Seguimiento histológico durante regeneración en *Anemonia viridis*

**Objetivos**

Queremos hacer un estudio histológico de la regeneración tisular en *A. viridis* tras cortarlas para inducir su reproducción asexual. Aunque el estudio en principio será cualitativo, es posible que veamos diferencias en la densidad de amebocitos de la mesoglea o de células mucosas que podrían ser cuantificadas.

**Materiales y métodos**

**Diseño experimental.** La regeneración de tentáculos en *A. viridis* es muy rápida y ya puede haber diferencias tisulares tan pronto como a las 6 horas de la herida (La Corte et al., 2023). Por mayor comodidad hemos establecido cuatro puntos temporales: **0 horas** (T0), **6 horas** (T6h) **24 horas** (T24h), **7 días** (T7d). Habrá 3 anémonas por cada punto de tiempo (aunque sobre todo en el de 7 días vamos a cortar 4 por si alguna no sobreviviera). Los cortes se harán en las siguientes fechas:

* Las anémonas T7d se cortan el viernes 12 de septiembre
* Las anémonas T24h se cortan el jueves 18 de septiembre
* Las anémonas T0 se cortan el viernes 19 de septiembre
* Las anémonas T6h se cortan el viernes 19 de septiembre

Aunque las anémonas escogidas deberían ser de tallas similares y mismo color, sería conveniente pesar las anémonas antes de cortarlas y anotar esos datos, por si más adelante encontramos diferencias asociadas a la talla de la anémona.

**Recogida de muestras.** El viernes 19 de septiembre, además de cortar las anémonas T0 y T6h, se recogerán muestras de todas las anémonas. Cogeremos, de cada medio individuo, un fragmento con forma de cuña, adyacente al plano de corte en regeneración. Uno de estos fragmentos se fijará en PFA 4%, mientras que el otro se conservará en etanol 70º para posteriormente fijarse en Solución de Davidson.

**Procesado posterior de muestras.** Las muestras de PFA necesitarán un **cambio** de fijador el viernes 19 por la tarde, y preferentemente dos cambios a PBS el sábado 20 (1-2 horas el primero, 24-72 horas el segundo). Las muestras en etanol se fijarán en Davidson el viernes 19 por la tarde durante 24 horas, y el sábado 20 se dejarán en etanol de 96º hasta que se procesen. El lunes 22 las muestras podrían ya procesarse, o mover las de PFA a PBS con azida sódica si van a tardar más. En total habrá 12 anémonas, con dos muestras por anémona, lo que dará un total de 24 bloques. Las piezas se orientarán de forma transversal en el bloque, y se procesarán tentáculos y pie de forma simultánea.

Para la tinción utilizaremos hematoxilina-eosina como tinción básica. La tinción Fontana-Masson revela depósitos de melanina que intervienen en la cicatrización y regeneración en Cnidarios y pueden ser cuantificadas mediante análisis de imagen. La tinción PAS-Hematoxilina revela acúmulos de glucógeno y mucosustancias neutras en general, dando buen contraste a zooxantelas y células mucosas. Estas últimas intervienen en la cicatrización. La tinción tricrómica de Masson (o Masson-Goldner en caso de usar verde luz), es una tinción recomendada en cnidarios porque aporta buen contraste a la mesoglea y amebocitos, además de a las fibras musculares y ambas capas epiteliales.

Entre los parámetros cuantitativos de interés, algunas propuestas son: densidad de células en mesoglea (de la cual la gran mayoría son amebocitos de función inmune y podría dar una estima del reclutamiento de estas células), grosor de la mesoglea, grosor de la epidermis (algunos autores encuentran que se engrosa durante la cicatrización), frecuencia/densidad de células secretoras en epidermis (detectables mediante PAS), densidad de zooxantelas, densidad colorimétrica con tinción Masson-Fontana (medida de la intensidad de acúmulos de melanina).

Igualmente, la recogida de muestras en PFA 4% deja abierta la opción a realizar análisis inmunohistoquímico con anticuerpos para diferentes proteínas celulares. Algunas proteínas de interés serían SOD, CAT, GPx, GR, G6PDH, fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida.

**Resultados**