

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

“ I Z T A C A L A ”



EVALUACION DE ALGUNAS TECNICAS DE TINCION Y
MONTAJE PERMANENTE DE NEMATODOS
FITOPARASITOS Y DE VIDA LIBRE

T E S I S P R O F E S I O N A L

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A

SILVIA ELENA ARRIAGA FRANCO

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO

MARZO 1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

H. COMISION DICTAMINADORA:

DRA. ELSA CALLEJA QUEVEDO

BIOL. RODOLFO CARDENAS REYGADAS

QBP FILIBERTO ZERON BRAVO

BIOL. MA. DE LOS ANGELES SANABRIA ESPINOSA

BIOL. JOSE DEL CARMEN BENITEZ FLORES

RECONOCIMIENTO:

El trabajo experimental de esta tesis se realizó en el Laboratorio de Nematología Agrícola del Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del QBP FILIBERTO ZERON BRAVO y la asesoría del LI. DIONISIO PELAEZ F. y el M. en C. FERNANDO DE LA JARA ALCÓCER.

CONTENIDO

I. INTRODUCCION

II. ANTECEDENTES

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

IV. OBJETIVOS

V. METODO

VI. RESULTADOS

VII. DISCUSION

VIII. CONCLUSIONES

IX. APENDICE

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

I. INTRODUCCION

La identificación de las especies de nemátodos fitoparásitos y de vida libre, es importante para fines diagnósticos, así como para la docencia. Revela las diferencias en sus hábitos de vida, la diversidad de sus hospederos y los efectos patógenos que ejercen sobre éstos - cuando se considera que pueden ser un factor determinante o significativo en la reducción o en el rendimiento de las cosechas de cultivos agrícolas (27). Para la identificación y el estudio de estos organismos, se necesita hacer observaciones al microscopio de las preparaciones "in vitro" que se obtengan de ellos. Sin embargo, los métodos de tinción y de montaje que se han practicado hasta el momento, no permiten que los nemátodos se puedan conservar permanentemente, debido a que, por sus características estructurales, se contraen con el tiempo y no aceptan la entrada de los colorantes. No obstante, hasta la fecha no se han actualizado los estudios para resolver este problema. Así, podemos encontrar referencias bibliográficas como la de Zuckerman (44), que aún en 1985 utiliza técnicas que datan de hace más de 30 años. Una de esas técnicas fué descrita por Seinhorst (34), y consiste en montar a los nemátodos - en glicerina anhidro mediante una deshidratación con mezclas de ésta y alcohol etílico. De aquí en adelante, muchos autores han hecho modificaciones menores a la técnica y no ha habido aportaciones relevantes. Por eso, la bibliografía disponible es escasa y poco actualizada.

II. ANTECEDENTES

CARACTERISTICAS DE LOS NEMATODOS

Los nemátodos abundan en la naturaleza, y se les encuentra en casi cualquier nicho ecológico que propicie la vida como los desiertos, el fondo del mar, los hielos del Antártico y los manantiales termales. Tanto los insectos (25), como los animales superiores (7,20), tienen nemátodos parásitos. El tamaño de estos organismos es muy variable, y se pueden encontrar formas que miden desde unos cuantos milímetros, como sucede con los nemátodos de vida libre y los que parasitan a las plantas, hasta especies que llegan a medir varios metros, como es el caso del nemátodo que parasita a las ballenas y que mide 7.5 metros de longitud (27).

Los nemátodos de vida libre pertenecen a la familia Rhabditidae (como los saprófitos, Fig. No. 1), y los que parasitan a las plantas a la familia Tylenchida. Los rhabditidos se dividen en especies marinas, de agua dulce y terrestres. Los de agua dulce tienen hábitos de vida especializados y son más numerosos que los marinos. Por ejemplo, Turbatrix acetii (Fig. No. 2), se desarrolla en soluciones que fermentan de manera natural, como el vinagre de piña (7). Dentro de las especies te-

restres, encontramos a Aphelenchus avenae (Fig. No. 3), es cosmopolita y se alimenta principalmente de hongos fitopatógenos del género Fusarium. Por esta razón, se utiliza en el control biológico de los hongos que atacan a los cultivos agrícolas (5,19 y 42). Ditylenchus dipsaci (Fig. No. 4), parasita a las plantas importantes para el hombre y tiene preferencia por el ajo, la cebolla, el centeno, la alfalfa, el narciso, la zanahoria, el chícharo, la papa, la acelga y la remolacha. Se alimenta del tejido parenquimatoso, de los tallos y bulbos, ocasionando grandes pérdidas en las cosechas (7,40). Los nemátodos de la familia Criconematidae son anillados; en particular, el género Criconemoides (Fig.No. 5), se distribuye alrededor de las raíces de arbustos y pastos. Sin embargo, se les ha encontrado en grandes cantidades en los huertos, viñedos, zarzas, arbustos y plantas ornamentales perennes. Son ectoparásitos, aunque no se ha demostrado completamente su patogenicidad (40).

En general, los nemátodos son fusiformes y cilíndricos, aunque algunas hembras parásitas pueden ser esféricas o periformes. Su color es blanquesino o cremosos, pudiendo ser translúcidos. Su simetría es bilateral, son triblásticos, pseudocelomados y dioicos, pero puede haber hembras partenogenéticas. Si se hace un corte transversal de un nemátodo, se encuentran tres capas: la capa externa o cutícula, la capa media o hipodermis y la capa muscular. La cutícula a su vez se divide en tres: la corteza, formada por proteínas reticulares y lípidos; la matriz, formada por proteínas fibrosas y enzimas; y finalmente, la capa "fibrosa", compuestos por tres estratos de colágeno, empalmadas una sobre otra. Debido a ésta estructura, los nemátodos son elásticos. La matriz y la capa fibrosa funcionan como esqueleto hidrostático.

La cutícula tiene varias funciones importantes: protección, permitir la respiración y facilitar la formación de quistes donde se guardan los huevecillos. Presenta el fenómeno de écdisis, es decir, hay hasta cuatro mudas en un ciclo de vida. La matriz y la capa fibrosa son absorbidas por la hipodermis y sirven para formar la nueva cutícula que aparece en forma plegada. Entonces el nemátodo rompe la capa externa que quedó y sale de ella. Algunos nemátodos llegan a conservar todas las capas de las mudas, como sucede con los criconemátidos (7), y esto los hace tener una gruesa cutícula que en la mayoría de los casos es anillada y en ocasiones se forman espinas en cada anillo (40). En contraste, T. aceti sólo tiene una cutícula simple finamente estriada (17).

FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA TINCION DE LOS NEMATODOS

La permeabilidad de la cutícula de los nemátodos varía enormemente con las formas y hábitos normales de vida de las especies. Generalmente los colorantes intravitales se utilizan para determinar este factor. El Azul de metileno, el Rojo neutro y varios Carmines han favorecido esa tarea. En general, los nemátodos marinos como Oncholaimus parecen tener más permeabilidad de la cutícula que las formas terrestres, como Rhabditis, o los que se encuentran en el tracto digestivo como los oxiúridos. En Rhabditis los colorantes como el Azul de metileno (3), penetran mucho más rápidamente por las aberturas normales del cuerpo como la boca, el ano, la vulva, el poroecretor, los amfidios, los fasmidios

y por las papilas. Ogiga y Estey (28), encontraron que tanto el Azul de Meldola como el Azul de Nilo A, penetran más rápidamente por la boca y el ano de los géneros Tylenchorhynchus, Helicotylenchus, Pratylenchus, Xiphinema, Dorylaimus, Rhabditis, Panagrolaimus y Mononchus ya que en estas dos partes, la tinción fué mucho más rápida en las especies sin estilete que en las que si lo tienen. Doncaster y Clark (13), demostraron que el Rojo de metilo y el Rojo neutro, se absorbieron en diferentes partes del intestino en dos especies de rhabditidos. Sin embargo, la mayoría de los investigadores han encontrado que los nemátodos muertos se tiñen, mientras que los vivos no lo hacen. Esto es muy importante porque la mayoría de los estudios han revelado la eficacia nematicida de los colorantes y de otros productos químicos. Tomando como punto de referencia la mortalidad, se puede determinar cuántos organismos se mueren simplemente contando el número de nemátodos teñidos. Por ejemplo, Fenner (15), concluyó que la Floxina B, tiñó rápidamente a los organismos muertos, y nulamente a los vivos. Sin embargo, el mismo colorante no penetró en los huevecillos de Heterodera schachtii después de una semana de bido a que su cubierta actuó como una barrera. Moriarty (26), utilizó también este colorante en huevecillos y larvas de H. schachtii, pero observó que no era adecuado para determinar la viabilidad, a diferencia de la Crisoidina que sí ofrecía resultados positivos. Homeyer (18), usó una solución de 100-200 ppm de Anaranjado de acridina y observó que bajo el microscopio de fluorescencia, los nemátodos vivos se veían verdes por efecto de la luz, y los muertos se observaron rojos por efecto del colorante. Van der Laan y Bijloo (23), encontraron que los huevecillos de los quistes de Heterodera tratados con dosis letales y subletales de nematicidas se morían después de tres semanas y así se podían teñir con Anaranjado de acridina. Doliwa (12), aplicó una solución de 500 ppm de Crisoidina para distinguir las larvas vivas y muertas de Heterodera; las muertas se tiñeron de amarillo intenso y además, el contenido intestinal de algunas larvas vivas, de anaranjado. Yadav (43), tiñó diferencialmente los fasmidios y los escutelos de nemátodos parásitos de plantas, tratándolos con cloruro de oro y de mercurio (10 min. en una solución al 0.1 %), aclarándolos previamente con ácido fórmico al 1 %.

