

Manual de prácticas de Parasitología con énfasis en helmintos parásitos de peces de agua dulce y otros animales silvestres de México

Guillermo Salgado Maldonado

Instituto de Biología, UNAM

Proyecto PE209106

Programa de apoyo a proyectos para la innovación y mejoramiento de la enseñanza,

PAPIME

Dirección General de Asuntos del Personal Académico, DGAPA, UNAM

2007 - 2009

CONTENIDO

Introducción: Los helmintos y las características de la vida parasitaria.

Grupos taxonómicos de helmintos

Helmintos parásitos de peces de agua dulce, práctica de campo

Tinción y montaje de helmintos

Phylum Platyhelminthes: Introducción

Tremátodos

Monogéneos

Céstodos

Phylum Acanthocephala

Phylum Nematoda

Descripción de helmintiasis, parámetros básicos

Ecología de parásitos: distribución agregada de las poblaciones

Ecología de comunidades

¿Cuántas especies constituyen la comunidad de parásitos?

Distribución de abundancia de las especies

Dominancia. Rareza.

Diversidad.

Introducción

El parasitismo es la forma de vida más extendida en el planeta. Virtualmente todo ser vivo tiene parásitos, tanto las plantas como los animales. Cada especie tiene especies de parásitos que son especialistas de ella, que sólo la parasitan a ella. Por ejemplo, entre los parásitos especialistas del hombre contamos a *Taenia solium*, la solitaria, y a *Enterobius vermicularis*, el oxiuro. De la misma forma cada especie de ser vivo tiene sus propios parásitos. Además de los especialistas cada especie se ve afectada también por especies generalistas, por ejemplo, la triquina, *Trichinella spiralis* además de parasitar al hombre puede encontrarse en cerdos, perros, gatos, etc.

Son parásitos los virus, muchas bacterias y protozoarios, pero también algunos tipos de artrópodos, anélidos y moluscos. Hay parásitos en cada grupo (*phylum*) de animales. Podemos distinguir entre microparásitos y macroparásitos: los microparásitos como los virus, bacterias y protozoarios son pequeños y pueden multiplicarse directa y rápidamente dentro de la población de hospederos; en cambio los macroparásitos, helmintos y artrópodos, son de mayor tamaño no se multiplican dentro del hospedero, su población incrementa por inmigración no por reproducción directa dentro de cada hospedero (Anderson, 1993).

Los gusanos parásitos de animales se conocen en general como helmintos. Incluyendo tres grandes grupos los platelmintos, acantocéfalos y nemátodos (Crompton y Joyner, 1980; Williams y Jones, 1994). Tres clases de platelmintos son frecuentes entre los parásitos de animales silvestres, en particular entre los peces, los tremátodos, monogéneos y los céstodos. Los acantocéfalos son poco conocidos incluso entre los biólogos, muy pocas especies parasitan a animales domésticos; estos helmintos con una proboscis armada de

ganchos parasitan en animales silvestres. Los nemátodos son uno de los grupos bastante conocidos por las especies que parasitan al hombre y animales domésticos; el número de sus especies en animales silvestres es aun mayor.

La parasitología es un área de estudio e investigación muy dinámica en el mundo actual, muchas universidades del extranjero tienen planes de posgrado e investigación básica y aplicada en esta área. Los profesionistas (graduados y posgraduados) de esta área del conocimiento podrán desarrollarse ulteriormente en la academia, la industria, las instituciones de salud, medicina veterinaria, acuicultura, entre otras. Todo esto impone una demanda real de alumnos con una sólida preparación básica en Parasitología.

Uno de los problemas a que se enfrenta el docente en nuestro medio es la carencia de datos, especímenes, prácticas y desarrollos didácticos derivados del estudio de la biota de nuestro país. Los libros, los materiales, y los ejemplos en que nos basamos para la enseñanza en particular en la carrera de Biología, proceden del extranjero. Si bien, en parasitología médica y en parasitología veterinaria contamos con excelentes publicaciones que hacen referencia a nuestro entorno (por ejemplo Biagi, 1982; Cruz López, 1981; Quiroz Romero, 1984; Flisser y Pérez Tamayo, 2006), no es así en cuanto a parasitología de animales silvestres. La parasitología de animales silvestres se enseña actualmente con datos, ejemplos y organismos derivados de estudios realizados en otras latitudes, primordialmente de áreas templadas correspondientes a países desarrollados (entre los textos más usados están por ejemplo Bush et al., 2001; Poulin, 1998). La diversidad orgánica y la diferencia de condiciones ambientales denotan claramente la necesidad de abordar

esta problemática. Es oportuno desarrollar cauces para transmitir el conocimiento generado en nuestro medio en apoyo a la formación de recursos humanos.

El objetivo general de este manual de prácticas es transmitir la experiencia generada mediante la investigación de parásitos mediante la descripción de los procedimientos y técnicas que aplicamos en general en nuestras investigaciones. Particularmente nos referimos a los helmintos parásitos, en especial los de peces de agua dulce, como un modelo de trabajo.

Bibliografía

Anderson, R. M. 1993. Epidemiology pp. 75-116 *In*: Cox, F. E. G. (Ed.) Modern Parasitology. Blackwell Scientific Publications. Londres.

Crompton, D. W. T. y Joyner, S. M. 1980. Parasitic Worms. Wykeham Publications, Londres. 207 pp.

Williams, H. y A. Jones. 1994. Parasitic worms of fish. Taylor and Francis, Londres, 593 pp.

Helmintos parásitos de peces de agua dulce, práctica de campo

Introducción

Objetivos

Materiales y métodos

Recolección de hospederos

Examen de hospederos

Fijación de helmintos

Conservación de helmintos

Bibliografía

Helmintos parásitos de peces de agua dulce, práctica de campo

Introducción

Es posible desarrollar esta práctica examinando peces de cualquier cuerpo de agua dulce accesible, los resultados siempre serán informativos. El examen de tilapias y carpas, en tanto peces introducidos, y de peces de acuario o cultivados podría resultar en la observación de pocos parásitos; pero desde luego, ayudará si lo que buscamos es determinar especies de helmintos introducidas. Contamos con datos de los parásitos de peces de lagos, Pátzcuaro, Mich., Chapala, Jal., Catemaco, Ver. y ríos pertenecientes a las distintas cuencas hidrológicas, Balsas, Lerma, Ayuquila (Sierra de Manantlán, Jal), Santiago, Pánuco, Papaloapan, Grijalva-Usumacinta (y otros ríos de la Llanura Costera del Golfo de México, hacia Tabasco y Campeche) y de los cenotes y otros cuerpos de agua de la Península de Yucatán (ver Salgado-Maldonado, 2006 Zootaxa <http://www.mapress.com/zootaxa/2006f/zt01324p357.pdf> y referencias en ese trabajo).

También existen datos sobre los helmintos parásitos de peces de los ríos de Chiapas, del río Papagayo, Guerrero, La Antigua, Veracruz, y de las distintas cuencas del estado de Oaxaca (www.ibiologia.unam.mx consultar página Salgado-Maldonado, G.). Huelga decir que las preguntas iniciales en una investigación como ésta son 1) ¿qué peces examinaré? 2) ¿qué helmintos parásitos podré encontrar?

Si bien es posible que para la práctica se juzgue suficiente comprar peces (u otros hospederos) a la gente de la localidad, es necesario apuntar que algunos parásitos podrán perderse, y primordialmente que no tendremos la certeza de la procedencia de los hospederos. Este último dato es siempre vital en toda investigación formal, las condiciones

locales pueden verse reflejadas en el contenido parasitológico de una población determinada.

Todos los seres vivos están parasitados, lo raro es encontrar un organismo, planta o animal sin parásitos. Los peces como los anfibios, reptiles, aves y mamíferos, cuentan entre sus parásitos más evidentes a los helmintos. Cualquier tejido u órgano de un pez es susceptible de estar parasitado. Los helmintos se encuentran en piel, aletas, cavidades nasales, cavidad y arcos branquiales, cloaca, boca y en las escamas de la línea lateral, es decir, podemos encontrar ectoparásitos en cualquier órgano externo, tejido o cavidad de los peces. De la misma forma, los endoparásitos habitan en ojos, cerebro, cavidad celómica o corporal del pez, mesenterios, grasa, gónadas, riñones, hígado, musculatura parietal, sangre, y desde luego, en todo el tracto digestivo, los ciegos y el intestino.

En esta práctica se propone la revisión de peces de agua dulce para el reconocimiento y recolección de helmintos parásitos. El desarrollo de la práctica permitirá identificar en vivo los distintos tipos de helmintos y aplicar los métodos apropiados para su fijación y preservación.

