Ten Approaches that Improve immunostaining: A review of  
2168 the latest advances for the optimization of immunofluorescence.  
2169 *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1426.  
2170 <https://doi.org/10.3390/ijms23031426>
- 2171 10. Kasukurthi, R., Brenner, M., Moore, A. M., Moradzadeh, A., Ray,  
2172 W. Z., Santosa, K. B., Mackinnon, S. E., & Hunter, D. A. (2009).  
2173 Transcardial perfusion versus immersion fixation for assessment of  
2174 peripheral nerve regeneration. *Journal of Neuroscience*  
2175 *Methods*, 184(2), 303-309.  
2176 <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.08.019>
- 2177 11. Kabouridis, P. S., Lasrado, R., McCallum, S. E., Chng, S. H.,



- 2178 Snippet, H. J., Clevers, H., Pettersson, S., & Pachnis, V. (2015).  
2179 Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut  
2180 Lamina propria. *Neuron*, 85(2), 289-295.  
2181 <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.037>
- 2182 12. Kong S, Zhang YH, Zhang W. Regulation of Intestinal Epithelial  
2183 Cells Properties and Functions by Amino Acids. *Biomed Res Int*.  
2184 2018 May 9;2018:2819154. doi: 10.1155/2018/2819154. PMID:  
2185 29854738; PMCID: PMC5966675.
- 2186 13. Liu, C., & Yang, J. (2022). Enteric glial cells in immunological  
2187 disorders of the gut. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16.  
2188 <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.895871>
- 2189 14. Luo, J., Chen, G., Wei, L., Qian, H., Lai, X., Wang, D., Lv, J., & Yu, X.  
2190 (2014). Severe diffuse axon injury in chronic alcoholic rat medulla  
2191 oblongata following a concussion blow. *Alcohol and*  
2192 *Alcoholism*, 49(3), 231-237. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agu009>
- 2193 15. Liao, D., Zhao, J., & Gregersen, H. (2020). Simulations of  
2194 myenteric neuron dynamics in response to mechanical stretch.  
2195 *Computational Intelligence and Neuroscience*, 2020, 1-10.  
2196 <https://doi.org/10.1155/2020/8834651>
- 2197 16. Mullen, R., Buck, C. R., & Smith, A. M. (1992). NEUN, a neuronal  
2198 specific nuclear protein in vertebrates. *Development*,  
2199 116(1), 201-211. <https://doi.org/10.1242/dev.116.1.201>
- 2200 17. Miller, S. M. M., Sullivan, S. M. S., Ireland, Z. I., Chand, K. K. C.,  
2201 Colditz, P. B. C., & Bjorkman, S. T. B. (2016). Neonatal seizures  
2202 are associated with redistribution and loss of GABAA  $\alpha$ -subunits  
2203 in the hypoxic-ischaemic pig. *Journal of neurochemistry*, 139(3).

- 2204 <https://doi.org/10.1111/jnc.13746>
- 2205 18. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the  
2206 Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.*  
2207 2019;1897:289-298. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5\_25. PMID:  
2208 30539453; PMCID: PMC6749998.
- 2209 19. Miller, I., Min, M., Yang, C., Tian, C., Gookin, S., Carter, D., &  
2210 Spencer, S. L. (2018). Ki67 is a Graded Rather than a Binary  
2211 Marker of Proliferation versus Quiescence. *Cell Reports*, 24(5),  
2212 1105-1112.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.110>
- 2213 20. Paran, T. S., Rolle, U., & Puri, P. (2009). Age-related changes in  
2214 the myenteric plexus of the porcine bowel. *Journal of Pediatric*  
2215 *Surgery*, 44(9), 1771-1777.  
2216 <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2008.12.018>
- 2217 21. Rao, J. N., & Wang, J. (2011). *Regulation of Gastrointestinal*  
2218 *Mucosal Growth*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21634069/>
- 2219 22. Stallaert, W., Taylor, S. R., Kedziora, K. M., Taylor, C. D., Sobon,  
2220 H. K., Young, C. L., Limas, J. C., Holloway, J. V., Johnson, M. S.,  
2221 Cook, J. G., & Purvis, J. E. (2022). The molecular architecture of  
2222 cell cycle arrest. *Molecular Systems*  
2223 *Biology*, 18(9). <https://doi.org/10.15252/msb.202211087>
- 2224 23. Uxa, S., Castillo-Binder, P., Kohler, R., Stangner, K., Müller, G. A.,  
2225 & Engeland, K. (2021). Ki-67 gene expression. *Cell Death And*  
2226 *Differentiation*, 28(12), 3357-3370. [https://doi.org/10.1038/s41418-](https://doi.org/10.1038/s41418-021-00823-x)  
2227 [021-00823-x](https://doi.org/10.1038/s41418-021-00823-x)
- 2228 24. Van Nassauw, L., Wu, M., De Jonge, F., Adriaensen, D., &  
2229 Timmermans, J. (2005). Cytoplasmic, but not nuclear, expression



