

TESIS DONADA POR
D. G. B. - UNAM
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES



IZTACALA

B0446/87

8-4

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE ESPECIES DEL
GENERO Waltonella EN RANAS SILVESTRES DE
TECOZAUTLA, HIDALGO (MEXICO)

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARTHA PATRICIA SONIA BARRIOS SANCHEZ



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.

Dedico este trabajo a mi MADRE, por la confianza y fé que puso en mí; en quien pensé día a día, tomándola como ejemplo de esfuerzo y trabajo.

A mi hermana por la fé, apoyo y ánimo que me transmitió cada día.

Al Dr. Dionisio Peláez Fernández y su maravillosa esposa la Sra. Josefina Iluch de Peláez por su confianza y -- cariño.

A toda mi familia, en quienes pensé, como una luz brillante en mi camino.

A TODOS USTEDES GRACIAS.

I N D I C E

A G R A D E C I M I E N T O S	I
R E S U M E N	1
I N T R O D U C C I O N	2
O B J E T I V O S	16
M A T E R I A L Y M E T O D O S	
<u>A N F I B I O S</u>	17
<u>M I C R O F I L A R I A S</u>	19
<u>F I L A R I A S A D U L T A S</u>	25
R E S U L T A D O S	31
<u>R E D E S C R I P C I O N D E L A E S P E C I E</u>	40
<u>C L A V E P A R A L A I D E N T I F I C A C I O N D E L A S E S P E C I E S D E L G E N E R O W A L T O N E L L A.</u>	51
D I S C U S I O N	55
C O N C L U S I O N E S	62
A P E N D I C E	
<u>F I J A C I O N D O B L E</u>	64
<u>R O J O N E U T R O</u>	64
<u>G I E M S A</u>	65
<u>H E M A T O X I L I N A F E R R I C A</u>	67
<u>H E M A L U M D E M A Y E R</u>	69
<u>H E M A T E I N A D E R O U D A B U S H</u>	70
<u>V E R D E D E M E T I L - P I R O N I N A</u>	72
L I T E R A T U R A C I T A D A	74

A G R A D E C I M I E N T O S

La colaboración fué el cimiento de este trabajo.

Agradezco a la Biol. Silvia Mille P., por la dirección de éste trabajo y sus valiosos comentarios y sugerencias.

Al Dr. Dionisio Peláez F., por su asesoramiento y - permanente colaboración a través de sugerencias y consejos que resultaron de excelente ayuda.

A. Q.B.P. Salvador Pérez Solórzano ex-jefe del Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Intituto Politécnico Nacional; y al M. en S. P. Máximo Cortéz Jiménez ahora jefe del mencionado Departamento, por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones y - por proporcionarme todo el material necesario para ello.

A todos los profesores y personal que laboran en el Departamento de Parasitología del I.P.N., por su orientación, consejos y apoyo.

A los Biólogos Ma. de los Angeles Sanabria E., Enri que Godínez Cano, Agustín Ruíz y al M. en C. Jorge Padilla Ra mírez; por su partisipación en la revisión y aprobación del - manuscrito final.

A mi hermana Silvia por su excelente trabajo mecano gráfico.

Al Biol. Ramón Cisneros Barrios por las fotografías obtenidas.

Al Topógrafo Uriel Carbajal Jiménez por el tiempo - que me dedicó.

De manera especial a mis amigos Esmaragdo, Enrique y Ramón por su apoyo constante para empezar y conseguir - el fin de este trabajo.

A Noé por su colaboración y apoyo constante, sobre todo en el trabajo de campo.

R E S U M E N

En este trabajo se presenta una breve historia acerca de la taxonomía de las filarias de anfibios; con la redescricpción de Waltonella striatus (Ochoterena y Caballero, 1932) con una nueva localidad, Tecozautla Hidalgo México y un nuevo huésped Rana neovolcanica.