Objetivos

1. Aplicar las técnicas generales para el examen de hospederos, (en este caso particular poblaciones silvestres de peces), para la búsqueda de helmintos parásitos.
2. Reconocer los distintos tipos de helmintos en vivo.
3. Aplicar las técnicas de fijación apropiadas para cada grupo de helmintos, para su procesamiento y estudio morfológico posterior.

Materiales y Métodos

Recolección de hospederos. El muestreo de peces depende de la localidad y las especies que ahí habiten. En términos generales, podemos dirigir el muestreo a una especie determinada de pez, especies de una familia o bien, muestrear todas las especies de peces de un cuerpo de agua determinado. El conocimiento de las características y el hábitat preferencial de la especie de pez guiará en la selección del arte de pesca; algunas veces es necesario muestrear en todos y cada uno de los hábitats principales de un cuerpo de agua, por ejemplo, el fondo, bajo las rocas, entre la vegetación, entre las raíces de los árboles, en la corriente de un río, etc. etc.

El equipo de electropesca es de gran ayuda y facilita la captura de muchas especies. En algunos cuerpos de agua pequeños podemos usar redes de cuchara, en otras localidades y para distintas especies de peces usamos trampas. Desde luego, las diversas redes, como atarrayas, chinchorros y trasmayos son recursos que necesitamos usar en distintas ocasiones (Fig. 1). Apoyarnos en los pescadores de la localidad facilita la captura.

Aún cuando existan pescadores comerciales en una localidad, es importante hacer la pesca nosotros mismos para obtener los peces vivos, los datos de la localidad, y desde luego, certificar su procedencia exacta. Es imprescindible georeferenciar (coordenadas y unidades UTM) cada localidad de muestreo. Es pertinente anotar las características principales que describen la localidad, tipo de cuerpo de agua, vegetación, tipo de sustrato, profundidad, entre otras. Para los parasitólogos son datos importantes la presencia de moluscos, caracoles y bivalvos, la densidad (así sea aproximada) de las poblaciones de peces y la riqueza de las comunidades ictiológicas en la localidad muestreada.

¿Cuántos peces de cada especie deberemos recolectar? Depende del objetivo del muestreo. Cuantos más peces examinemos de una especie, mejor reconoceremos sus parásitos, más oportunidades tendremos de recolectar más especies de parásitos, en particular las especies menos frecuentes en la población. Sin embargo, el examen parasitológico es un proceso tardado, y muchas veces deberemos establecer un compromiso entre lo deseable y lo posible. Una regla general es tratar de examinar 30 peces adultos de cada especie (por localidad y fecha o época de muestreo). En términos generales 30 es el menor tamaño de una muestra grande. Hay procedimientos adecuados para estimar los números de peces que deberemos examinar en consideración a la pregunta que planteemos abordar, o bien, para valorar la bondad de nuestro muestreo una vez hecho. Para el propósito de esta práctica es pertinente recordar que entre más peces de una especie examinemos, más especies de sus parásitos recuperaremos.

Los peces deben llegar vivos al laboratorio. Es oportuno recordar que la piel del pez es muy delicada, que deberemos extremar cuidado en su manejo. Es posible transportar vivos los peces en bolsas de plástico grueso, con agua del medio, aireando con bombas de baterías o bien burbujeando oxígeno con un tanque antes de cerrar adecuadamente la bolsa (Fig. 2). Estas bolsas pueden transportarse en cubetas o en recipientes que permitan su manejo y cuidado. El tipo de peces, su tamaño y número, así como la temperatura del agua son aspectos que deberemos cuidar mucho para el transporte al laboratorio. Por ejemplo, los atherinopsidos (charales, pescado blanco) son muy sensibles y resisten muy mal el manejo, en cambio, muchos poecílidos y cíclidos son muy resistentes al manejo y el transporte. Los procedimientos de transporte de peces vivos son usados comúnmente por los

acuicultores. Por nuestra parte hemos transportado en bolsas y cubetas adecuadamente peces vivos desde Acapulco o desde Veracruz, hasta la ciudad de México (4, 6 hs).

En el laboratorio donde se hará el examen helmintológico, los peces deben mantenerse en las mejores condiciones posibles (Fig. 3). Es recomendable que los peces se examinen inmediatamente o en el menor tiempo posible después de su captura. Por lo general en la literatura especializada se anota que los exámenes helmintológicos se realizan en las siguientes 24 hs a la captura de los hospederos. El mantenimiento conjunto de peces de distintas especies, hacinamiento o sobrepoblación con exceso de ejemplares, su disposición en condiciones inapropiadas, o el manejo excesivo, conducen a hospederos “estresados”, lo cual puede alterar los contenidos parasitológicos de las poblaciones bajo estudio.

Examen de hospederos. Antes de cualquier otro procedimiento, es importante iniciar con el examen para monogéneos. Son los helmintos que más fácilmente se pierden, o que podemos obviar en la revisión de los peces. Sacrificar al pez (por punción en el cerebro por ejemplo). Inmediatamente colocarlo en una caja de Petri con (poca) agua del medio (del lago, del río de donde proceda la pesca) y proceder al examen bajo microscopio estereoscópico (Fig. 4). Durante todo el procedimiento cuidar de mantener la humedad suficiente en todo el cuerpo del hospedero, mediante goteo frecuente de agua del medio. Examinar la piel, y la superficie general del cuerpo, observar cuidadosamente ambas caras de cada aleta. Separar las aletas pélvicas y pectorales cortándolas desde su base, lo más próximo al cuerpo del hospedero, colocarlas en cajas de Petri con poca agua del medio para facilitar su observación. Abrir los opérculos y retirar de la cavidad branquial las branquias completas. Colocarlas en una caja de Petri con agua del medio y separar cada arco

branquial individualizándolo para su mejor observación. Revisar cada arco cuidadosamente, por ambas caras, y entre los filamentos branquiales, ayudándose con agujas de disección finas y pinzas de relojero, todo bajo microscopio estereoscópico, en cajas de Petri, con agua del medio. Con un pincel fino (00 o similar) revisar los orificios del pez, las cavidades nasales, cloaca, y el interior de la boca y la cara interna de los opérculos. Con ayuda de pinzas de punta roma retirar una serie completa de escamas, preferentemente las de la línea lateral, colocarlas en un portaobjetos con agua del medio, y examinarlas al microscopio estereoscópico, por ambas caras. En los peces de agua dulce de México por lo general los monogéneos son muy pequeños, transparentes, poco evidentes separarlos con ayuda de pinceles y agujas de disección y colocarlos en portaobjetos, cajas de Petri pequeñas o discos de Syracuse apropiados SIEMPRE CON AGUA DEL MEDIO, para su estudio en vivo y fijación. Los monogéneos deben fijarse inmediatamente (ver procedimientos más abajo).

En las escamas, la piel, o enquistadas en los filamentos branquiales es frecuente encontrar metacercarias (formas larvianas de tremátodos), algunas de las cuales son muy pequeñas. Separar las metacercarias de los tejidos del hospedero con pinzas de punta fina, colocarlas entre porta y cubroobjetos o en cajas de Petri pequeñas. Por lo general estas metacercarias están enquistadas, sacarlas del quiste mecánicamente, antes de proceder a la fijación.

Antes de proceder a la siguiente etapa del examen helmintológico tomar los datos merísticos del hospedero, longitud total, longitud patrón, altura, peso, estos datos permitirán correlacionar las helmintiasis con las características generales de los hospederos (los peces se sexarán posteriormente, durante la disección de los órganos internos, por

examen directo de las gónadas). La Fig. muestra una hoja de campo de las que usamos en investigación para anotar los datos de las colectas.

Examen interno de hospederos. Con una tijera de punta recta abrir la cavidad abdominal del hospedero, desde el ano hasta la intersección branquial. Retirar el tracto digestivo completo, desde la región oral – branquial, hasta el recto, cortando cuidadosamente los extremos. Colocarlo en una caja de Petri de tamaño apropiado (9 o 15 cm de diámetro) con poca solución salina 0.7% Generalmente el aparato digestivo queda envuelto en los mesenterios, un tejido delicado de color negro que lo contiene. Ya en la caja de Petri y bajo microscopio estereoscópico, extender el tracto digestivo cuidadosamente, separando los mesenterios, el hígado y los tejidos grasos. La limpieza del examen es importante para determinar con precisión el hábitat de cada especie de helminto que encontremos. Es recomendable separar cada órgano y tejido en cajas de Petri con solución salina 0.7% durante el examen. Durante esta fase cuidar que el resto del cuerpo del hospedero no se seque, goteando continuamente solución salina 0.7% al interior de la cavidad corporal.