La permeabilidad también se ve afectada por la temperatura. Chitwood (3), menciona que la cutícula semipermeable de D. dipsaci es sensible a la temperatura. Ogiga y Estey (28), sometieron a un grupo de nemátodos a la acción del calor, del frío, del congelamiento, de la sequedad y de nematicidas. Después utilizaron varios colorantes para separar a los nemátodos vivos y a los muertos obteniendo los siguientes resultados: todos los nemátodos muertos por cualquier mecanismo mencionado anteriormente, se tiñeron inmediatamente, excepto los que se murieron por congelamiento, ya que se tuvieron que dejar 48 horas en el colorante. El Azul de Meldola tiñó a los organismos muertos uniformemente de color púrpura claro, y en los vivos, sólo se tiñeron los gránulos intestinales. El Azul de Nilo A, actuó de manera similar, sólo que el color que resultó fué azul. Con la Crisoidina, los nemátodos se tiñen uniformemente de amarillo y algunos vivos se tiñen con gránulos anaranjados. Con la Floxina B, los organismos muertos se tiñen de rosa y con el Nuevo Azul R, de púrpura oscuro. Los nemátodos vivos no se tiñeron aunque no tuvieran movilidad. Ogiga y Estey concluyeron que la facilidad y el

éxito de una buena tinción, dependía de la especie del nemátodo, del agente con el que se mataran, del daño fisiológico que sufrieran después de su muerte y de la permeabilidad de su cutícula, puesto que observaron que algunos nemátodos muertos y teñidos, tenían dañada la cutícula, y por estos lugares probablemente penetraron los colorantes. Shepherd (37), trabajó con los géneros: Heterodera, Meloidogyne, Ditylenchus, Aphelenchoides, Aphelenchus y Anguina encontrando que los organismos muertos con calor, aceptaron muy bien el colorante Nuevo Azul R, tiñendo de azul, púrpura oscuro o negro su contenido corporal. En cambio, los nemátodos vivos no se tiñen. Rodríguez-Kabana (32), utilizó Azul de Toluidina al 0.05% (p/v), en una solución amortiguadora de fosfato (pH 4.6; 0.05 M), para teñir especímenes "in toto" de Hoplolaimus galeatus y Helicotylenchus dihystra. Obtuvo buenos resultados después de que los organismos permanecieron a 60°C durante 7 horas. Cuando los nemátodos se lavaron con la solución amortiguadora de fosfato entre 55-60°C durante 5 horas, observó una buena diferenciación entre el esófago y el aparato reproductor femenino y masculino. También fueron positivos los resultados a temperaturas menores, sólo que con aumento del tiempo de exposición al colorante. Kostyuk (22), aplicó a nemátodos vivos una solución de Azul de Nilo B al 0.2% con ácido acético al 0.1% y formol al 10% durante 24 horas a 37°C y obtuvo una tinción diferencial de los órganos sexuales y del aparato digestivo. De la misma manera, cuando agregó a estos organismos cinco partes de una solución de Azul de Toluidina al 1% por una parte de ácido acético glacial, durante 24 horas a 37°C, inmediatamente se presentó una tinción azul de los órganos sexuales, de la glándula esofágica y de las glándulas de los conductos sexuales, coloreándose el nucleolo, la cromatina y las glándulas de secreción. El color se intensificó con la exposición al aire. Chaudhuri (2), también utilizó calor para matar a los nemátodos de las especies Diplogasteroides sp. y Diplogasteritus nudicapitatus. Aplicó diferentes concentraciones del colorante Eosina Y (0.02%, 0.04%, 0.4% y 0.67%), y encontró que el tiempo de exposición al colorante no aumentó la intensidad de la tinción en los nemátodos, sino que ésta se incrementó al aumentar la concentración. Obtuvo que el colorante al 0.67% era tóxico para los organismos vivos y que éstos morían después de una hora de su aplicación. También hizo pruebas con el ácido sulfúrico, el hidróxido de sodio, el etanol, la congelación, la desecación y soluciones hipertónicas de cloruro de sodio y glucosa para matar a los nemátodos, y vio que el 98% se teñían en menos de una hora con la Eosina Y al 0.67%. De acuerdo a sus resultados, concluyó que antes de que se teñieran estos organismos primero deberían sufrir un daño fisiológico en su estructura al morir. Southey (39), recomendó que antes de fijar a los nemátodos se deberían de matar con calor a 100°C. Peláez (30), sometió a los ejemplares de la especie Dibulbiger longispiculis, parásito del intestino de la Rana montezumae, a la acción del clorhidrato de N,N-dimetil octadecilamina, para observar la penetración de los colorantes después del tratamiento. Formó cinco lotes con machos y hembras de la siguiente manera: en el lote A, aplicó una solución al 0.1% del compuesto hasta inmovilización total de los especímenes; en el lote B, organismos muertos por inmersión en solución salina al 0.6% a 70°C, y después, tratados con el compuesto a la misma concentración durante una hora; en el lote C, muertos de la misma manera que en el B, pero sin el medicamento; en el lote D, fijados con alcohol etílico al 70%

caliente y en el E, vivos con solución salina al 0.6% (testigos). De estos lotes se separaron 10 grupos y se sometieron a los colorantes Rojo - neutro y Carmin clorhídrico. Todos los grupos se mantuvieron en observación durante una hora y después se revisaron a las 6 y 24 horas de haberlos puesto en los colorantes. Los resultados fueron los siguientes: en los grupos A, B, y D, los colorantes tiñeron intensamente los órganos - internos, viéndose el líquido pseudocelómico fuertemente coloreado. Los del grupo C, apenas mostraron una pequeña tinción en la luz intestinal y los del grupo E, se mantuvieron vivos y con gran actividad a las 24 horas de haberlos sumergido en los colorantes. Concluyó que el compuesto químico actuó como un detergente disolviendo la delgada capa de lípidos de la cutícula aumentando su permeabilidad. No consideró que el calor pudo haber influido sobre sus resultados. Chitwood (3), afirma que D. dipsaci posee una "membrana" termolábil, soluble con disolventes para grasas. Trim (41), observó que la cutícula de Ascaris lumbricoides var. suís, actúa como una membrana semipermeable compuesta por lípidos, y la capa más externa de la cutícula probablemente se mantiene como una barrera a la penetración de medicamentos.

Algunos disolventes orgánicos son utilizados en Histología como deshidratantes o aclarantes. Por ejemplo, el etanol, el benceno, el éter de petróleo, etc. El benceno (36), aclara rápidamente haciendo al tejido transparente; provoca menos contracción que el xileno y el tolueno; tiene las desventajas de endurecer considerablemente el útero, el músculo y el tendón y de aclarar sólo en alcohol absoluto; puede ser peligroso para la salud de los técnicos de laboratorio después de exposiciones prolongadas y debe ser utilizado en cuartos con suficiente ventilación. El benceno (31), se obtiene a partir del alquitrán de hulla. Es una molécula poco polar y por lo mismo, tiene muy poca atracción por las moléculas polares, como el agua. El éter de petróleo (36), es una mezcla de hidrocarburos de bajo punto de ebullición, obtenidos a partir del petróleo. En Histología se usa como uno de los mejores aclarantes, no vuelve quebradizo al tejido después de una exposición prolongada en él, es excelente para los tejidos duros como el útero, el tendón y el músculo. Tiene la desventaja de ser flamable. El éter etílico (31), es muy común. No se emplea mucho como reactivo en síntesis orgánicas, sino más bien como disolvente y anestésico general. Se disuelve en el agua (7.5 g de éter por 100 g de agua a 20°C), y en compuestos de polaridad intermedia. Esta propiedad responde al principio químico que dice que "las moléculas iguales disuelven a las moléculas iguales por la similitud de sus fuerzas de atracción". Las sustancias aclarantes (36), tienen un alto índice de refracción y permiten que los tejidos se observen transparentes. Se utilizan entre el alcohol y el medio resinoso. El xileno es considerado como uno de los mejores aclarantes. Actúa rápidamente y no afecta los colorantes de Acridina. No disuelve la celoidina y se utiliza en tinciones progresivas. No es miscible en agua, pues en ella puede hacerse "lechoso"; es menos volátil que el benceno y más económico. Endurece más que el tolueno. Peláez (29), obtuvo muy buenos resultados al utilizar salicilato de metilo para aclarar fetos de mamíferos. Se disuelve en el alcohol, en el xilol y en la resina sintética. En la industria farmacéutica se utiliza para elaborar ungüentos y en los laboratorios de enseñanza, para aclarar especímenes biológicos.