La estandarización de una técnica de fijación y 5 - métodos de tinción para microfilarias: Hemateína de Roudabush, Rojo Neutro, Hemalum de Mayer, Giemsa y Hematoxilina -- Férrica; se hace hincapié de su efectividad con relación a la contracción que experimentan los embriones. Se encuentra que la Hemateína de Roudabush es el mejor método.

Y la utilidad de la Hemateína de Roudabush, el Hemalum de Mayer y el Verde de Metil-Pironina, para teñir los -- adultos, obteniendo así, una forma más para el aprovechamiento de éste tipo de material que esté a punto de ser desechado.

I N T R O D U C C I O N

Uno de los grupos más importantes dentro de la Parasitología es el de los Nemátodos, ya que numerosas especies - de esta clase parasitan tanto vertebrados e invertebrados (zooparásitos) como plantas (fitoparásitos) y muchos de sus huéspedes, animales y vegetales, son de gran importancia económica.

Desde el siglo XVIII el estudio de los nemátodos zooparásitos han sido intensos y continuos, sobresaliendo entre las principales obras las escritas por: Yorke y Maples-tone (1926) "The nematode parasites of vertebrates", Baylis y Daubney (1926) "A synopsis of the families and genera of Nematodes"; Chitwood (1937) "A revised classification of the Nematode"; Chitwood y Chitwood (1937 - 1938 y 1950) "A introduction to Nematology"; Yamaguti (1961) "Systema Helminthum" y Chabaud (1974) con la publicación más reciente, "Class Nematoda, Keys to subclasses, orders and superfamilies (CIH keys to nematode parasites of vertebrates) que es un estudio realizado por The Commonwealth Institute of Helminthology, Inglaterra, donde se reunieron como autores los mejores helmintólogos del mundo.

En esta última obra la superfamilia Filarioídea agrupa todas las filarias de particular interés en Parasitología médica y veterinaria, puesto que numerosas especies son parásitos tisulares que afectan al hombre y otros vertebrados, -- transmitidas, hasta donde se sabe, por artrópodos chupadores de sangre.

Wehr (1935) al revisar la clasificación de la superfamilia, indicó que el estudio de dichos parásitos se remonta

a 1787 cuando Müeller creó el género *Filaria*; y erigió dos - nuevas familias: Dipetalonematidae y Stephanofilaridae, quedando los filarioideos en las cuatro familias siguientes:

Filariidae Claus, 1885.

Desmidocerciadea Cram, 1927.

Stephanofilaridae Wehr, 1935.

Dipetalonematidae Wehr, 1935.

En esta última familia propuso nuevas subfamilias, reduciendo a sólo dos de las consideradas por Yorke y Maplestone, en 1926.

- Dipetalonematinae Wehr, 1935
(= Onchocercinae Leiper, 1911. Loainae Yorke y Maplestone, 1926 in part.)
- Dirofilarinae Wehr, 1935.
(= Loainae Yorke y Maplestone, 1926 in part.)

Chitwood y Chitwood (1950) según Rodríguez López-Neyra, 1926, aceptaron la clasificación de Wehr, volviendo a admitir a la subfamilia Onchocercinae, Leiper, 1911, en la familia Dipetalonematidae.

Hyman, en 1951, elevó a la categoría de orden la subfamilia Filarioidea, dividiéndola en 3 familias; Setariidae y Aproctidae (creadas por Yorke y Maplestone en 1926 como subfamilias) y Filariidae, única familia que aceptó de la clasificación de Wehr (1935).

Rodríguez López-Neyra presentó en 1956 una nueva revisión de los filarioideos, considerándolos otra vez como su-

perfamilia Filarioidea, y los dividió en dos familias, al hacer sinónima *Sthephanofilariinae* (Wehr, 1935) de *Filariidae* - (Claus, 1885) y eleva la subfamilia *Dirofilariinae* a familia, e incluyó, entre otras, a la subfamilia *Dipetalonematinae*, -- eliminando los *Desmidocercidae*.