Examinar el interior del aparato digestivo desgarrándolo poco a poco con agujas de disección bajo microscopio estereoscópico. Hacia la luz intestinal podrán encontrarse helmintos adultos, tremátodos, céstodos, acantocéfalos y nemátodos. Con ayuda de pinceles finos colocarlos en cajas de Petri chicas, con solución salina 0.7% para su observación y fijación posterior. Los acantocéfalos se fijan a la mucosa intestinal introduciendo la proboscis en los tejidos, para separarlos desgarrar cuidadosamente los tejidos intestinales alrededor de la proboscis. En las paredes intestinales también pueden encontrarse metacercarias o larvas de nematodos enquistadas. Aislarlos de los tejidos del hospedero,

colocarlos en cajas de Petri con solución salina y sacarlos de los quistes para observarlos en vivo y fijarlos adecuadamente.

Los mesenterios, los tejidos grasos y el hígado, primeramente examinarlos con el microscopio estereoscópico, luego comprimirlos entre 2 portaobjetos o vidrios de tamaño adecuado (Fig.) (hacer “squash”) y observarlos al microscopio estereoscópico. Pueden encontrarse también metacercarias y larvas de nemátodos libres y enquistadas. También se encuentran sobre el hígado, los mesenterios o sobre la parte externa de la pared del intestino, larvas de acantocéfalos enquistadas (cistacantos) y metacéstodos (larvas de céstodos). Es preciso retirarlas de los tejidos del hospedero, sacarlas del quiste y colocarlas en cajas de Petri para su fijación posterior.

Examinar la cavidad celómica o cavidad general del cuerpo del hospedero bajo el microscopio estereoscópico. Retirar lo que queda de los mesenterios, las gónadas (no olvidar sexar cada hospedero por examen directo de las gónadas en este paso), la vejiga natatoria y los riñones. Examinar todos estos tejidos y órganos primero superficialmente y después por compresión entre 2 vidrios o entre portaobjetos, como en el paso anterior.

Retirar ambos ojos del pez y examinarlos. Pueden encontrarse helmintos (generalmente metacercarias) sobre el ojo, sobre el lente o en el humor acuoso del glóbulo ocular; es importante precisar el hábitat donde se encuentren los parásitos. Retirar el cerebro (Fig.) y examinarlo por compresión entre 2 portaobjetos.

Con un bisturí, cuchillo o navaja apropiada obtener filetes de la musculatura parietal del pez (Fig.) para examinarlos también por compresión entre vidrios. Pueden encontrarse también metacercarias o larvas de nemátodos.

Fijación de helmintos.

Tremátodos y metacercarias: fijarlos directamente con formol 4% caliente (casi a ebullición)(Fig.). Las metacercarias deberán desenquistarse antes de agregar el fijador. Pueden conservarse en frascos viales en el mismo formol hasta por 3 meses; dado que el formol endurece los tejidos es recomendable cambiarlos a alcohol etílico 70% para preservarlos por más tiempo. Los viales deben ser etiquetados claramente con los datos completos de la colecta (se describe más abajo).

Cuando hay ejemplares suficientes, es recomendable fijar algunos especímenes de cada especie de tremátodo (o metacercarias) por aplanamiento ligero (Fig.): hacer una preparación fresca con cada espécimen, colocándolo en un portaobjetos con una gota de solución salina 0.7%, cubrir el ejemplar con un cubreobjetos. Estos ejemplares pueden fijarse con líquido de Bouin, AFA o formol al 4%. El fijador seleccionado se introduce por capilaridad (por un lado del cubreobjetos) en tanto que por el lado contrario se absorbe la solución salina con trozos pequeños de toalla de papel absorbente (Fig.). Los especímenes deben permanecer en el montaje entre 12 a 24 hs, para lo cual las preparaciones se colocan en cajas de Petri grandes, al fondo de la cual se le agregan algunas gotas del fijador y se tapa, **evitando que las preparaciones se sequen**. Transcurridas las 12 o 24 hs, los especímenes se desmontan usando pinceles finos, para conservarlos en frascos viales etiquetados con los datos completos de la colecta.

La fijación por aplanamiento ligero permite obtener preparaciones microscópicas que facilitan el estudio morfológico de los ejemplares. Sin embargo, actualmente muchas revistas especializadas no admiten para su publicación descripciones de especies con base

en especímenes aplanados, argumentando que la proporción normal de los órganos se altera y que de esta forma las mediciones no son precisas.

Céstodos adultos: los tegumentos de muchas especies de céstodos inician el proceso de descomposición inmediatamente cuando son retirados de los órganos del hospedero; por ésto es importante proceder a su fijación inmediatamente cuando se les encuentra (aún antes de concluir la revisión completa del hospedero). Colocar los ejemplares en solución salina 0.7% en un vaso de precipitados de 100 ml, lavarlos rápidamente en la solución salina y decantar la totalidad de solución; fijar al céstodo vertiendo directamente sobre el ejemplar 100 ml de formol 4% caliente (a punto de ebullición). El volumen de formol es importante para ayudar a extender el estróbilo de cada espécimen.

Metacéstodos. Son los distintos tipos de larvas de cestodos que encontramos en los tejidos y órganos de los peces, muchos de ellos maduran en aves. Por lo general una vez desenquistados se fijan como los tremátodos, directamente con formol al 4% caliente. Los metacéstodos Gryporhynchidae pueden fijarse también con picrato-amonio (ver fijación de monogéneos) para facilitar el estudio del roseto.

Monogéneos. Se cuentan entre los helmintos más frágiles y pequeños, vivos deben permanecer siempre en agua del medio. Es importante fijar suficientes ejemplares usando varios métodos para lograr un estudio morfológico completo. Es muy práctico fijarlos directamente en fijador de alcohol isobutílico: colocar directamente el monogéneo en una gota del fijador en el centro del portaobjetos, cubrir el espécimen con un cubreobjetos.

Estas preparaciones son permanentes.

Puesto que la taxonomía del grupo se basa en el estudio de las partes duras (esclerosadas), es posible usar picrato-amonio como fijador. Este es un fijador que deshace

las partes blandas, pero conserva las partes duras de cada espécimen. Cuando se aplica este método de fijación no se pretende conservar todo el ejemplar, sólo las escleritas, y se intenta que queden extendidas, en un solo plano, para facilitar su estudio y medición posterior. El procedimiento consiste en hacer una preparación fresca con cada espécimen a fijar y ejercer presión enérgicamente sobre el portaobjetos (Fig.), con el propósito de extender las escleritas. Sellar el portaobjetos aplicando barniz transparente de uñas (Fig.). Los monogéneos pueden ser transportados en cajas de preparaciones para microscopio, y estudiados en estas preparaciones, pero a los 5 o 6 meses es necesario pasarlos a preparaciones permanentes montadas en bálsamo de Canadá.

Fijar otros monogéneos de la misma especie directamente con formol al 4% caliente, o bien por aplanamiento ligero (como los tremátodos), lo cual posibilitará tener especímenes completos para estudiar la morfología y los tejidos blandos del gusano.

Acantocéfalos. Todo espécimen de acantocéfalo debe tener la proboscis completamente evertida antes de fijarlo. Estos parásitos invaginan la proboscis al ser manipulados durante la disección del hospedero. Es necesario colocarlos en agua destilada en refrigeración por 8, 12 o hasta 24 hs para lograr la eversión de la proboscis. Luego pueden fijarse sumergiéndolos directamente en alcohol etílico 70% caliente, formol al 4% caliente o AFA. También es recomendable fijar algunos especímenes por aplanamiento ligero (ver tremátodos).

Nemátodos. Se fijan agregándoles directamente formol al 4% caliente. Algunos nemátodos de peces son bastante frágiles y al manipularlos en solución salina durante el examen del hospedero, comienzan a romperse y los órganos internos se salen de la cavidad corporal del parásito; por esto es recomendable fijarlos inmediatamente con formol salino

al 4% caliente. Como todos los otros helmintos, una vez fijados se colocan en viales con alcohol del 70% o con el mismo fijador, etiquetados con los datos completos de la colecta.

Conservación de helmintos. Para su estudio morfológico y determinación taxonómica, los platelmintos y los acantocéfalos se procesan para hacer preparaciones permanentes para el microscopio de organismos totales. La tinción y procesamiento de helmintos da mejores resultados si se hace inmediatamente después de la recolección y fijación. Los especímenes pueden conservarse indefinidamente en viales con alcohol etílico al 70%. Los especímenes de cada especie de helminto por cada hospedero y órgano se separan colocándolos en viales llenos con alcohol etílico al 70%. Cada vial se identifica con una pequeña etiqueta (Fig.) que se coloca dentro junto con los parásitos. Los datos se escriben con lápiz o tinta china usando cartulina resistente, incluyendo el número y tipo de helmintos, el hospedero (nombre científico y número del hospedero si se le ha asignado uno), el órgano en que habitaban los parásitos, la localidad de colecta de los hospederos, la fecha y el colector. Cada dato es sumamente importante, y debe escribirse correctamente con la máxima legibilidad.