CONSIDERACIONES SOBRE EL MONTAJE DE LOS NEMATODOS

Se ha visto que los nemátodos son difíciles de montar en medios resinosos permanentes, debido a que se contraen con los cambios bruscos de alcohol durante la deshidratación. Mucho se ha intentado para obtener preparaciones de esos organismos en medios de montaje permanentes adecuados para conservarlos sin que se modifique su estructura. Rubin (33), preparó un medio de montaje con 22 partes de ácido láctico, 22 partes de fenol y 56 partes de una solución compuesta por 15 gr de alcohol de polivinilo en 100 mililitros de agua destilada. Montó directamente a organismos de Ancylostoma caninum, Gongylonema pulchrum, Strongylus sp., Tridontophorus sp., Haemonchus contortus, Toxocara cati, Setaria equinus, Oxyuris equi, Sthephanurus dentatus, Ascarops strongylina, Heterakis gallinae, Physaloptera rara y Thelazia californiensis, y vio que las espículas, los gobernáculos, las bursas, las alas, los nódulos, las estructuras faríngeas, el esófago y sus valvas, las partes bucales y en algunos casos los órganos genitales, se observaron diferentes a lo normal. También montó huevecillos de nemátodos muertos y fijados en formol al 10% y huevecillos vivos removidos de la parte genital de las hembras, pero los que se fijaron con el formol sufrieron un cambio estructural. Notó que el material fijado era diferente al que se montó en vivo. La desventaja de este medio de montaje es que se tenía que revisar diariamente e hidratar con la misma solución para que las preparaciones no se secaran y, por lo tanto, los organismos no se contrajeran. Los nemátodos se fueron aclarando gradualmente hasta el punto en que, en especies como en A. caninum se destruyeron las estructuras internas. Consideró que podían variar las cantidades de los ingredientes de acuerdo a las necesidades de cada proceso de montaje. Seinhorst (34,35), utilizó un medio de montaje con glicerina anhidro. Los nemátodos previamente fijados con F.A.A. se colocaron en una mezcla compuesta por 20 partes de alcohol al 96%, 1 parte de glicerina y 79 partes de agua destilada. Se dejaron en la estufa a 35-40°C durante 12 horas. Después se les agregó otra mezcla compuesta por 5 partes de glicerina y 95 partes de alcohol al 96% y se dejó en la estufa a 40°C hasta que el alcohol se evaporó y quedó sólo la glicerina. Luego, se trasladaron a un desecador o se montaron directamente en glicerina. Observó que la glicerina tuvo la ventaja de disolverse tanto en el agua como en el alcohol, así como penetrar lentamente en el organismo. Sin embargo, las estructuras internas se hicieron granulares por la presencia del fijador. Se percató que si aplicaba directamente alcohol al 96% frío, los especímenes se contraían, pero al calentarlo no sucedía lo mismo. De Gris se (9,10), utilizó la misma técnica que Seinhorst con pequeñas modificaciones, obteniendo los mismos resultados. Ellenby(14), aseguró que el éxito de poder observar las estructuras de un organismo, dependía de la diferencia del índice de refracción entre el medio de montaje y el objeto de estudio. No obstante, los nemátodos son muy transparentes y la naturaleza refractaria de la cutícula limita la visibilidad de los órganos internos. Encontró que el plasma de buey igualaba el índice de refracción de la cutícula, por lo que pudo hacer observaciones más detalladas. Para inmovilizar a los organismos, agregó un narcótico (fenoxitol de propileno). Trabajó con larvas de los géneros Panagrellus y Heterodera. El plasma no se consideró como un medio de montaje permanente. Smith (38), preparó una solución acuosa al 70% de la resina Formaldehído de Dimetil Hidantoína (DMHF), y la aplicó de dos maneras: directamente a los nemátodos

vivos, los cuales permanecieron vivos durante 3 horas, después se fueron aclarando paulatinamente, haciendo observaciones hasta 36 horas, luego - de las cuales los nemátodos se contrajeron; segundo, los organismos vivos primero se narcotizaron con fenoxitol de propileno, se fijaron en TAF y se montaron en la resina. Se aclararon en pocas horas, sin embargo, se conservaron durante 18 meses con un pequeño encojimiento. Southey (39), utilizó como medios de montaje el lactofenol y la glicerina, considerando mejor a la glicerina porque da mayor claridad, en cambio, el lactofenol deteriora con el tiempo a los nemátodos. Calleja (1), afirmó que el encogimiento puede deberse a que los tejidos de los nemátodos son muy hidratados por lo que sugirió deshidratarlos con cambios muy graduales tal como se acostumbra hacer con los tejidos embrionarios.

CARACTERISTICAS DE LOS COLORANTES UTILIZADOS PARA TEÑIR HELMINTOS EN GENERAL, INCLUYENDO NEMATODOS

La mayoría de los colorantes usados para teñir células y tejidos, son artificiales y derivados del carbón mineral.

Los colorantes se clasifican de acuerdo a sus propiedades químicas en : ácidos, si poseen el grupo funcional nitro o quinona; y básicos, si tienen el grupo azo, azin o indoamino (16). Todos poseen una gran afinidad por el hidrógeno, sin embargo, si se hidrogenan, pierden el color. Un colorante ácido es aquel cuya propiedad de teñir reside en el anión (valencia negativa); de modo semejante, un colorante básico es el que tiene la propiedad de colorear con el catión (valencia positiva). Ambos tipos de colorantes conservan su naturaleza aniónica o catiónica dentro del rango normal del pH usado en la tinción.

El Carmín (4), se obtiene del cuerpo seco de las hembras del insecto Dactylopius cacti (cochinilla); vive en las plantas suculentas de América Central. Se pueden encontrar cuatro clases de Carmín: el Carmín (extracto puro), el Carmín alcalino, el carmalumbre y el ácido Carmínico. Los dos primeros se usan muy poco. El Carmín alcalino posee el anión y tiñe difusamente a las estructuras cargadas positivamente, pero - puede mejorar la coloración se se aplica una solución ácida para diferenciar. Los Carmines que están cargados positivamente tiñen el núcleo y otras sustancias cargadas negativamente. Por ejemplo, el acetocarmín, se utiliza mucho para teñir el material cromosómico. El ácido Carmínico se obtiene calentando el cuerpo de la cochinilla con agua, y después de una purificación química, se extrae con benceno. Su peso molecular es 492.402 es un ácido dibásico fuerte y forma sales en solución con metales alcalinos, pero no sucede lo mismo con metales pesados. El Carmín es más económico que el ácido Carmínico puro, y cuando se combina con cloruro de aluminio, forma el mucicarmín. Estos colorantes tienen un extenso uso en la química analítica, en la industria farmacéutica y de alimentos y en micro técnicas biológicas.

La hematoxilina (11), se extrae de la madera de Haematoxylon campechianum (un árbol), es originario de México y se cultiva también en Jamaica. Se utiliza mucho en Histología, y para tener buenos resultados, se tiene que oxidar para transformarse en hemateína, ya sea por contacto

con el aire, con un mordente o con una sustancia oxidante como el iodato de sodio o el óxido de mercurio. La costumbre ha impuesto el término hematoxilina, cuando lo correcto sería hablar de hemateína. La hematoxilina es la materia prima, mientras que la hemateína es el ingrediente químicamente activo. El peso molecular de la primera es 302.288 y el de la segunda 300.272. Como existen muchas fórmulas para preparar la hemateína, cada una de ellas lleva el nombre del autor que utiliza determinada sal metálica para oxidarla. Por ejemplo, el hemalumbre de Mayer (8), lleva alumbre de amonio o de potasio; la hematoxilina de Harris (8), con la misma alumbre y además, óxido de mercurio; la hematoxilina de Delafield (8), - con alumbre de amonio y glicerol y la hemateína de Roudabush (29), con sulfato aluminico potásico. La combinación del mordente con la hemateína trae como consecuencia la formación de una carga positiva que hace que - el colorante se comporte como un catión.

La hematoxilina es muy importante en las tinciones biológicas. Es un colorante versátil y tiñe intensamente el núcleo, las estructuras mitóticas, la mielina, las fibras elásticas, la fibrina, la neuroglia, - las estriaciones musculares, ciertos leucocitos granulados, las mitocondrias, la mucina, la hemoglobina, el colágeno, los axones, los fosfolípidos, los protozoarios, los ácidos grasos, las células alfa y beta de la pituitaria y los islotes pancreáticos. tiene una excelente propiedad policrómica que permite observar diferentes matices de azul y rojo en una sola preparación (4). Sin embargo, no diferencia al ácido nucleico del ácido desoxirribonucleico. La hematoxilina a menudo se combina con la - Eosina para dar un mayor contraste.

La Eosina es un colorante artificial rojo y se aplica en material fijado, tiñe el tejido conectivo y el citoplasma. Varía mucho en intensidad y matiz. Se utiliza mucho junto con la hematoxilina y de esa manera forma parte de una técnica rutinaria en Histología. La Eosina deriva de la fluorescina y se encuentra en forma pura; el color que da es - amarillo o azulado (o un rojo intenso). La Eosina Y (amarillenta), se dissuelve comúnmente en agua o en alcohol, siendo al 5% la solución más recomendada. Su peso molecular es 691.906.

PAPEL DEL TAF EN LA FIJACION DE LOS NEMATODOS

El objetivo de la fijación es coagular o precipitar las proteínas del protoplasma. Un buen fijador penetra y mata rápidamente el tejido, conservando sus elementos, particularmente el núcleo, para que no se altere cuando pase por los procesos de la técnica histológica.