Chabaud y Anderson (1959) distribuyeron los filarioideos en cinco familias, incluyendo en este rango a la subfamililia *Diplotrienine* (Skrjabin 1916); revivieron las familias -- *Desmidocercidae* de Cram, 1927, y *Setariidae* de Hyman, 1951, - con la aceptación de la familia *Filariidae* propuesta por Rodríguez López-Neyra (1956) y crearon la de los *Onchocercidae*, dividida en ocho subfamilias.

En esta última se encuentra la subfamilia *Dirofilaririinae* (Rodríguez López-Neyra, 1956, familia), junto a las -- subfamilias *Eufilariinae* y *Lemdaninae*, y los *Splendidofilariinae* de Chabaud y Choquet (1953). Por último, Chabaud y Anderson (1959) reivindicaron los *Onchocercinae* Leiper, 1911, y -- crearon la subfamilia *Ornithofilariinae*.

Durante los siguientes años los filarioideos fueron objeto de muy diversas investigaciones, sobre todo referentes a las filarias que afectan al hombre.

Nelson (1960) describió los caracteres de las larvas en estadio infestante de *Wuchereria* y *Brugia*, lo que hizo posible la diferenciación de sus especies; Lebiel (1961) contribuyó con nuevos e importantes datos al conocimiento del ciclo de vida de *Onchocerca Volvulus*; Duke y colaboradores (1966) llevaron a cabo estudios epidemiológicos acerca del parásito, y Ahmed, en ese mismo año, hizo hincapié en la localización - de los adultos de *Wuchereria* y *Brugia*.

También se crearon nuevos géneros y especies para filarias del hombre, mamíferos en general, aves, reptiles y anfibios, al igual que aparecieron estudios ecológicos, biológicos y de sus ciclos de vida. A pesar de ello, hasta 1976 fué cuando Anderson y Bain publicaron la que consideramos como la clasificación más reciente y completa para esta superfamilia. Estos autores sólo reconocieron dos familias: Filariidae y Onchocercidae; la primera con dos subfamilias y los onchocercidae divididos en ocho subfamilias, de las que seis -- coinciden con las propuestas por Chabaud y Anderson, 1959; -- también consideraron los Setariidae (Yorke y Maplestone, 1926) como subfamilia y aceptaron la nueva subfamilia Waltonellinae creada por Bain y Prod'hon en 1974.

Acerca de la biología de este interesante grupo de nemátodos parásitos, se puede resumir como sigue:

Las filarias adultas producen un gran número de huevecillos parcial o totalmente embrionados, los cuales, poco antes o al momento de la oviposición, contienen embriones que se estiran y transforman en organismos delicados, con movimientos serpiginosos (microfilarias) los cuales pasan a la circulación hemática del vertebrado. Cuando la envoltura embrional se alarga, permitiendo acomodarse al embrión estirado, aparecen en la sangre microfilarias "envainadas"; por lo contrario, si dicha cubierta se destruye, las microfilarias se denominan "desnudas". Internamente, a lo largo de la microfilaria se extiende una columna de células cuyos núcleos son cromófilos y constituyen el llamado "cuerpo interno" y los rudimentos de otros órganos.

El desarrollo y tamaño de estos embriones, así como el de las llamadas "células G" terminales, la situación del anillo nervioso, poro excretor y célula excretora en la región

anterior y la posición del poro anal son caracteres básicos - para la identificación de las especies.

La taxonomía, que como se ve por lo anterior es bastante difícil, se ha ido haciendo aún más compleja con la investici6n del desarrollo larval y de los ciclos de vida de - diversas especies si bien son muy contadas aún las que se pueden considerar hasta ahora bien conocidas.

LAS FILARIAS DE LOS ANFIBIOS

Durante muchos años las filarias de anfibios han -- formado parte de familias y subfamilias en las que se encuentran las de otros animales y del hombre.

Wehr(1935) distribuy6 las de los anfibios en dos géneros Icosiella Seurat, 1917 y Foleyella Seurat, 1917 (éste - último con algunas especies propias de reptiles) y los situaron en dos subfamilias dentro de la familia Dipetalonematidae creada por él.