Cuestionario

1. ¿Qué características morfológicas permiten reconocer en vivo a los tremátodos, monogéneos, cestodos, acantocéfalos y nemátodos?
2. ¿Qué es la fijación? ¿Qué características son deseables en un buen agente fijador?

3. Compara los métodos de fijación de ésta práctica con los que se aplican para la fijación de otros organismos, vegetales y animales; y para otros procedimientos (por ejemplo para estudios histológicos, o para aspectos de biología molecular).

Bibliografía

Lamothe-Argumedo, R. 1997. Manual de técnicas para preparar y estudiar los parásitos de animales silvestres. AGT Editor, México D. F. 43 pp.

Salgado-Maldonado, G. 1979. Procedimientos y Técnicas generales empleados en los estudios helmintológicos. Departamento de Pesca. México, D. F. 55 pp.

Salgado-Maldonado, G. 2006. Checklist of helminth parasites of freshwater fishes from Mexico. *Zootaxa*: 1324:1—357. <http://www.mapress.com/zootaxa/2006f/zt01324p357.pdf>; <http://www.mapress.com/zootaxa/>



Fig. 1 Recolección de peces,
equipo de electropesca





Fig. Recolección de peces con chinchorro



Fig. 3 Traslado de peces vivos al laboratorio en bolsas de plástico aireadas



Fig. 4. Los hospederos en el laboratorio deben mantenerse en condiciones adecuadas hasta su examen helmintológico.



Fig. Mantener vivos los peces en el laboratorio es esencial para un buen trabajo parasitológico; permite mayor eficiencia en la búsqueda y recolección de helmintos, y posibilita mayor tiempo para examinarlos. Al morir los peces los ectoparásitos como los monogéneos virtualmente se deshacen y perdemos esta información.



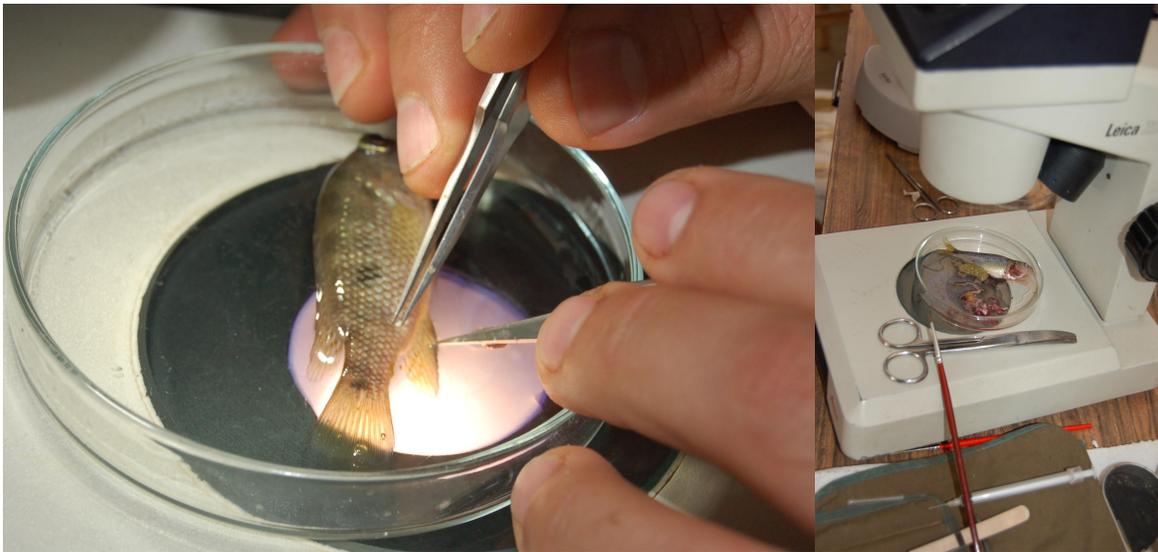


Fig. Examen de hospederos: iniciar siempre con las aletas, branquias, etc. ya que los monogéneos son muy frágiles y pueden perderse fácilmente. Todo el examen debe llevarse a cabo bajo microscopio estereoscópico, en cajas de Petri de tamaños apropiados y usando poco agua del medio para la superficie externa o solución salina 0.7% para las vísceras y órganos internos. Notar las pinzas de punta fina (de "relojero"), los pinceles finos y las agujas de disección.



Fig. El uso de vidrios de tamaños apropiados permite aplanar tejidos y órganos (musculatura, riñones, hígado, mesenterios, grasa, cerebro) de los hospederos para su observación por transparencia; los parásitos pueden recuperarse posteriormente para su fijación adecuada.



Especie de hospedero: Cichlasoma isthianum Hosp. Núm. 0643
 Localidad: _____
 Fecha de colecta: 18/Ago/2016 Fecha de examen: 19/Ago/2016
 Nombre de la persona realizó el examen: _____

Datos merísticos:
 Longitud total: _____ mm Longitud patrón: _____ mm Altura: _____ mm
 Peso: 4.7 g Sexo: _____ Hospedero: _____

REVISIÓN EXTERNA

Superficie general del cuerpo
 Ojos
 Gonoporo
 Opérculos
 Cavidad branquial
 Arcos branquiales

ALETAS:
 Caudal
 Dorsal
 Pectorales
 Pélvicas
 Anal

REVISIÓN INTERNA

Cavidad del cuerpo
 Cerebro
 Musculatura
 Grasa
 Mesentefos
 Corazón
 Hígado
 Riñón
 Vejiga natatoria

TRACTO DIGESTIVO:
 Esófago
 Estómago
 Intestino
 Recto

NOTAS:

Fig. Es importante tener un método adecuado para la captura de los datos de campo. En nuestro laboratorio, el uso de "hojas de campo" para cada hospedero que examinamos ha permitido hacer eficiente esta captura de datos, puesto que facilita el manejo de los datos de todos los hospederos examinados en una colecta, tanto en conjunto y a la vez con independencia. Las hojas de campo contienen enunciados (nombres de los campos, o de los órganos y tejidos) que guían la actividad a desarrollar. Sirven además como recordatorio de lo que debemos hacer y como lista para verificar que ya hemos hecho todo lo correspondiente al examen de cada hospedero.

Tinción y montaje de helmintos

Introducción

Objetivos

Materiales y métodos

Fijación

Deshidratación

Aclaramiento

Montaje

Procedimientos: técnicas de tinción

Hematoxilina

Paracarmín de Mayer

Borax Carmín de Grenacher

Carmín ácido de Mayer

Tricrómica de Gomori

Apéndice 1

Hematoxilina

Ácido carmínico

Anilinas

Mordentes

Apéndice II. Formulario

Bibliografía

Tinción y montaje de helmintos

Introducción

En esta práctica se procesarán ejemplares de platelmintos y acantocéfalos para elaborar preparaciones totales para microscopio, permanentes y montadas en bálsamo de Canadá. El estudio morfológico y la determinación taxonómica de los ejemplares se desarrolla con estas preparaciones que se depositan en Colecciones Biológicas establecidas y reconocidas, y constituyen la referencia necesaria del trabajo científico desarrollado. Los nemátodos no se tiñen, los procedimientos para su estudio y determinación taxonómica no implican la tinción y se describen por separado.

Para estudiar los objetos en el microscopio es necesario que sean delgados y transparentes ya que la mayoría de las veces los examinamos usando luz transmitida, es decir, el estudio de las preparaciones se hace por transparencia.

Las partes que constituyen las células y el material intercelular por lo general son incoloras y transparentes, por lo que no se distinguen unas de otras. Es difícil precisar los contornos de órganos y estructuras a menos que presenten diferencias apreciables en sus índices de refracción. Para solucionar esta dificultad teñimos los ejemplares; aplicamos colorantes para contrastar entre las diferentes partes de un espécimen. Los colorantes usados como reactivos se emplean para determinar la presencia de algunas sustancias químicas o para evidenciar la distribución de algunas estructuras, por ejemplo fibras elásticas; en helmintología aplicamos colorantes para elucidar la anatomía de organismos pequeños.

Contrastar meramente un espécimen en sí con lo que le rodea sería de poca utilidad, ya que lo que pretendemos es estudiar las estructuras internas. Las diferentes estructuras y

órganos por lo general absorben diferentes cantidades del mismo colorante. Así también, diferentes colorantes pueden fijarse de manera distinta al mismo órgano. La afinidad de un órgano o tejido por diversos colorantes puede tener razones químicas o físicas: su afinidad química, densidad y permeabilidad. Usamos los colorantes para obtener contrastes marcados entre los órganos y estructuras de un ejemplar y poder estudiarlos al microscopio.