Según Courtey (6), las diluciones rutinarias de fijación no han sido satisfactorias en preparaciones con nemátodos del suelo y parásitos. La solución más fuerte (1 parte de formol comercial y 8 partes de agua), fué muy rigurosa para conservar la apariencia vital de estos organismos, mientras que una solución muy débil (1 parte de formol por 16 partes de agua), disminuyó la dureza del tejido. La mejor concentración fué una - parte de formaldehído en 13 partes de agua.

Las soluciones de formalina pueden contener ácido fórmico, que deteriora la apariencia natural de la imagen fijada. Consecuentemente, se emplearon varios métodos para obtener soluciones de formalina libres

PRINCIPALES ESTRUCTURAS DE LOS NEMATODOS

- 1.- Cabeza (en donde se localizan los labios)
- 2.- Cápsula bucal
- 3.- Estilete
- 4.- Procorpus
- 5.- Bulbo esofágico medio
- 6.- Anillo nervioso
- 7.- Bulbo basal o glandular
- 8.- Intestino
- 9.- Recto
- 10.- Extremo caudal
- 11.- Ovario (s)
- 12.- Espermateca (s)
- 13.- Oviducto (s)
- 14.- Huevecillo (s)
- 15.- Utero
- 16.- Vagina
- 17.- Testículo
- 18.- Espermatoцитos
- 19.- Vesícula seminal
- 20.- Vaso deferente
- 21.- Espículas
- 22.- Gobernáculo
- 23.- Cloaca
- 24.- Células musculares
- 25.- Saco uterino
- 26.- Cutícula

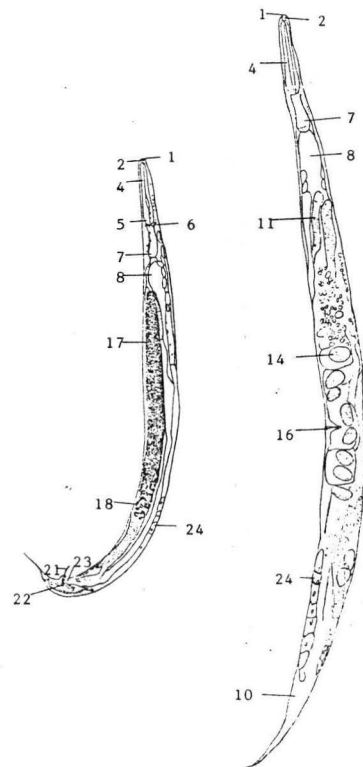


FIGURA No. 1. Macho y hembra de la familia Rhabditidae. Dibujo realizado con cámara clara.

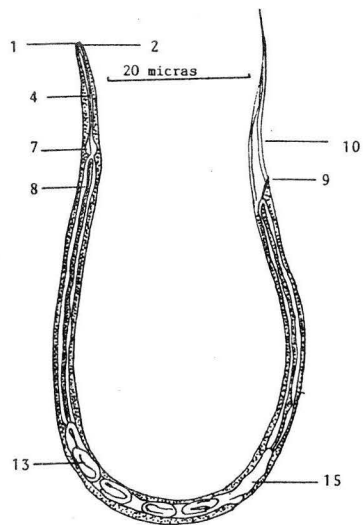


Figura No. 2. Turbatrix aceti . Hembra.
 (según Müller, 1783) Dibujo tomado de Goodsey, 1963

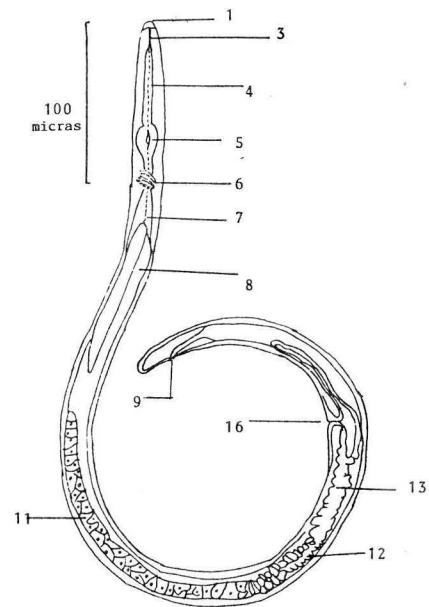


Figura No 3. Aphelenchus avenae . Hembra.
 Según Hooper, 1965.

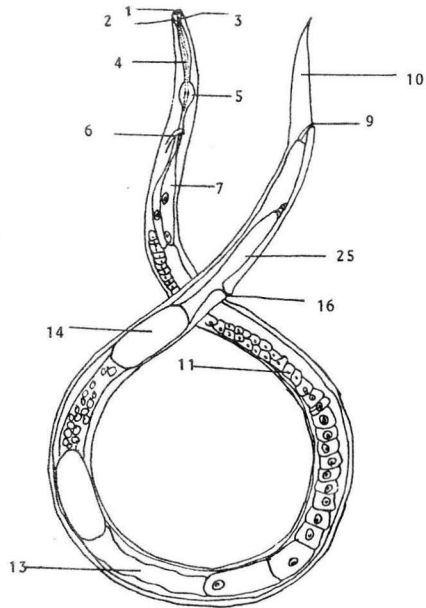


Figura No. 4 . Ditylenchus dipsaci . Hembra. Dibujo según Thorne, 1961.

100 micras

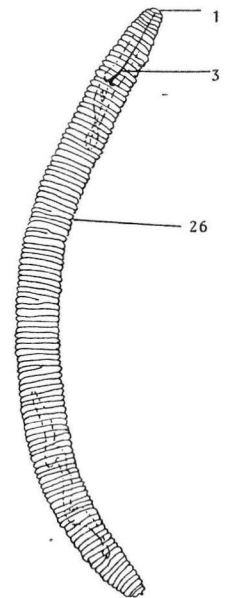


Figura No.5 . Criconemoides morgensis. Dibujo según Taylor, 1936.

de este ácido. El bicarbonato de sodio, que es una base débil, se utilizó para neutralizar dichas soluciones, sin embargo, formó cristales cuando el solvente se evaporó o se enfrió. Se prepararon soluciones muy diluidas de trietanolamina para probar su toxicidad y se colocaron nemátodos vivos, parásitos de los tallos y los bulbos de las plantas, y permanecieron activos por varias horas. Los organismos se fijaron y se endurecieron sin quebrarse y permanecieron así durante dos años. El TAF (trietanolamina-agua-formol), fué el resultado del estudio anterior y tiene la propiedad de mantenerse estable por mucho tiempo. Se recomienda para la rutina diaria, por su fórmula simple, conservadora de las cualidades de los nemátodos. Se observó que cuando se dejaban destapados los recipientes que contenían a los organismos fijados en TAF, el líquido se reducía por la evaporación quedando solamente la trietanolamina con los nemátodos intactos. Courtney recomendó que para fijar a los nemátodos, primero se sacrificaran con agua caliente y luego se les agregara el TAF. Locquin (24), afirma que el tiempo óptimo de fijación en formol es de 24 horas, aunque depende del tipo de muestra y de su volúmen. Es importante no sobrepasar un tiempo máximo a fin de evitar que la muestra presente alteraciones y pierda la afinidad hacia algunos colorantes. El formol, si previamente se ha neutralizado, puede conservar, sin alterar, los especímenes por varios años.

III. PLANTEAMIENTO DE LOS PROBLEMAS

1.- Los nemátodos de vida libre y parásitos de plantas, ofrecen dificultades severas para montarse en medios permanentes debido a que se contraen irreversiblemente con los cambios bruscos de alcohol durante la deshidratación.

2.- Debido a que la cutícula de los nemátodos es selectivamente permeable, no acepta con facilidad la entrada de los colorantes para que éstos puedan teñir su interior, a menos que el uso de mecanismos físicos y/o químicos favorezcan el proceso.

3.- Generalmente las muestras de nemátodos que se encuentran en el laboratorio, permanecen por mucho tiempo en el fijador, lo cual puede alterar los tejidos de estos organismos y provocar que no tengan afinidad por algunos colorantes.

IV. OBJETIVOS

1.- Evaluar el proceso de deshidratación gradual con alcohol, incorporado a una técnica de montaje permanente en resina sintética de nemátodos fitoparásitos y de vida libre.

2.- Evaluar la tinción de los nemátodos fitoparásitos y de vida libre, en base al grado de penetración de los colorantes naturales a través de la cutícula tratada con solventes orgánicos.

3.- Conocer la influencia del tiempo de fijación con TAF sobre el nivel de tinción de los nemátodos fitoparásitos y de vida libre.

4.- Contribuir con elementos que enriquezcan las técnicas de tinción y montaje permanente de nemátodos fitoparásitos y de vida libre, utilizados para fines docentes y de diagnóstico.

V. METODO

Para homologar las técnicas, se utilizaron nemátodos saprófitos de vida libre por la facilidad de poderlos cultivar en el laboratorio. Una vez homologadas las técnicas, se probaron en D. dipsaci.

Los rhabditidos saprófitos se cultivaron en el laboratorio en cajas de petri que contenían un medio de cultivo preparado con Base de Agar Sangre (31), a temperatura ambiente. Los d.dipsaci se obtuvieron de cabezas de ajo infestadas, originarias del Estado de Durango.