En 1944, Caballero publicó como nuevo el género -- Ochoterenella, entonces monotípico, para la especie O. digiticauda de Bufo marinus de la región de Huixtla, Chiapas, México.

Hyman (1951) coloc6 al género Foleyella en la familia Filaridae, como único representante de parásitos de anfibios.

En su monografía de 1956, Rodríguez López-Neyra consider6 de la manera siguiente la taxonomía del grupo:

<u>Familias</u>	<u>Subfamilias</u>	<u>Géneros</u>
Filariidae	Setariinae	<u>Icosiella</u>
Dirofilaridae	Dipetalonematinae	<u>Ochoterenella</u>
	Dirofilarinae	<u>Foleyella</u>

En 1958 Anderson creó la subfamilia Icosiellinae y en 1959, Chabaul y Anderson erigieron la nueva familia Onchocercidae donde agruparon, entre otras, las tres subfamilias de filarias de anfibios:

<u>Familia</u>	<u>Subfamilias</u>	<u>Géneros</u>
Onchocercidae	Icosiellinae	<u>Icosiella</u>
	Dirofilarinae	<u>Foleyella</u>
	Onchocercinae	<u>Ochoterenella</u>

Yamaguti (1961) dió categoría de orden a los Filarioideos y en él situó a la familia Filariidae y a la subfamilia Filarinae, agrupando en ésta los tres géneros de filarias de anfibios.

A Ródriguez López-Neyra (1956) y Yamaguti (1961) corresponde, pues, el diseño de la diagnosis actual del género Foleyella Seurat, 1917, que puede enunciarse así:

"Nemátodos filariformes; la cutícula forma con frecuencia alas laterales que corren a lo largo del cuerpo o sólo se destacan hacia sus extremos; superficie lisa, finamente estriada o con la región ventral de los machos cubierta de finos tubérculos; boca sin labios ni anillo cuticularizado en la cavidad bucal por delante del extremo anterior del esófago; cuatro o seis pares de papilas bucales; esófago corto, dividido en una parte muscular anterior y una glandular posterior; dioicos y con un notable dimorfismo sexual."

"Hembras mayores que los machos, anfídelas; vulva casi siempre al nivel del esófago; vagina larga y tubular; - las ramas uterinas corren paralelas hacia la región posterior; oviductos continuados con los úteros y situados anteriormente, engrosados en el receptáculo seminal; ovovivíparas."

"Machos con alas caudales laterales bien desarrolladas sostenidas por papilas pre- y postcloacales; espículas -- muy desiguales en tamaño y forma o ambas cosas a la vez y sin gubernáculo."

Posteriormente Schacher y Crans (1973) dividieron - en dos nuevos subgéneros al género Foleyella:

Foleyella, con cinco especies de filarias de reptiles y Waltonia, con ocho que parasitan anfibios; las diagnó--sis de ambos se traducen a continuación:

"Foleyella (Foleyella)"

"Con las características del género (sensu. Witenberg y Gerichter, 1944). Parásitos de tejidos conjuntivos, - espacios linfáticos o cavidad del cuerpo de reptiles agámidos o camaleóntidos; usualmente de color anaranjado o amarillo en vivo. Con alas longitudinales poco aparentes o sin ellas, especialmente en las hembras; machos con prominentes alas caudales. Cavidad bucal corta, sencilla, sin estructuras especiales de soporte. Cutícula lisa en el área ventral precloacal del macho. La hembra con vulva pre- o postesofágica. Microfilarias frecuentemente con vaina oval o fusiforme inflexible. El tercer estadio larval con el esófago menos largo que la mitad de la longitud del cuerpo."

"Tipo: F. (F.) candezei (Fraipont, 1882) Seurat, - 1917."