En microscopía realmente se usan pocos tintes. Con pocas excepciones, los colorantes pueden clasificarse como ácidos o básicos (Baker, 1958). Una clasificación precisa atenderá a su composición química, lo que queda fuera de los objetivos de esta nota. Ejemplos de colorantes básicos son el violeta de metilo, violeta de genciana, cristal violeta, azul de anilina, azul de Nilo A, azul de toluidina, así como el rojo neutro y el azul de metileno; entre los colorantes ácidos tenemos el azul de metilo, el verde brillante, la alizarina, la Eosina Y, el ácido carmínico, y la hematoxilina.

Procesamos los helmintos tiñéndolos con hematoxilinas o algún preparado de ácido carmínico. El Dr. Rafael Lamothe Argumedo recomienda el uso de la Tricrómica de Gomori. Estas técnicas fueron originalmente derivadas de la técnica histológica por el Dr. Eduardo Caballero y Caballero, quien fue uno de los fundadores del Instituto de Biología de la UNAM (noviembre de 1929), el laboratorio de Helminología de este Instituto se ha desarrollado desde ese entonces. Alumna distinguida y colaboradora del Dr. Eduardo Caballero fue la Maestra Margarita Bravo Hollis, quien trabajó también en el Instituto de Biología e impartió la materia “Técnicas Selectas de Laboratorio” en la carrera de Biología de la Facultad de Ciencias, UNAM. Más tarde, desde los 70’s el Dr. Rafael Lamothe Argumedo se ha hecho cargo del Laboratorio, y a él debemos la enseñanza de las técnicas que describimos en este apartado, y aplicamos en el laboratorio.

Objetivos

Que el alumno se relacione con los métodos generales de procesamiento de macroparásitos para su estudio morfológico, determinación taxonómica y elaboración de materiales de referencia (“vouchers”) por medio de la aplicación de técnicas de tinción para elaboración de preparaciones totales permanentes de helmintos parásitos.

Materiales y métodos

La meta final de esta práctica es lograr preparaciones de ejemplares totales (no seccionados) teñidas y montadas de manera permanente en bálsamo de Canadá. Los medios resinosos como el bálsamo de Canadá dan durabilidad a montajes de tejidos y organismos teñidos, además el bálsamo proporciona mayor transparencia ya que incrementa el índice de refracción cuando el espécimen está completamente impregnado por esta resina. El bálsamo no se mezcla con el agua por esto deberemos deshidratar completamente el espécimen, posteriormente reemplazar el agente deshidratante con algún material con el cual la resina se mezcle, este es el aclarante. Entonces los pasos del procesamiento incluyen después de la fijación, el teñido, deshidratación, aclaración y montaje (Gray, 1954).

Fijación. Algunos fijadores contraen el citoplasma fuertemente, de forma que dificultan la penetración del colorante y la apreciación de la cantidad de colorante que el tejido ha tomado. El formol favorece la acción de los colorantes básicos más que ningún otro fijador. El alcohol etílico y el ácido acético usados como fijadores facilitan la tinción de las proteínas y el citoplasma con colorantes ácidos o básicos, en tanto que el ácido pícrico coagula las proteínas y favorece los colorantes ácidos (Baker, 1958).

Cualquiera que sea el método de fijación empleado (formol 4%, Bouin, AFA), antes de iniciar el procesamiento es necesario haber lavado ya los ejemplares eliminando todo el fijador (varios cambios de alcohol etílico 70%), deben conservarse en alcohol etílico 70%.

Deshidratación. Para deshidratar usamos preferentemente etanol; para esto se emplean los alcoholes graduales de 30%, 50%, 70% y 96% hasta alcohol etílico absoluto. Los alcoholes graduales se preparan a partir de alcohol etílico del 96% que es más barato que el absoluto. El alcohol absoluto es higroscópico es decir, absorbe rápidamente agua del aire se hidrata muy fácilmente, por lo que es necesario mantenerlo tapado siempre. La acetona y el metanol también pueden usarse para deshidratar, pero son más volátiles que el alcohol etílico. No hay forma práctica de saber si un espécimen está bien deshidratado, sólo hasta intentar aclararlo (si no está deshidratado se oscurecerá). La deshidratación insuficiente es la causa más frecuente de malas preparaciones. Los ejemplares tienen que ser manipulados con mucho cuidado y permanecer el tiempo adecuado (algunas veces más de 12 hs) en los alcoholes de 96% y absoluto. Sin embargo, un tiempo excesivo en alcohol absoluto torna quebradizos a los ejemplares. La deshidratación es uno de los pasos cruciales del procesamiento, debe hacerse muy cuidadosamente, con materiales muy limpios, y alcoholes preparados con exactitud, Pantin (1964) recomienda que el proceso se haga muy lentamente (de 1 a 12 horas para cada cambio de alcohol) para asegurar una deshidratación completa. Los alcoholes usados no deben regresarse a los frascos de alcohol nuevos.

Aclaramiento. El aclarante es una sustancia miscible con el alcohol absoluto y con el bálsamo. Se emplean aceites esenciales que imparten transparencia a los ejemplares de la misma manera que lo hará el bálsamo cuando se haya impregnado totalmente en el espécimen. El terpineol es un aceite sintético que tiene la ventaja de ser miscible con el

alcohol de 96%, y por lo tanto ayudar a la completa deshidratación de los ejemplares. También se usa el aceite esencial de clavos, sin embargo este aceite torna quebradizos a los ejemplares. Otro aclarante que usamos es el salicilato de Metilo (Metil salicilato). La creosota de haya, se usó hace tiempo como aclarante, actualmente ha dejado de usarse porque está considerada como carcinógeno. La creosota es una mezcla de químicos en su mayoría hidrocarburos aromáticos policíclicos derivados del benceno, que se originan de la quema de la madera de haya (*Fagus*), irrita la piel y las mucosas. También el xilol se usa como aclarante para helmintos, sin embargo los resultados son menos satisfactorios que cuando se aplica para cortes histológicos en parafina por ejemplo. Tratar a los ejemplares con xilol por más de 15 minutos los hace quebradizos. En general los aclarantes tienden a absorber agua del ambiente, es necesario mantenerlos tapados y cambiarlos periódicamente; desechar los usados durante algún tiempo y que ya se han hidratado.

Montaje. El medio de montaje por excelencia es el bálsamo de Canadá, una resina natural que se obtiene a partir de *Abies balsamica* y que se diluye comúnmente en solventes como el xilol, tolueno o benceno. Los tres solventes son tóxicos. Características destacables del bálsamo de Canadá son su transparencia, un índice de refracción muy próximo al del vidrio de los portaobjetos y cubreobjetos (1.5) y su durabilidad (hay registros de preparaciones con más de 100 años, y en la Colección Nacional de Helmintos del Instituto de Biología, UNAM se conservan preparaciones de más de 70). Existen resinas sintéticas útiles como medios de montaje para microscopía, pero su durabilidad es cuestionable; tratándose de ejemplares de referencia que se depositarán en una colección, necesitamos tratar de asegurar en la medida de lo posible la más larga permanencia. Pantin (1964) contradice el razonamiento anterior cuando argumenta que la causa principal de la

decoloración de los especímenes en preparaciones con el tiempo, es el uso de xilol y de bálsamo de Canadá. Este autor recomienda (pág. 48) para prevenir la decoloración de ejemplares, evitar el uso de xilol y bálsamo de Canadá; considera que la causa de esta regresión en el material procesado es la impureza del xilol y el bálsamo y la incompleta remoción de mordentes.

Procedimientos: Técnicas de tinción

Para llevar a cabo las tinciones observa las fotografías que se presentan en esta práctica y sigue las indicaciones que se describen en las técnicas. Los especímenes no deben dejarse al aire, nunca deben permanecer en seco. No dejar los frascos con soluciones o espécimenes abiertos más del tiempo absolutamente necesario. La humedad ambiental puede causar que los espécimenes se opaquen y las preparaciones queden mal al montarlas en bálsamo. Cambia los flúidos siempre usando pipetas Pasteur limpias. Los mejores resultados en cuanto a la tinción de especímenes se obtienen sobretiñéndolos y luego diferenciándolos (decolorándolos poco a poco), hasta alcanzar el color deseado. La preparación de reactivos y colorantes se detalla en el Apéndice II.

En general, decimos que las tinciones son acuosas o alcohólicas considerando si el colorante ha sido diluído en agua o en alcohol. La hematoxilina como la describimos abajo es una tinción acuosa, y el paracarmín de Mayer es un ejemplo de tinción alcohólica.