Los nemátodos se extrajeron utilizando el método del embudo de Baerman (31). Las colectas se hicieron cada 5,12 y 24 horas, dependiendo de los organismos que se sedimentaron. Las muestras se colocaron en frascos de doble tapón y con una capacidad de 10 mililitros cada uno. Una vez sedimentados, se cambió el agua con una pipeta Pasteur 4 ó 5 veces.

FIJACION

Antes de fijar a los nemátodos, primero se sacrificaron con calor, sumergiendo el frasco en baño María a 60°C durante 2 minutos o hasta que se observó que ya no tenían movilidad, esto con la finalidad de que no quedaran enrollados. Se dejaron enfriar durante 20 minutos y en seguida, se les agregó fijador TAF (6,22), en un volumen igual al que se tenían en agua. De esta manera, el fijador quedó diluido aproximadamente al 50%.

Debido a que los rhabditidos saprófitos son muy abundantes, se seleccionaron cuatro tiempos diferentes de permanencia en el fijador, los cuales fueron: 6, 12, 24 y más de 24 horas (aproximadamente 4 meses). Los D.dipsaci se fijaron durante 6 horas. Por encontrarse disponibles en el laboratorio los organismos de las especies Aphelenchus avenae, Turbatrix aceti y Criconemoides sp. se fijaron por 6 horas. Después de la fijación, los organismos se lavaron con agua corriente durante 48 horas, haciendo tres cambios durante este intervalo de tiempo. Un grupo de rhabditidos saprófitos y otro de D.dipsaci se consideraron como testigos y los restantes como experimentales, los cuales, fueron sometidos a un tratamiento con solventes orgánicos previo a la tinción.

TRATAMIENTO CON SOLVENTES ORGANICOS

Se utilizaron tres solventes orgánicos, tomando en cuenta sus propiedades de solubilidad: el éter, miscible en agua y en alcohol; el éter de petróleo y el benceno, solubles en alcohol. Como los colorantes

que se aplicaron a los organismos después del tratamiento, actuaron en un medio acuoso o alcohólico, se aprovechó esta situación para preparar dichos solventes en los alcoholes inmediatos a la tinción, los cuales fueron al 30% y al 90%. Como éstos contienen una determinada cantidad de agua, se usó una proporción de 9 partes de alcohol por 1 parte de solvente para no afectar la solubilidad sobre todo, del éter de petróleo y del benceno, y se prefirió que éstos se mezclaran en el alcohol más concentrado (al 90%).

Considerando que el problema del retorcimiento de los nemátodos se debe a los cambios bruscos de alcohol, se deshidrataron gradualmente hasta llegar a los alcoholes al 30% y al 90%. Esto dió como resultado la formación de dos grupos:

GRUPO 1. Formado por los organismos que se deshidrataron gradualmente comenzando por el alcohol al 3% hasta el alcohol al 30%, usando una solución alcohólica 3% más concentrada en cada cambio sucesivo.

GRUPO 2. Formado por los organismos que se deshidrataron gradualmente hasta el alcohol al 30% y continuando con el de 32% hasta el de 90%, usando una solución alcohólica 2% más concentrada en cada cambio sucesivo.

Terminada la deshidratación, se aplicaron las mezclas con solvente orgánico en los grupos experimentales como sigue:

GRUPO 1. Mezcla de alcohol al 30% y éter (9:1).

GRUPO 2. $\left\{ \begin{array}{l} 2.1. \text{ Mezcla de alcohol al } 90\% \text{ y éter (9:1)} \\ 2.2. \text{ Mezcla de alcohol al } 90\% \text{ y éter de petróleo (9:1).} \\ 2.3. \text{ Mezcla de alcohol al } 90\% \text{ y benceno (9:1)} \end{array} \right.$

Se seleccionaron tres tiempos de permanencia en la mezcla para los rhabditos saprófitos: 48, 72 y 96 horas. Los D. dipsaci permanecieron durante 96 horas, al igual que A. avenae, T. aceti y Criconemoides sp.

MÉTODOS DE TINCIÓN UTILIZADOS

La hematoxilina y el acetocarmin son los colorantes que más frecuentemente se utilizan para teñir hemintos (33). Por esa razón se seleccionaron dichos colorantes para colorear a los nemátodos. Son varias las hematoxilinas que se recomiendan: la hematoxilina de Delafield, la de Harris, el hemálumbre de Mayer y la hemateína de Roudabush. Todas ellas contienen diferentes clases de mordentes (4,16 y 36), y generalmente actúan en un medio acuoso. En cambio, el acetocarmin, por lo general, se aplica en medios alcohólicos (4).

Las hematoxilinas se diluyeron al 5% en alcohol al 30%, debido a que, las muestras de los grupos experimentales, quedaron en esa concentración de alcohol al terminar el tratamiento, y no se rehidrataron para evitar que se maltrataran al pasar otra vez por los cambios de alcohol.

De la misma manera, se consideró que esta solución débil no afectaría el fenómeno de tinción. El acetocarmin se diluyó al 1% en alcohol al 90%, puesto que en esta concentración quedaron los nemátodos después del tratamiento. A los testigos también se les aplicó de la misma manera los colorantes .

Para observar si se obtenía un mayor contraste en los rabaditidos saprófitos, se realizó la tinción combinada con cada una de las hematoxilinas y la Eosina amarillenta al 1% en alcohol al 90%, este colorante se aplicó después de que los organismos se tiñeron con la hematoxilina - en el alcohol al 30%.

Debido a que los resultados de la tinción con hematoxilina y - acetocarmin fueron positivos en los rabaditidos saprófitos, los colorantes que se usaron para D. dipsaci nadamás fueron: hematoxilina de Delafiel y de Roudabush, hemalumbre de Mayer y acetocarmin. La Eosina amarillenta - se prefirió usarla sola. Para los organismos de las especies A. avenae, T. acetii y Ciconemoides sp. se usaron todas las hematoxilinas y el acetocarmin individualmente.

DESHIDRATACION

La deshidratación fué siempre gradual. Primero se comenzó por el alcohol al 3% hasta el de 30%, usando una solución alcohólica 3% más concentrada en cada cambio sucesivo, y se continuó con el alcohol al 32% hasta el absoluto, usando una concentración alcohólica 2% más concentrada en cada cambio sucesivo. Se hicieron cuatro cambios de alcohol absoluto. Cada cambio tuvo una duración de 40 minutos.

DECOLORACION Y VIRAJE

Los organismos que se tiñeron intensamente se decoloraron un poco con una solución de alcohol al 98% acidulado (HCl al 1% en alcohol al 98%). Se prefirió hacer la decoloración en ésta alta dilución porque se observó que en las concentraciones menores, el color de la tinción viraba a un tono muy oscuro. El viraje se realizó con una solución de alcohol al 98% alcalino (carbonato de litio al 1% en alcohol al 98%).

ACLARAMIENTO Y MONTAJE

El aclaramiento se hizo en dos partes. En la primera, se prepararon diez mezclas de alcohol etílico absoluto con salicilato de metilo en las siguientes proporciones: 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 y 1:9, con dos cambios de salicilato de metilo absoluto. En la segunda, se prepararon diez mezclas de salicilato de metilo con xilol en las mismas proporciones anteriores. Se hicieron dos cambios de xilol absoluto. Esta combinación la recomienda Peláez (29), para obtener un mejor aclaramiento de los especímenes. Antes de pasar a los nemátodos directamente del xilol a la resina sintética, se pasaron por tres mezclas más compuestas - por xilol y resina sintética en las proporciones : 4:1, 4:2 y 4:3, terminando con resina sin diluir. Esto con el objeto de que no se retorciaran al pasarlos del xilol a la preparación con resina. Los organismos se montaron en bloque.

VI . RESULTADOS

FIJACION

Se obtuvieron buenos resultados de la fijación de los nemátodos que permanecieron en TAF durante 6, 12 y 24 horas, ya que las observaciones que se hicieron de las preparaciones periódicamente durante más de un año, evidencian que no hubo cambios aparentes en su estructura. Al matarse con calor, los nemátodos quedaron bien extendidos y se mantuvieron así permanentemente después de que se les agregó el fijador TAF.

TINCION

Se obtuvieron los resultados que se muestran en las tablas 1-A, 1-B, 2, 3, 4-A, 4-B, 5 y 6.

La intensidad de la tinción se anotó como : X= poca, XX= media na y XXX= fuerte.

La cantidad de masa del cuerpo teñida: en % aproximado, es decir, el valor se obtuvo calculando el % del área aproximada de cada órgano teñido, con respecto al % total de la masa corporal, sobre los dibujos que se hicieron en cámara clara.

Los criconemátidos no se tiñeron, y los A.avenae y T.aceti se tiñeron con poca intensidad y en menos del 30% de masa corporal.

La tabla No. 7 muestra los resultados de la coloración en órganos de los rabaditidos y de D. dipsaci.

MONTAJE

Los nemátodos nose encogieron con la deshidratación gradual y se obtuvo un buen aclaramiento con el salicilato de metilo y el xilol. El embebimiento de los especímenes en resina sintética facilitó su montaje. La resina secó rápidamente. Algunos organismos se destiñeron después de dos meses de su montaje en resina sintética, mismos que aparecen en las tablas de resultados con la letra "d" .