Otras especies: F. (F.) furcata (Linstow, 1899) -- Witenberg y Gerichter, 1944; F. (F.) brevicauda Chabaud y Brygoo, 1962; F. (F.) agamae (Rodhain, 1906) Yorke y Maplestone, 1926; F. (F.) philistinae Schacher y Khalil, 1967."

"Distribución geográfica: Africa, Madagascar y Cercano Oriente."

"Foleyella (Waltonia)"

"Con los caracteres del género. Parásitos de tejidos conjuntivos, espacios linfáticos o cavidad del cuerpo de salientia; usualmente blancos o grisáceos en vivo. Alas longitudinales muy notables de un extremo a otro, o al menos en la porción posterior de las hembras; machos con prominentes alas longitudinales caudales. Cavidad bucal corta, sostenida con frecuencia por dos estructuras laterales del queilostoma en forma de reborde o saliente. Cutícula precloacal con tubérculos en el área ventral; vulva usualmente a nivel del esófago posterior o algunas veces por detrás. Las microfilarias siempre con vaina flexible y ajustada. Tercer estadio larval con el esófago una mitad más de la longitud del cuerpo."

"Tipo: F. (W.) duboisi (Geddoelst, 1916) Yorke y -- Maplestone, 1926."

"Otras especies; F. (W.) americana Walton, 1929; - F. (W.) bouillezi Witenberg y Gerichter, 1944; F. (W.) brachyoptera Wehr y Causey, 1939; f. (W.) confusa Schmidt y Kuntz, 1969; F. (W.) dolichoptera Wehr y Causey, 1939; F. (W.) flexicauda sp n.; F. (W.) ranae Walton, 1929."

"Distribución geográfica: América del Norte, Africa y Asia."

Un año después (1974) Bain y Prod'hon crearon la -- subfamilia Waltonellinae, agrupando en ella los géneros de filarias de anfibios que se encontraban hasta entonces distribuidos en dos subfamilias:

Onchocercinae, con los géneros: Ochoterenella Caballero, 1944 y Madochotera Bain y Brunhes, 1968.

Dirofilarinae, con Foleyella subgénero Waltonella Schacher, 1974 (= Waltonia* Schacher y Crans, 1973, subgénero).

Estos autores dicen que la existencia o no de alas laterales no justifica la separación de dos subfamilias diferentes para los géneros de filarias de anfibios, cuya organización general es tan homogénea: "Esófago glandular bien desarrollado; extremo caudal largo y no puntiagudo; filas submedias de gruesas papilas cloacales no pedunculadas; espículas desiguales y sencillas; vulva netamente preecuatorial."

En su importante trabajo Bain y Prod'hon continúan diciendo:

"Las afinidades entre estos géneros son reforzadas por los recientes hallazgos sobre las estructuras cefálicas de algunas especies; la descripción de F. (Waltonella) flexicauda (Schacher y Crans, 1973) de F. (W.) confusa Schmidt y Kuntz, 1969, la redescipción precisa (Anderson, 1968) de la región cefálica de F. (W.) dolichoptera (Wehr y Causey, 1939) y la de Ochoterenella digiticauda Caballero, 1944, y las descripciones de Madochotera (cg. Bain y Brunhes, 1968 y Prod'hon, 1973) muestran que todas estas especies tienen una placa cefálica rectangular muy alargada lateralmente, cuyos angulos presentan cuatro papilas cefálicas voluminosas; por otra par-

* El nombre Waltonia del subgénero fue cambiado por Schacher en 1974 para el género Waltonella, por estar pre-ocupado el primero.

te, con excepción de O. digitacauda, muestra dos expansiones cuticulares salientes parabucales siempre en plano lateral."