Hematoxilina de Delafield o de Ehrlich

1. Los especímenes estarán en alcohol etílico 70% lavados ya del fijador

2. Hidratar en alcoholes graduales 50%, 30% (15 minutos en cada uno) hasta agua destilada.
3. Teñir en hematoxilina de Delafield o de Ehrlich (el tiempo de tinción depende de las dimensiones del parásito, sobre todo de su grosor, y de la madurez del colorante, los colorantes que llevan más tiempo de haber sido preparados se dice que están maduros y tiñen más rápidamente. Puede probarse con un tiempo inicial de 30 segundos a 1 minuto y dar el tiempo necesario de acuerdo con la coloración que el parásito vaya tomando. Algunas veces el tiempo de tinción excede de los 30 minutos) (La tinción puede hacerse muy lentamente si diluimos el colorante, 1 gota o 2 de hematoxilina en 30 ml de agua destilada, teñir el ejemplar durante 24 hs en esta solución)
4. Lavar con agua destilada para eliminar el exceso de colorante
5. Diferenciar con agua acidulada al 2% con ácido clorhídrico, hasta que el parásito tome un color rosa pálido
6. Lavar en agua destilada durante 1 o 2 minutos para evitar que siga actuando el agua acidulada
7. Virar el ejemplar a color azul pálido o violeta en agua de la llave durante unos 3 a 5 minutos (para acelerar el virado puede agregarse solución sobresaturada de carbonato de litio al agua destilada)
8. Deshidratar lentamente desde agua destilada, en alcoholes graduales de 30%, 50%, 70%, 96% al menos 15 minutos en cada cambio. Recordar que entre más lenta sea la deshidratación tendremos más probabilidades de obtener mejores resultados.
9. Completar la deshidratación en alcohol etílico absoluto (100%) 2 cambios de 20 a 30 minutos cada cambio. Mantener el alcohol absoluto tapado.

10. Aclarar en terpineol, aceite de clavos o salicilato de Metilo

11. Montar con bálsamo de Canadá.

Hematoxilina de Van Cleave

Denominamos “hematoxilina de Van Cleave” a una mezcla de hematoxilina de Delafield con hematoxilina de Ehrlich y alumbre de potasio (ver formulario), esta mezcla es recomendada por Van Cleave (1953) para la tinción de acantocéfalos; el procedimiento de tinción en este caso es el mismo que se describió anteriormente.

Paracarmín de Mayer

1. Los especímenes deberán estar en alcohol etílico 70% lavados ya del fijador
2. Alcohol etílico 96%, 2 cambios, 10 minutos cada uno
3. Teñir en paracarmín de Mayer, por lo general el tiempo varía de 2 a 3 hasta 10 a 15 minutos
4. Lavar en alcohol etílico 96% para quitar el exceso de colorante
5. Diferenciar en alcohol de 96% acidulado al 2% con ácido clorhídrico, hasta que los bordes del cuerpo queden más pálidos que el resto y los órganos internos sean visibles por transparencia.
6. Lavar en alcohol de 96% para evitar que el ácido clorhídrico siga decolorando el ejemplar.
7. Deshidratar, 2 cambios de alcohol de 96% 15 minutos cada uno.
8. Alcohol etílico absoluto (100%), 2 cambios de 20 minutos cada uno

Borax Carmín de Grenacher

(Tinción recomendada por Bullock, 1969 para acantocéfalos)

1. Los especímenes deberán estar en alcohol etílico 70% lavados ya del fijador
2. Colocar los especímenes en borax carmin de Grenacher durante 7.5 a 8.5 horas
3. pasado este tiempo agregar 1 gota de ácido clorhídrico por cada 5 ml de colorante y mezclar bigorosamente

Carmín ácido de Mayer

(Amin, 1998 recomienda esta tinción en especial para acantocéfalos) (para esta tinción van Cleave, 1953 recomienda primero tratar los ejemplares con solución de fosfato trisódico)

1. Los especímenes deberán estar en alcohol etílico 70% lavados ya del fijador
2. Pinchar los acantocéfalos con alfileres entomológicos para facilitar la penetración de los fluidos a la cavidad del cuerpo y los órganos internos. Los especímenes de mayor tamaño deben pincharse más veces. Cuidar de no pinchar los órganos reproductores.
3. Teñir en Carmín ácido de Mayer durante toda una noche
4. Diferenciar en alcohol de 70% acidulado al 4% con ácido clorhídrico, hasta lograr color rosa pálido. La diferenciación puede llevar varias horas, incluso 2 o 3 días (Amin, comunicación personal)
5. Lavar en alcohol 75% varias veces (al menos 3) hasta que el espécimen no desprenda más colorante.
6. Deshidratar en alcoholes de 85% y 95% de 12 a 24 hs, 2 cambios en el alcohol de 95%.
7. Completar la deshidratación en alcohol etílico absoluto (100%) a por 12 a 24 hs

8. Aclarar en mezclas graduales de terpineol y alcohol absoluto (25% terpineol, 75% alcohol absoluto; 50% terpineol y 50% alcohol absoluto; 75% terpineol y 25 % alcohol absoluto; terpineol 100%) 12 a 24 hs en cada mezcla.
9. Colocar los ejemplares en una mezcla mitad de terpineol y mita bálsamo de Canadá
10. Montar en bálsamo de Canadá

Tricrómica de Gomori

1. Los especímenes deberán estar en alcohol etílico 70% lavados ya del fijador (se recomienda usar líquido de Bouin como fijador, ya que actúa como mordente; debe lavarse muy bien, con alcohol 70% hasta eliminar todo resto de fijador)
2. Hidratar hasta agua destilada, alcohol 50%, 25% 15 minutos en cada uno
3. Teñir en Hematoxilina de Weigert durante 10 minutos
4. Lavar en agua corriente por 10 minutos
5. Teñir en tricrómica de Gomori por 10 a 15 minutos
6. Diferenciar en agua acidulada al 0.5% con ácido acético (ácido acético glacial 0.5 ml en 99.5 ml de agua destilada)
7. Deshidratar lentamente, aclarar y montar.

Apéndice I

Hematoxilina

Aún hoy en día cuando el avance tecnológico permite la síntesis de muchas moléculas, uno de los colorantes más usados en biología es la hematoxilina (hemateína) (Titford, 2005). Su importancia se deriva de la variedad de objetos que puede teñir, la facilidad con que puede manejarse, su insolubilidad en medios neutros alcohólicos o acuosos después de la tinción, y la posibilidad de obtener una coloración oscura permanente en el bálsamo de Canadá. La hematoxilina es un compuesto derivado de la madera oscura de una leguminosa nativa de Centro América, *Haematoxylon campechianum*. Los Mayas la usaban para teñir algodón, y aprovechaban también sus propiedades medicinales; los Españoles la transportaron a Europa, donde los textiles se teñían con colorantes derivados de plantas y líquenes hasta el advenimiento de las anilinas (1830s). Por esta razón la planta fue introducida desde Yucatán a las islas del Caribe, Brasil, India y Madagascar. Desde el punto de vista químico la hematoxilina es un flavonoide, una familia de sustancias ampliamente distribuida entre las plantas. Cuando se expone al aire la hematoxilina se oxida a hemateína de color pardo rojizo, que no debe confundirse con el pigmento sanguíneo hematina. La coloración que imparte la hematoxilina por sí sola no es muy durable, pero el uso de sales de metales pesados como “mordentes” permite mayor permanencia: las sales de hierro dan coloraciones grises a oscuras, las de cromo dan tonos azules, y las de aluminio proporcionan colores violáceos. La hematoxilina se usa en microscopía desde inicios del siglo XIX.

Ácido carmínico

El ácido carmínico es un colorante muy empleado en microscopía, entre otras razones porque puede emplearse directamente como un colorante básico, o con un mordente como colorante ácido, puede usarse también directamente como colorante ácido y ya en los tejidos cambiarse a básico; es permanente en bálsamo de Canadá y tiñe muy bien las preparaciones totales de helmintos.

El ácido carmínico es el único colorante de origen animal que se emplea en microscopía, se obtiene de cóccidos, cochinillas *Dactylopius cacti* (*Coccus cati*) cuyas hembras carecen de alas y se alimentan de un nopal nativo de Centro América, *Nopalea coccinellifera*. El ácido carmínico se extrae de los cuerpos desecados de las hembras, en ellas constituye casi un 10% de su peso seco. Pueden observarse corpúsculos rojos del pigmento en los lóbulos de los cuerpos grasos de las hembras; a pesar de que el macho también tiene estos cuerpos grasos no produce en ellos tantos corpúsculos del colorante. El carmín es una forma “cruda” del ácido carmínico, se extrae también de las cochinillas, pero contiene tan sólo un 56% de ácido carmínico mezclado con otras sustancias orgánicas. El carmín tiene la ventaja de ser considerablemente más barato que el ácido carmínico, pero las impurezas lo tornan casi insoluble en agua destilada. Puede emplearse también en las tinciones para microscopía. Hacia fines del Siglo XIX, P. Mayer produjo diferentes mezclas colorantes usando ácido camínico y popularizó su uso en microscopía.