VII . DISCUSION

FIJACION

Se observó una tendencia general a la disminución del porcentaje de la masa corporal teñida y de la intensidad en rabaditidos saprófitos que duraron más de 24 horas en TAF. Este resultado concuerda con las afirmaciones de Locquin, al decir que no es conveniente sobrepasar un tiempo máximo en el fijador, a fin de evitar que la muestra presente alteraciones y pierda la afinidad por algunos colorantes. Sin embargo, hubo una excepción en los testigos: los rabaditidos que se tiñeron con acetocarmin (Tabla No. 1-A), tuvieron un ligero incremento en el porcentaje de la ma

TABLA 1-A.TESTIGOS. Rabbiditos saprófitos sin tratamiento con solventes orgánicos

t TAF	D		H		M		R		C	
	I	%	I	%	I	%	I	%	I	%
6	x	80	x	70	x	70	xx	70	xx	70
12	d		xx	80	x	70	x	50	xx	80
24	d		xx	60	d		xx	50	xx	80
+24	d		d		d		d		xx	80

TABLA 2. GRUPOS EXPERIMENTALES. Rabbiditos saprófitos que permanecieron 48 horas en solventes orgánicos

t TAF	D		H		M		R		C	
	I	%	I	%	I	%	I	%	I	%
6	xx	90	xx	60	xx	80	xxx	85	xx	80
12	xx	80	xx	70	x	60	xx	70	d	
24	xx	80	xx	50	xx	60	xx	70	d	
+24	xx	80	xx	50	xx	50	xx	60	x	50

TABLA 3.GRUPOS EXPERIMENTALES. Rabbiditos saprófitos que permanecieron 72 horas en solventes orgánicos

t TAF	D		H		M		R		C	
	I	%	I	%	I	%	I	%	I	%
6	xx	90	xx	80	xx	80	xx	90	xx	80
12	xx	90	xx	60	xx	70	xx	80	x	60
24	xx	70	xx	50	x	50	x	50	xx	50
+24	xx	70	x	50	x	50	xx	60	x	50

TABLA 4-A.GRUPOS EXPERIMENTALES. Rabbiditos saprófitos que permanecieron 96 horas en solventes orgánicos

t TAF	D		H		M		R		C	
	I	%	I	%	I	%	I	%	I	%
6	xx	85	xx	85	xx	60	xxx	80	xx	70
12	xx	80	xx	70	xx	70	xx	70	x	60
24	xx	60	xx	60	xx	60	xx	70	x	60
+24	xx	60	xx	60	x	50	xx	60	x	60

D = hematoxilina de Delafield
M = hemalumbre de Mayer
C = acetocarmin

H = hematoxilina de Harris
R = hemateína de Roudabush
I = intensidad

&=porcentaje de masa corporal
d = desteñidos (tinción temporal)
t = tiempo en horas

TABLA 1-B. TESTIGOS. Tinción combinada en rabbitidos saprófitos que no se sometieron al tratamiento con solventes orgánicos

t TAF	D - E		H - E		M - E		R - E	
	I	%	I	%	I	%	I	%
6	d		xx	60	xx	80	xx	50
12	d		xx	80	xx	80	x	50
24	d		xx	60	xx	70	x	50
+24	d		d		d		d	

TABLA 5. TESTIGOS. Ditylenchus dipsaci sin tratamiento con solventes orgánicos y fijados en TAF durante 6 horas

D		M		R		C		E	
I	%	I	%	I	%	I	%	I	%
st		st		xx	80	st		st	

D = hematoxilina de Delafield
H = hematoxilina de Harris
M = hemalumbre de Mayer
R = hemateína de Roudabush
C = acetocarmín
E = Eosina amarillenta

TABLA 4-B. GRUPOS EXPERIMENTALES. Tinción combinada en rabbitidos saprófitos sometidos a la acción de solventes orgánicos durante 96 horas y que permanecieron 6 horas en TAF

	D - E		H - E		M - E		R - E	
	I	%	I	%	I	%	I	%
	xx	90	xx	80	x	50	xxx	90

TABLA 6. GRUPOS EXPERIMENTALES. Ditylenchus dipsaci sometidos al tratamiento con solventes orgánicos durante 96 horas y en TAF 6 hrs.

D		M		R		C		E	
I	%	I	%	I	%	I	%	I	%
xx	50	xx	50	xx	80	x	50	st	

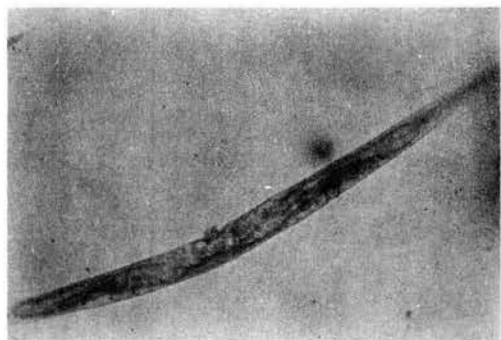
st = sin teñir
d = desteñidos (tinción temporal)
t = tiempo en horas
I = intensidad de tinción
% = porcentaje de masa corporal teñida

TABLA 7. Intensidad de tinción en órganos de los nemátodos utilizados
 x = poca, , xx = mediana , xxx = fuerte

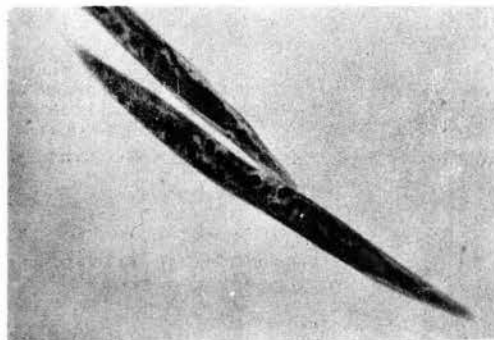
	familia Rhabditidae										<u>D.dipsaci</u>				
	D	H	M	R	C	DE	HE	ME	RE	D	M	R	C	E	
PROCORPUS	x			x	x	xx	x		x						
BULBO ESOFAGICO MEDIO	x			x	x	xx	x		x			xx			
NUCLEOS DE LAS CEL DEL ANILLO NERV.	x			xx											
BULBO BASAL O GLANDULAR	xx	x	x	xx	x	xx	x		x	x	xx	xx	x		
EXTREMO CAUDAL	x		x	x								x	x		
OVARIOS	xx	xx	xx	xx	xx	xx	x		xx	xx	xx	xx	x		
HUEVECILLOS	x	x	xx	xx	xx	x	xx	xx	xxx			xx	x		
TESTICULO Y ESPERMATOCITOS	xx	xx	xx	xxx	xx	xx	xx	x	xx			xx			
VESICULA SEMINAL	x	x		xx	x	x						x			
SACO UTERINO												x			
VASO DEFERENTE	xx	xx	x	xx	xx				xx						
CELULAS MUSCULARES	x	x		x											

D = hematoxilina de Delafield, H = hematoxilina de Harris, M = hemalumbre de Mayer , R = hemateína de Roudabush , C = acetocarmin , E = Eosina amarillenta

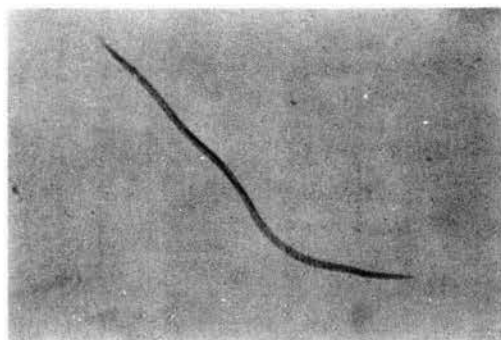
Como puede observarse en la tabla, las hematoxilinas y el acetocarmin tiñeron frecuentemente el bulbo basal o glandular, los ovarios, los huevecillos, el testículo, los espermatozoides y el vaso deferente en los rhabditidos. La hemateína de Roudabush fué el mejor colorante para teñir el aparato reproductor y el digestivo en D. dipsaci.



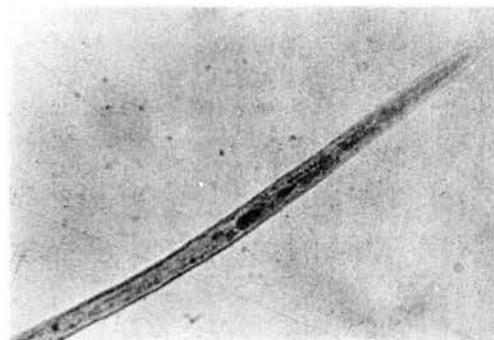
MICROGRAFIA de un rabditido saprófito TESTIGO, sin tratamiento con solventes orgánicos y teñido con hematoxilina (aumento con seco débil)



MICROGRAFIA de un rabditido saprófito del GRUPO EXPERIMENTAL, sometido al tratamiento con solventes orgánicos y teñido con hematoxilina (aumento con seco débil)



MICROGRAFIA de D. dipsaci, sometido al tratamiento con solventes orgánicos y teñido con hematoxilina. (aumento con seco débil)



MICROGRAFIA de D. dipsaci, sometido al tratamiento con solventes orgánicos y teñido con hematoxilina. Parte anterior (aumento con seco fuerte)

sa corporal teñida, conservando su intensidad. Esto probablemente se deba a que el ácido acético que está mezclado con el Carmin, es un ácido débil y en solución puede formar iones hidronio que pueden ser atraídos por algunos tejidos que conserven la carga opuesta, aunque el fijador ha ya precipitado sus proteínas.