Por todo esto nos parece oportuno incluir la diagnosis que presentan Bain y Prod'hon (1974) sobre la subfamilia Waltonellinae:

"Waltonellinae, n. subfam: Onchocércidos con placa cefálica estriada lateralmente, con papilas cefálicas muy salientes y frecuentemente terminadas en punta articulada; generalmente, con dos formaciones cuticulares parabucales laterales; cutícula del cuerpo ornamentada o lisa: alas laterales - y caudales muy frecuentes; cavidad bucal poco cuticularizada; esófago glandular siempre bien desarrollado; cauda larga, cónica y sin lengüetas terminales; machos siempre en una área rugosa, gruesas papilas caudales no pedunculadas y dispuesta en dos filas regulares submedianas; espículas sencillas y desiguales; en las hembras la vulva es paraesofágica o aún más alejada del extremo cefálico, pero siempre netamente pre-ecuatorial; ovoyector sencillo. Microfilarias con cauda corta y totalmente nucleadas. Parásitos de batracios anuros."

"Especie tipo: Waltonella duboisi (Geddoelst, 1916.)"

"... comprende tres géneros: Waltonella Schacher, - 1974 Madochotera Bain y Brunhes, 1968 y Ochoterenella Caballero, 1944."

Siguiendo la última clasificación de Anderson, 1976, anotamos la taxonomía actual de la superfamilia Filarioidea - en la tabla I. En ella solamente se anotan los nombres de -- los géneros de filarias de reptiles y los de las filarias de anfibios con las cuales guardan indudable realción.

TABLA 1.

TAXONOMIA DE LA SUPERFAMILIA FILARIOIDEA

<u>FAMILIAS</u>	<u>SUBFAMILIAS</u>	<u>GENEROS</u>	<u>HUESPEDES</u>
Filaridae	Stephanofilarinae	Uno	Mamíferos
	Filarinae	Cuatro	
Onchocercidae	Oswaldofilarinae	Oswaldofilaria	Reptiles
		Gonofilaria	
		Befilaria	
		Piratuba	
		Piratuboides	
		Solafilaria	
	Icosiellinae	Iconsiella	Anfibios
	Waltonellinae	Waltonella	
		Madochotera	
		Ochoterenella	
Setariinae	Dos	Aves y Mam.	
Dirofilarinae	Foleyella	Reptiles	
	Uno	Aves,	
	Siete	Mamíferos	
Onchocercinae	Macdonaldius	Reptiles	
	Dos	Mamíferos	
Splendidofilarinae	Cardianema	Reptiles	
	Thamugadia		
	Pseudothamugadia		
	Madathamugadia		
Lemdaninae	Saurositus	Reptiles	
	Ocho	Aves y Mam.	

EL GENERO Waltonella

De los géneros que incluyen especies parásitas de anfibios, dos han sido los encontrados en México; Ochoterenella y Waltonella.

Ochoterena y Caballero (1932) describieron una filaria de Rana montezumae como especie del género Chandlerella - (C. striata) la cual en 1935 fue tomada por Caballero como tipo de Foleyellides n. gén.; no obstante, Witenberg y Gerichter más tarde (1944) hicieron sinónimo dicho género, de Foleyella Seurat, 1917, (ahora Waltonella).

Las especies de Waltonella se encontraron situadas en el género Foleyella (Seurat, 1917) hasta 1974 cuando Bain y Prod'hon separaron las filarias de anfibios de las de los reptiles, creando una nueva subfamilia y este nuevo género.

Hasta 1979, se encuentran citadas para este género las siguientes especies:

- W. convoluta (Molin, 1858) de Hyla faber. Brasil.
- W. duboisi (Gedoele, 1916) de "rana" y "sapo gigante" Congo Belga. (Witenberg y Gerichter, 1944) de Rana esculenta ridibunda. Nte. Palestina.
- W. leiperi (Railliet, 1916) de Bufo regularis. Sudán.
- W. scalaris (Travassos, 1929) de Leptodactylus ocellatus Brasil.
- W. vellardi (Travassos, 1929) de Bufo marinus. Brasil.
- W. ranae (Walton, 1929) de Rana catesbiana. E.U.A.
- W. americana (Walton, 1929) de Rana pipiens. E.U.A.
- W. striatus (Ochoterena y Caballero, 1932) de Rana pipiens México.