- 2230 of the neuronal nuclei (NEUN) antibody is an exclusive feature of  
2231 Dogiel type II neurons in the guinea-pig gastrointestinal tract.  
2232 Histochemistry and Cell Biology, 124(5), 369-377.  
2233 <https://doi.org/10.1007/s00418-005-0019-7>



- 2234 25. Wixey, J. A., Lee, K. M., Miller, S. M., Goasdoué, K., Colditz, P. B.,  
2235 Björkman, S. T., & Chand, K. K. (2019). Neuropathology in intrauterine  
2236 growth restricted newborn piglets is associated with glial activation and  
2237 proinflammatory status in the brain. *Journal of*  
2238 *Neuroinflammation*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1392-1>
- 2239 26. Worthington, A., Finlay, I., & Regnard, C. (2022). Efficacy and  
2240 safety of drugs used for 'assisted dying'. *British Medical*  
2241 *Bulletin*, 142(1), 15-22. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldac009>
- 2242 27. Zacharko-Siembida, A., Piedra, J. V., Szymańczyk, S., &  
2243 Arciszewski, M. B. (2013). Immunolocalization of NOS, VIP, galanin  
2244 and SP in the small intestine of suckling pigs treated with red kidney  
2245 bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin. *Acta Histochemica*, 115(3), 219-  
2246 225. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.06.010>
- 2247 28. Гусельникова, В. В., & Korzhevskiy, D. E. (2015). NEUN as a neuronal  
2248 nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Naturae*,  
2249 7(2), 42-47. <https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-2-42-47>
- 2250
- 2251
- 2252
- 2253
- 2254
- 2255

2256 **Conclusiones generales**

2257

---

2258 La metodología empleada en esta investigación, basada en el  
2259 trabajo por estaciones, la priorización de la extracción de los  
2260 órganos del sistema digestivo durante la necropsia, junto con la  
2261 aplicación de condiciones de fijación y preservación adecuadas en  
2262 un tiempo inferior a 15 minutos post-mortem, resultó en la  
2263 prevención de cambios post-mortem y garantizó una buena calidad  
2264 de las muestras obtenidas para los análisis posteriores. Asimismo,  
2265 se logró estandarizar la técnica de fijación por inmersión del íleon  
2266 porcino, lo que permitió obtener tejidos de calidad óptima para los  
2267 análisis histológicos, morfométricos, histoquímicos e  
2268 inmunofluorescentes. Además, se validó el uso del preparado de  
2269 membrana como una técnica eficaz para exponer las neuronas del  
2270 plexo mientérico, lo que posibilitó su evaluación directa. Uno de los  
2271 hallazgos más relevantes de este estudio fue la identificación de  
2272 células inmunomarcadas con el anticuerpo NeuN1 en la lámina  
2273 propia, células que no habían sido previamente reportadas en  
2274 mamíferos. Finalmente, se estandarizaron métodos para evaluar los  
2275 componentes del sistema nervioso entérico en porcinos, que como  
2276 producto de apropiación social del conocimiento fueron  
2277 documentados en un manual de procedimientos, proporcionando  
2278 información y pautas de trabajo para futuras investigaciones en este  
2279 campo.

2280

2281

2282

2283	<b>Anexos</b>
2284	
2285	Anexo 1. Manual de procedimientos
2286	