Al parecer, los tiempos menores de 24 horas de permanencia en TAF, son adecuados y permiten la fijación de la mayoría de los tejidos de los nemátodos. Quizá porque son organismos muy pequeños y delgados, y además, porque las observaciones periódicas que se realizaron durante más de un año, evidencian que no hubo cambios aparentes en su estructura.

La distribución aleatoria de las muestras que se destiñeron algunos meses después de su montaje (Tablas 1-A, 1-B y 2), hace pensar que la causa puede ser la presencia de algún tipo de contaminación o que la resina haya sido ligeramente ácida.

TINCIÓN

La tinción de los nemátodos se pudo evaluar en base a la penetración de los colorantes a través de la cutícula. Esto se logró gracias a que, de varias maneras, se modificó su permeabilidad. La primera de ellas, fué la influencia que pudo haber tenido el calor cuando se sacrificaron a los organismos antes de fijarlos, lo que provocó seguramente la desnaturalización de las proteínas corporales de los nemátodos. La segunda, fué la aplicación de solventes orgánicos, los cuales, probablemente actuaron disolviendo la capa de lípidos de la cutícula y quizá también contribuyeron a que las proteínas se desnaturalizaran más. Esto permitió la entrada de los colorantes, preferentemente los de bajo peso molecular entre los que se utilizaron, como la hematoxilina y el acetocarmin. Lo anterior se relaciona con las observaciones de Peláez con respecto al clorhidrato de N,N-dimetiloctadecilamina (un antihelmíntico), que actuó como "detergente" disolviendo dicha capa lipídica. En el caso de la hematoxilina de Delafield, se notó un aumento en la intensidad de la tinción y en el valor de la masa corporal coloreada en los rabaditidos que permanecieron 48 y 72 horas en la mezcla de solventes orgánicos. El porcentaje fué ligeramente menor en los que permanecieron 96 horas. La cantidad de masa corporal teñida con hematoxilina de Harris, aumentó al incrementarse el tiempo de exposición al tratamiento y por consiguiente, la intensidad también se elevó un poco. Los organismos teñidos con hemalumbre de Mayer se comportaron de manera similar, solo que se notó un mayor aumento en la intensidad de la tinción en los grupos experimentales, con respecto a los grupos testigo, aunque las diferencias hayan sido pequeñas entre los organismos que permanecieron 72 y 96 horas en el tratamiento. De la misma manera, la mezcla de solventes orgánicos favoreció la penetración de la hematoxilina de Roudabush a través de la cutícula de los rabaditidos saprófitos, aumentando la intensidad de la tinción de los órganos y el porcentaje de la masa corporal coloreada. Sin embargo, no sucedió así con el acetocarmin, puesto que la intensidad y el valor de la cantidad de la masa corporal teñida, disminuyeron conforme aumentó el tiempo de exposición al tratamiento. Probablemente ésto se deba a que los solventes orgánicos hayan desnaturalizado aún más a las proteínas

de todo el organismo, haciendo que muchas de éstas pierdan la afinidad por los iones que forma el ácido acético mezclado con el Carmín.

El efecto de los solventes sobre la permeabilidad de la cutícula también se notó en la tinción combinada de los rabditidos. El incremento de la intensidad y del porcentaje de la masa corporal de las hematoxilinas, concuerda con los resultados anteriores. Sin embargo, se pudo apreciar el color violáceo predominante de la hematoxilina y muy poco el rosado de la Eosina amarillenta. Será que el peso molecular de este colorante es dos veces mayor que el de la hematoxilina, y por lo mismo, tuvo mayor dificultad para penetrar a través de la cutícula, aunque ésta se haya sometido al tratamiento con solventes orgánicos. Este hecho se ve reforzado con los resultados negativos de la tinción con Eosina amarillenta en los grupos testigo y en los experimentales de *D. dipsaci*, y se contraponen a los encontrados por Chaudhuri, quien afirmó que la tinción de los nemátodos se incrementaba al aumentar la concentración de la Eosina Y (amarillenta). La diferencia entre estos resultados probablemente consista en que se utilizaron diferentes especies y según Chitwood, la permeabilidad de los nemátodos varía con las formas y hábitos de vida de las especies. La permeabilidad de la gruesa cutícula de los criconemátidos, no se modificó aparentemente, aunque se hayan expuesto a la acción de los solventes orgánicos. Quizá requirieron de un tiempo mayor de permanencia en el tratamiento o la intervención de alguna enzima proteolítica sobre su cubierta para aumentar su permeabilidad y permitir la penetración de los colorantes.

La hematoxilina de Delafield, el hemalumbre de Mayer y el acetocarmín, no penetraron a través de la cutícula de los *D. dipsaci* testigos; sin embargo, si lo hicieron en los experimentales, probablemente por el efecto de los solventes orgánicos sobre éstos. La hematoxilina de Roudabush tiñó de la misma manera a los grupos testigo y experimentales pero es probable que los organismos del grupo testigo hayan sufrido alguna fisura en su cutícula, debido a su fina estructura, y por ahí pudo haber penetrado el colorante.

Tanto la hematoxilina como el acetocarmín, tiñeron preferentemente el aparato reproductor y el digestivo. Los ovarios, el testículo, los espermatocitos y los huevecillos embrionados, se tiñeron intensamente de violeta, lo que confirma que en estos órganos, formados por muchas células en división, se lleva a cabo una gran actividad de los ácidos nucleicos, los cuales tienen afinidad por los colorantes básicos utilizados.

La ventaja que tiene utilizar hematoxilina para teñir a los nemátodos, es la diferenciación que da de los órganos reproductores y digestivos. Estas estructuras son importantes para la identificación de las diferentes especies existentes. La desventaja que representa la técnica completa de tinción y montaje permanente que se hizo, es que se requiere de mucho tiempo para obtener preparaciones duraderas, haciendo un gran número de cambios de soluciones. Sin embargo, si sólo se quiere hacer la tinción y no el montaje, se puede llegar hasta la hematoxilina. Otros autores como Rodríguez-Kabana y Kostyuk, reportan una tinción diferencial de los órganos reproductores, pero no realizan un montaje permanente.

MONTAJE

En general, se observaron buenos resultados con la deshidratación gradual de los nemátodos, tal como lo sugirió Calleja. Los organismos no se contrajeron y se pueden observar bien sus estructuras. La ventaja que tiene la forma de deshidratar lentamente es que se puede utilizar casi cualquier medio permanente de montaje. El resultado fué la obtención de preparaciones duraderas. No se presentaron los problemas a los que se enfrentó Ellenby con el plasma de buey, pues resultó no ser un medio permanente, o Rubin, con el alcohol de polivinilo, pues tenía que estar hidratando periódicamente las preparaciones para que no se secaran. El aclaramiento de los nemátodos con el salicilato de metilo y el xilol, mejora la nitidez de las observaciones de los nemátodos y evita que se vean "granulosas" sus estructuras, como sucedió con los ejemplares montados con la técnica de Seinhorst en glicerina anhidro. El inconveniente de la resina sintética es que puede ser ligeramente hácida y por lo mismo, decolora a los organismos teñidos con hematoxilina. Lo conveniente es utilizar un medio de montaje permanente que sea neutro, como el euparal.

VIII. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye lo siguiente:

* El tiempo de fijación óptimo para los nemátodos se encuentra en el rango de 6 a 24 horas.

* Un tiempo mayor a las 24 horas puede provocar la disminución de la afinidad de las estructuras por los colorantes.

* La aplicación de solventes orgánicos sobre los nemátodos muertos por calor, afecta apreciablemente la permeabilidad de la cutícula - permitiendo la entrada de los colorantes, preferentemente los de bajo peso molecular, por lo que es recomendable su utilización.

* El calor es un factor que también aumenta la permeabilidad de la cutícula de los nemátodos, desnaturalizando sus proteínas.

* La estructura que mayor afinidad ofrece a las tinciones empleadas, es el aparato reproductor, por lo que su diferenciación resulta de utilidad práctica para fines diagnósticos.

* La combinación de la hematoxilina con la Eosina amarillenta no mejora el contraste con las estructuras de los rabaditidos saprófitos.

* Las técnicas de tinción no son recomendables para los crico-nemátodos, sin embargo, la de montaje si es favorable.

* El uso de la técnica de deshidratación gradual con alcohol, impide la contracción de los nemátodos, favoreciendo su montaje de manera permanente.

IX. A P E N D I C E

METODO DE CULTIVO PARA NEMATODOS SAPROFITOS(21)

Mezclar los siguientes reactivos y calentar a fuego lento sin dejar de mover: 2g de Base de Agar Sangre, 1.5g de extracto de carne, 2.5g de Peptona, 15g de Agar y 1 lt de agua dest. Esterilizar a 15 lb de presión durante 15 min. Envasar en cajas de petri (20 ml c/u) y dejar enfriar. Hacer una extracción de nemátodos del suelo por la técnica del embudo de Baerman y seleccionar 20 rabbitidos para cada caja de petri. A las 48 horas, añadir 2 ml de agua y una pisca de penicilina cristalizada. Revisar periódicamente las cajas inoculadas. Agregar unas gotas de agua si se requiere. A los 8 días hacer una extracción de nemátodos por medio del embudo de Baerman.