Anilinas

La “Tricrómica de Gomori” es una técnica de tinción que se basa en el uso del Cromotropo 2R, un colorante sintético ácido. Genéricamente a los colorantes sintéticos se les denomina anilinas.

Mordentes

Los colorantes disueltos en agua o en una mezcla de agua y alcohol se adhieren directamente a ciertos constituyentes de los tejidos. Algunos colorantes particulares sin embargo tienen métodos alternativos de adhesión que involucran la presencia de otra sustancia entre el colorante en sí y el solvente, y cuando esta sustancia se presenta el comportamiento del colorante es un tanto distinto. Estas sustancias intermediarias entre colorantes y tejidos se conocen como mordentes. Por lo general las sales de ciertos metales se usan como mordentes: los sulfatos de hierro, aluminio y cromo (como los alumbres de potasio, de amonio, de hierro y el de cromo). Un mordente reacciona químicamente con el colorante formando una laca. Algunas lacas penetran más a los tejidos que los propios colorantes que las originan. Estos complejos tejido/mordente/colorante, son insolubles en todos los fluidos neutros que se usan generalmente en microscopía, de forma que la coloración subsecuente con otros colorantes se facilita y la deshidratación puede llevarse a cabo gradualmente. Ejemplos de colorantes que se usan con mordentes son la hematoxilina de Ehrlich y el carmalum de Mayer.

Apéndice II

Formulario

Hematoxilina de Delafield

Pueden prepararse distintos tipos de hematoxilina, dependiendo del mordente, del método de oxigenación, el pH, etc. La hematoxilina de Delafield se prepara con alumbre, similar a la de Harris, requiere de madurar al menos un par de semanas; (sin embargo la oxigenación del pigmento puede acelerarse para su uso inmediato, ver Neild, 1934).

Hematoxilina (cristales)	4 g
Alcohol 95%	25 ml
Solución saturada de alumbre de amonio	400 ml

Hematoxilina de Van Cleave (Van Cleave, 1953)

Hematoxilina de Delafield	1 ml
Hematoxilina de Ehrlich	1 ml
Agua destilada	100 ml
Alumbre de potasio	6 g

Disolver completamente el alumbre de potasio en el agua destilada, agregar las hematoxilinas.

Tricrómica de Gomori

Esta técnica de tinción combina una hematoxilina con una mezcla de colorantes incluyendo cromotropo 2R y verde brillante o verde rápido y azul de anilina. Se utiliza por lo general para identificar por microscopía óptica el tejido conectivo en muestras de tejidos. Permite la diferenciación entre fibras de colágena y de músculo liso; posibilita la identificación de fibras de colágena en tejido hepático y renal, se utiliza para demostrar el incremento en la deposición del colágeno asociados con la sustitución de tejido funcional por tejido cicatricial. Hay muchas variantes de esta técnica (Ellis, 2008).

Principios de acción: un colorante general (plasma stain, Cromotropo 2R) se combina con un tinte que colorea las fibras de tejido conjuntivo (verde rápido [Fast Green FCF], verde brillante [light green], o azul de anilina), en una solución de ácido fosfotúngstico a la cual se le ha agregado una solución de ácido acético. El ácido fosfotúngstico favorece la coloración roja del músculo y el citoplasma. El ion tungstato lo toma específicamente la colágena, y el colorante de las fibras de tejido conjuntivo se adhiere a este complejo coloreando la colágena en verde o en azul dependiendo del colorante de contraste que se haya empleado. Puede usarse cualquier fijador, sin embargo se recomienda ampliamente fijar los especímenes en líquido de Bouin si se va a teñir con la tricrómica de Gomori, ya que el Bouin actúa como mordente al bajar el pH, intensificando las reacciones que dan los colores.

Interpretación de la tinción:

Citoplasma, fibras musculares, queratina ----- rojo

Fibrina ----- rosa

Colágena ----- verde

Núcleos ----- azul o negro

Para la tricrómica de Gomori se emplean los siguientes colorantes:

Hematoxilina férrica de Weigert

Solución A

Hematoxilina ----- 10 g

Alcohol 95% ----- 1 000 ml

Solución B

Agua destilada ----- 475 ml

Ácido clorhídrico concentrado ----- 5 ml

Cloruro férrico, solución 29% ----- 20 ml

Solución para teñir:

Mezclar partes iguales de las soluciones A y B

Tricrómica de Gomori

Cromotopo 2R ----- 0.6 g

Fast green FCF, Light gree o anilina blue ----- 0.3 g

Ácido fosfotúngstico ----- 0.8 g

Ácido acético glacial ----- 1 ml

Agua destilada ----- 100 ml

Disolver cada reactivo por separado en alícuotas de 25 ml de agua destilada, luego mezclar las cuatro soluciones. Dejar reposar durante una noche, y filtrar. La mezcla es de color púrpura. Puede conservarse a temperatura ambiente, pero debe protegerse de la luz. Esta solución se deteriora con el tiempo, por lo tanto se recomienda preparar poco y usarla lo más fresca posible. Incluso se recomienda prepararla semanalmente.

Para la tricrómica de Gomori, Ellis (2008) recomienda primero teñir los núcleos con azul de celestina preparada de la siguiente manera:

Azul de Celestina ----- 0.5 g

Sulfato férrico de amonio al 5% (alumbre de hierro) ---- 100 ml

Se prepara añadiendo el azul de Celestina al sulfato férrico de amonio e hirviendo por 3 minutos, dejar enfriar y luego filtrar. Conservar la solución refrigerada.

Puede usarse también la hematoxilina de Harris en lugar de la hematoxilina férrica de Weigert siguiendo los mismos procedimientos descritos.

Bibliografía

Amin, O. M. 1998. Acanthocephala. Marine Flora and Fauna of the United States- NOAA Technical Report NMFS 135, US department of Commerce. 27 pp.

Baker, J. R. 1958 (3^a reimpresión 1970). Principles of biological microtechnique. A study of fixation and dyeing. Methuen & Co Ltd, UK 357 pp.

Bullock, W. L. 1969. Morphological features as tools and as pitfalls in Acanthocephalan systematics. Pp. 9 – 43 *In*: Schmidt, G. D. (Ed) Problems in systematic of parasites. University Park Press. Baltimore.

Eiras, J. C., R. M. Takemoto, G. C. Pavanelli. 2000. Métodos de estudio y técnicas laboratoriales en parasitología de peces. Editorial Acribia, España. 133 pp.

Ellis, R. 2008. Gomori's trichrome staining protocol for connective tissues.

[http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/gomori's_trichrome_ellis.htm] The Queen Elizabeth Hospital, South Australia [consultado en diciembre 2008]

Gomori, G. 1950. A rapid one-step trichrome stain. American Journal of Clin Pathology 20: 661-663 (o bien buscar en pág. 265)

Gray, P. 1954. The microtometist's formulary and guide. Constable and Company, Ltd. Londres. 794 pp.

Lamothe-Argumedo, R. 1997. Manual de técnicas para preparar y estudiar los parásitos de animales silvestres. AGT Editor, México D. F. 43 pp.

Lillie, R. D. 1977. H. J. Conn's Biological Stains. Ninth Edition. The Williams and Wilkins Co. Baltimore 692 pp.

Neild, H. W. 1934. A rapid method for the preparation of Delafield's Haematoxylin. Science 79 (2044): 209-210.

Pantin, C. F. A. 1964. Notes on microscopical technique for zoologists. Cambridge University Press. 76 pp.

Salgado-Maldonado, G. 1979. Procedimientos y técnicas generales empleados en los estudios helmintológicos. Departamento de Pesca, Dirección General de Acuicultura, México D. F. 55 pp.

Titford, M. 2005. The long history of hematoxylin. Biotechnic and Histochemistry 80: 73-78.

Van Cleave, H. J. 1953 Acanthocephala of North American Mammals. Illinois Biological Monographs 23: 1-179.