HEMATOXILINA DE DELAFIELD

Añadir poco a poco una solución de 1g de cristales de hematoxilina en 10ml de alcohol etílico absoluto a 100 ml de otra solución acuosa saturada de alumbre (sulfato aluminico amónico), y se deja madurar algunos días a la luz hasta que se oxide la hematoxilina. Después se filtra y se añade en el momento en que se vaya a usar: 25 ml de glicerina y 25 ml de alcohol metílico absoluto.

HEMALUMBRE DE MAYER

Mezclar las siguientes sustancias: 1 lt de agua destilada, 1g de hematoxilina cristalina, 0.2g de iodato de sodio y 50g de alumbre potásica. Dejar disolver a la temperatura ambiente hasta que tenga un color violáceo, lo que indica que la oxidación de la hematoxilina es total.

HEMATEINA DE ROUDABUSH

Solución A: 25g de sulfato aluminico potásico y 500 ml de agua destilada. Solución B: 0.5g de hematoxilina y 10 ml de alcohol etílico al 90%. Añadir lentamente la solución A a la B. dejar reposar media hora y filtrar. Mantener el filtrado en maduración durante dos meses.

HEMATOXILINA DE HARRIS

Disolver 1 g de hematoxilina en 10 ml de alcohol etílico absoluto. Por separado, disolver 20 g de alumbre de amonio o potasio en 200 ml de agua destilada y calentar. Maniobrando con rapidez, mezclar las dos soluciones y hervir. Agregar 0.5 g de óxido de mercurio y enfriar rápidamente.

ACETOCARMIN

Solución madre: calentar 1 g de Carmin en 200 ml de una solución acuosa de ácido acético al 45% durante 5 minutos. Dejar enfriar y filtrar. Solución de trabajo: usar partes iguales de la solución madre y de ácido acético al 45 % en solución acuosa.

X . REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Calleja Quevedo, Elsa 1987. Comunicación personal. Departamento de Morfología y Función Animal. ENEP Iztacala, UNAM
- 2.- Chaudhuri, N. et al. 1966. Staining of free-living nematodes by Eosin Y dye. Nematológica 12 :337-342
- 3.- Chitwood, B.G. y Chitwood, M.B.1977. Introduction to Nematology. USA, University Park Press, Págs. 41-42
- 4.- Conn, H.J. 1961. Biological Stains. Seventh Edition, USA, The Williams and Wilkins Company, págs. 156-185,236-275 y 311-314
- 5.- Christie, J.R. 1976. Nematodos de los Vegetales: su ecología y control. México, Limusa, p. 275
- 6.- Courtney, Wilbur D. et al. 1955. TAF: an improved fijative in nematode technique. Plant Disease Reporter vol. 39 (7):
- 7.- Crofton, H.D. 1966. Nematodes. Great Britain, Hutchinson and Co., págs. 28-34, 69-89 y 115-125
- 8.- Culling, C.F.A. 1974. Handbook of Histopatological and Histochemical Techniques. Third Edition, Great Britain, Butterwort, págs. 29-61
- 9.- De Grisse, A.T. and Choi, Y.E. 1971. A rapid method for the transfer of fixed nematodes to anhydrous glycerine. Mededelingen Fakulteit Landbouwwetenschappen Gent, 36 (2):
- 10.- De Grisse, A.T. 1969. Redescription ou modifications de quelques techniques utiliseés dans l'étude des nématodes phitoparasitaires. Meded. Fak. Landb .Wet. Gent 34 : 351-359
- 11.- Drury, R.A.B. et al 1980. Carleton's Histological Technique. Fifth Edition, Great Britain, Oxford University Press, págs. 41-149
- 12.- Doliwa, V. 1956. Experimentelle Unterschugen an Kartoffelnematoden (Heterodera rostochiensis Wollenber). Wiss. Z. Univ. Rostock (5):133-149
- 13.- Doncaster, C.C. et al. 1964. Observations of gut pH and absotion of methyl red and neutral red in the intestine walls of Pelodera and Mesodiplogaster. Nematológica 10: 136-140
- 14.- Ellenby, C. y Smith, L. 1964. A narcotic and inmerson medium for living nematodes with some observations on the refractive index of the cuticle. Nematológica 10: 342-343
- 15.- Fenner, L.M. 1962. Determination of nematode mortality. Plant. Dis. Rep. 46: 383

- 16.- Gaviño, Gonzalo et al 1975. Técnicas biológicas Selectas de laboratorio y de campo. México, Limusa, págs. 231-234
- 17.- Goodey, J.B. 1963. Soil and freshwater nematodes. London, Methuen and Co. L.T.D., p.267
- 18.- Homeyer, B. 1953. Die Unterscheidung lebender und toter Stockälchen (Ditylenchus dipsaci Kuhn), durch Fluorochromierung mit Akridinorange. Nachr. Bl. dt. Pflschutzdienst. Stuttg. 5: 8 -11
- 19.- Hooper, D. J. 1974. Aphelenchus avenae. Commonwealth Agricultural Bureaux, England, Descriptions of Plant parasitic Nematodes, Set 4, No.50
- 20.- Hyman, Libbie Henriqueta. 1951. The invertebrates: Acantocephala, Aschelminthes and Entoprocta. USA, Mc Graw-Hill, vol III, p. 197-455
- 21.- Jara Alcocer, Fernando de la y Zerón Bravo, Filiberto.1981. Manual de prácticas de Nematología Agrícola. México, ENCB-IPN, Dpto. Parasitol.
- 22.- Kostyuk, N.A. 1978. Some techniques of total staining of plant nematodes. Materialy Nauchnoi Konferentsii. Vesosyuznogo Obshchestva Gel'mintologov No. 30: 87 - 90
- 23.- Laan, P.A. van der y Bijloo, j.d. 1955. Bepaling van de vitaliteit van de cyste-inhoud van het aardappel-cystenaaltje (Heterodera rostochiensis Woll.) door fluorochromeren met acridine orange. Tijdschr. Pflzeikt. 61, 69-75
- 24.- Locquin, Marcel et al. 1985. Manual de Microscopia. España, Labor, págs. 126-127
- 25.- Massey, Calvin L. 1974. Biology and Taxonomy of Nematode Parasites and Associates of Bark Beetles in the United States. USA, United States Department of Agriculture, págs. 1-2
- 26.- Moriarty, F. 1965. The efficacy of chrisoidin, New Blue R, and Phloxine B for determining the viability of beet elworm Heterodera Schactii Schm. Nematológica 10: 644 -646
- 27.- National Academy of Sciences (ed) 1980. Control de nemátodos parásitos de plantas. Tr. Ing. José Mesa Falliner, México, Limusa, P. 19
- 28.- Ojiga y Estey, R.H. 1974. The use of Meldola Blue and Nile Blue A, for distinguishing dead from living nematodes. Nematológica 20 ; 271-275
- 29.-Peláez, F.D. 1985. Comunicación personal. Lab. de Entomología, Dpto. de Parasitol. ENCB-IPN.
- 30.- Peláez, F.D. 1964. Efectos del GS-1339 sobre la permeabilidad tegumentaria de dos nemátodos. Rev. Latinoamericana de Microbiología.vol.6 (3-4) : 167-171

- 31.- Rakoff, Henry et al 1974. Química Orgánica Fundamental. México, Limusa, págs. 75, 163, 179, 521 y 525
- 32.- Rodríguez-Kabana R. et al 1967. Staining of phytoparasitic nematodes of the subfamily Hoplolaininae. J. ALA. Sci. 48(3): 62
- 33.- Rubin, R. 1951. A rapid method for making permanent mounts of nematodes. Stain Technology 26 (4): 257-260
- 34.- Seinhorst, J.W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. Nematológica 4: 67-69
- 35.- Seinhorst, J.W. 1962. On the killing, fixation and transferring to glycerin of nematodes. Nematológica 8: 29-32
- 36.- Sheenan, Dezna C. et al 1980. Theory and practice of histotechnology. 2nd. Ed. USA, Mosby Company, p. 40
- 37.- Shepherd, A.M. 1962. New Blue R a stain that differentiates between living and dead nematodes. Nematológica 8 : 201 - 108
- 38.- Smith, L. 1966. Dimethyl Hydantoin Formaldehyde resin as amounting medium for nematodes. Nematológica 12 : 177
- 39.- Southey, J.F. 1970. Laboratory Methods for work plant and soil nematodes. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Technical Bulletin No. 2 London, p. 44
- 40.- Thorne, Gerald. 1961. Principles of nematology. USA, Mc Graw-Hill Book Company, págs. 115, 138, 336 y 341
- 41.- Trim, A.R. 1949. The kinetics of the penetration of some representative antihelminthics and related compounds into Ascaris Lumbricoides var. suis. Parasitology 39 (3-4): 281-290
- 42.- Webster, J.M. 1972. economic Nematology. USA, Academic Press, P. 563
- 43.- Yadav, S.M. et al. 1981. Use of goldchloride for staining scutellae phasmids. Indian Journal of Nematology 10 (2): 260.
- 44.- Zuckerman, B.M. et al. Plant Nematology. USA, The University of Massachusetts Agricultural Experiment-Station, págs. 189-195