Wageningen University, Holanda, Food Technology Department. 2008. Cochineal, Carmine, Carminic acid (E120). Food Infonet, <http://www.food-info.net/uk/colour/cochineal.htm> (consultado en noviembre 2008)

Phylum Platyhelminthes

Introducción

Phylum Platyhelminthes

Introducción

Los platelmintos constituyen un *Phylum* de organismos grande y diverso, algunos de ellos son de vida libre, pero la mayoría son ecto o endoparásitos de vertebrados e invertebrados. Presentan simetría bilateral. El cuerpo es aplanado dorsoventralmente y sólido, carecen de cavidad corporal (celoma). No son segmentados, aunque los céstodos presentan el cuerpo constituido por proglótidos. Algunos grupos de platelmintos presentan un aparato digestivo incompleto, en tanto que los céstodos carecen por completo de órganos digestivos. Carecen de sistemas circulatorio, esquelético y de órganos de intercambio gaseoso. Presentan un sistema excretor protonefridial, constituido por células en flama. En general son hermafroditas, con ciclos de vida complejos, si bien los monogéneos tienen ciclo de vida directo.

La clasificación del *Phylum* incluye varias clases, de las cuales los tremátodos (Trematoda), los monogéneos (Monogenea) y los céstodos (Eucestoda) son frecuentes como parásitos de animales silvestres, en particular de peces.

Tremátodos

Introducción

Desarrollo

Bibliografía

Tremátodos

Introducción

Algunos autores se refieren a los tremátodos como digeneos o como tremátodos digenéticos. La mayoría de los tremátodos adultos son endoparásitos y se encuentran en todas las clases de vertebrados. Una de las características más distintivas de esta clase de platelmintos es que presentan un par de ventosas, la anterior es la ventosa oral en el centro de la cual se encuentra la boca, y una ventosa ventral o acetábulo. Algunas especies no presentan esta constitución; en tanto que otras pueden presentar ventosas accesorias en la parte anterior. La talla de los tremátodos que parasitan animales silvestres es muy variable, de unos pocos milímetros hasta algunos centímetros. La pared del cuerpo de los tremátodos es un tegumento sincicial, una capa viva que puede estar cubierta por espinas o tubérculos o algunas otras estructuras accesorias.

Existe un cerebro primitivo en la parte anterior del cuerpo, a partir del cual se extienden cordones nerviosos longitudinales pareados que se interconectan por medio de comisuras laterales. El sistema nervioso periférico inerva el tegumento y las capas musculares, el aparato digestivo y el reproductor. Los órganos sensoriales externos incluyen mecanorreceptores, quimiorreceptores y osmoreceptores.

Los órganos y sistemas internos quedan embebidos en el parénquima. El aparato digestivo se abre en la boca situada por lo general en la parte anterior del cuerpo, en el centro de la ventosa oral. La mayoría de las especies presentan una faringe muscular conspicua, que se continúa con el esófago que por lo general da lugar a dos ciegos que se extienden lateralmente y pueden llegar hasta el extremo posterior del cuerpo. En algunas especies estos ciegos pueden ser cortos, o ramificarse, o bien, en otras especies pueden

unirse en la parte posterior formando un asa, incluso, abriéndose en un ano. Como vemos la variabilidad morfológica de los tremátodos es muy grande, como en todos los grupos.

El sistema excretor es protonefrial, las células en flama exhiben patrones de disposición específicos, y simétricos en el organismos; la observación de estas células es más sencilla con ejemplares vivos. Los conductos excretores desembocan a una vesícula excretora situada hacia el extremo posterior del cuerpo y que puede describirse como en forma de I, de Y o de V; la observación de esta vesícula es más accesible con ejemplares en vivo, pero muchas veces se puede observar en los ejemplares ya procesados en preparaciones permanentes.

Si bien los esquistosomátidos son unisexuales, hay machos y hembras por separado, la mayoría de los grupos de tremátodos son hermafroditas, con órganos reproductivos masculinos y femeninos en el mismo individuo. La disposición de los órganos y estructuras reproductoras es muy variable, la descripción que hacemos a continuación es general, puede emplearse como una guía en la observación de ejemplares.

Por lo general se presenta un par de testículos de tamaño similar, de los cuales sale el esperma por los vasos eferentes, que se fusionan originando el vaso deferente o espermaducto. En algunos grupos el espermaducto desemboca en una vesícula seminal. La porción terminal del sistema masculino por lo general exhibe un saco del cirro con un cirro (papila peneal) protusible. Este saco se abre directamente en el gonoporo, situado sobre la superficie ventral del animal, o bien formando un atrio genital.

La fecundación por lo general es cruzada. El cirro transfiere el esperma hacia el gonoporo de otro organismo para que viaje por los conductos genitales femeninos hacia el receptáculo seminal donde se almacena. Los óvulos se producen en el ovario y se desplazan

por el oviducto. A medida que pasan por el receptáculo seminal son fecundados. El cigoto diploide continúa hacia el ootipo, que está rodeado por la glándula de Mehlis. El ootipo también recibe la desembocadura del reservorio de vitelo. Las glándulas vitelógenas generalmente se encuentran distribuidas longitudinalmente hacia las márgenes del cuerpo, aunque en algunas especies pueden constituir masas compactas. Las vitelógenas aportan el vitelo para el desarrollo embrionario, y también producen sustancias que van a formar el cascarón del huevo. Las enzimas que se generan en la glándula de Mehlis endurecen el cascarón a medida que los huevos pasan del ootipo al útero. El embrión continúa su desarrollo en el útero, de forma que cuando salen del cuerpo del adulto en realidad son embriones contenidos en el cascarón del huevo.

Desarrollo y ciclo de vida. El desarrollo embrionario dentro del cascarón del huevo da lugar a una primera forma larvaria, el miracidio, que en algunas especies ya está completamente formado cuando el huevo es puesto. En otras especies el huevo requiere haber salido para completar su desarrollo.

Todos los tremátodos tienen un molusco, gastrópodo o bivalvo, como primer hospedero intermediario. La mayoría de las especies de tremátodos ponen huevos de los cuales eclosiona el miracidio que penetra al caracol hospedero intermediario. Algunas especies depositan huevos que son ingeridos por el molusco, y dentro de éste eclosiona el miracidio. Los miracidios son larvas ciliadas, libre nadadoras.

Dentro del molusco el desarrollo continúa por medio de un proceso asexual muy especializado conocido como poliembrionía, mediante el cual se logra más de un individuo por cada cigoto en desarrollo. Los miracidios desprenden sus cilios y se establecen en

sitios específicos del caracol según la especie de parásito, y se transforman en esporocistos. Los esporocistos son sacos germinales que contienen células somáticas y células de desarrollo. A partir de las células somáticas tiene lugar la formación de una segunda generación de esporocistos. O bien, el esporocisto da lugar a otro estadio de desarrollo llamado redia. Las redias también son sacos que contienen células somáticas y células germinales; sin embargo ya poseen la ventosa oral, la boca y la faringe, así como un sistema digestivo primitivo. Las células somáticas de las redias pueden dar lugar a una segunda generación de redias (redias hijas) o bien dar origen a otro estadio de desarrollo, las cercarias. Estas cercarias en la mayoría de las especies emergen del caracol primer hospedero intermediario y nadan libremente buscando al siguiente hospedero. Las cercarias son muy parecidas ya a los adultos, pero carecen de órganos reproductores desarrollados, y además presentan una cola. En muchas especies, las cercarias penetran a otro hospedero intermediario (el segundo hospedero intermediario), en donde se transforman en metacercarias, que por lo general permanecen enquistadas. Las metacercarias casi son ya adultos inmaduros. Cuando son ingeridos por el hospedero definitivo apropiado, se transforman en adultos reproductivos.

Objetivo

Que el alumno reconozca las características morfológicas distintivas de los tremátodos.

Desarrollo

Estudio morfológico de tremátodos adultos:

Crassicutis cichlasomae Manter, 1936 parásito de ciclidos nativos (mojarras), parasita el intestino de varias especies de *Cichlasoma* en los cuerpos de Centroamérica, desde la cuenca del río Pánuco por la vertiente del Golfo de México, y la cuenca del río Papagayo por la vertiente del Océano Pacífico, hasta Nicaragua y Panamá (Salgado-Maldonado, 2008).

Estudio morfológico de larvas de tremátodos (metacercarias):

Posthodiplostomum minimum (MacCallum, 1921) parásito de mesenterios, musculatura, hígado, cavidad del cuerpo, ojos, riñones, grasa, de gran cantidad de peces de distintas familias, ampliamente distribuido en México. Los adultos parasitan aves ictiófagas como garzas.

Clinostomum complanatum (Rudolphi, 1814) parasita en la boca, cavidad branquial, branquias, opérculos, aletas, músculo, mesenterios, musculatura, cavidad del cuerpo, de gran cantidad de peces de distintas familias, ampliamente distribuido en México. Los adultos parasitan aves ictiófagas como garzas y cormoranes.

Bibliografía

Bush, A. O., J. C. Fernández, G. W. Esch, y J. R. Seed. 2001. Parasitism, the diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press. Cambridge UK. 566 pp.