- W. brachyoptera (Wher y Causey, 1939) de Rana sphenoccephala E.U.A.
- W. dolichopectera (Wehr y Causey, 1939) de Rana sphenoccephala. E.U.A.
- W. confusa (Schmidt y Kuntz, 1969) de Rana limnocharis vittigera. Islas Filipinas.
- W. flexicauda (Schacher y Crans, 1973) de Rana cetesbeiana. E.U.A.
- W. guayanensis Bain y Prod'hon, 1974 de Bufo marinus Guyana, Francesa.
- W. royi Bain, Kim y Petit, 1979 de Bufo marinus. Guyana.
- W. oumari Bain, Kim y Petit, 1979 de Bufo Marinus. Guyana.
- W. dufourae Bain, Kim y Petit, 1979 de Bufo marinus. Guyana.
- W. albareli Bain, Kim y Petit, 1979 de Bufo marinus. Guyana, Francesa.

HUESPEDES INTERMEDIARIOS

El ciclo de vida de los parásitos de este género, - ha sido estudiado experimentalmente en algunas de sus especies, utilizando mosquitos de la familia Culicidae como huéspedes intermediarios y transmisores.

Los resultados de las investigaciones de estos autores se puede resumir así:

Una vez que las microfilarias penetran al estómago del mosquito, pierden su vaina, penetran a través de su pared, migran y se alojan en la cavidad torácica y abdominal para -- continuar el desarrollo, hasta llegar a su estadio infestante, que es cuando se localiza en tórax y probóscis para ser transmitidas a los huéspedes definitivos (anfibios) en los cuales

se pueden encontrar: las microfilarias en los sistemas circulatorio y linfático, y los adultos en la cavidad retroperitoneal y mesenterio.

Las transmisiones experimentales se han realizado - por varios autores en las especies que se indican.

AUTORES	ESPECIES	HUESPEDES	
		INTERMEDIARIOS	DEFINITIVOS.
Causey, 1939.	<u>W. dolichoptera</u>	<u>Culex pipiens</u> , <u>Aedes aegypti</u> y <u>A. atropalpus</u> .	<u>Rana pipiens</u> y <u>R. sphenocphala</u> .
	<u>W. brachyoptera</u>	<u>C. pipiens</u> , <u>C. fatigans</u> y <u>A. aegypti</u> .	<u>R. pipiens</u> y <u>R. sphenocphala</u> .
Kotcher, 1941.	<u>W. dolichoptera</u>	<u>C. pipiens</u> y <u>C. quinquefaciatus</u> .	<u>Rana ssp.</u>
	<u>W. brachyoptera</u>	<u>C. pipiens</u> , <u>C. apicalis</u> y <u>C. quinquefaciatus</u> .	<u>Rana ssp.</u>
	<u>W. ranae</u>		
Witenber y Gerichter, 1944.	<u>W. duboisi</u>	<u>Culex molestus</u> .	<u>R. esculenta</u> <u>ridibunda</u> .
Cowper, 1945.	<u>W. leiperi</u>	<u>Aedes aegypti</u>	<u>R. sphenocphala</u>
Benach y Crans, 1973.	<u>W. flexicauda</u>	<u>Culex territans</u>	<u>R. calamitans</u> <u>R. catesbeiana</u> .

HUESPEDES DEFINITIVOS

Con lo que respecta a los anfibios, han sido motivo de extensos estudios en diferentes partes del mundo.

En México a pesar de la variedad de especies que -- existen (Hillis y Frost, 1985), sólo se han estudiado las filarias de Rana halecina (= Rana pipiens) y Rana pipiens (Ocho-terena y Caballero, 1932); Rana montezumae (Caballero, 1935) del Distrito Federal y Bufo marinus (Caballero y C., 1944) de Chiapas.

Por ello se considera necesario hacer un estudio, - que contribuya al conocimiento de filarias parásitas de ranas habitantes de nuestra región, como lo es la Rana neovolcánica de Tecozautla Hidalgo México. De acuerdo con los siguientes objetivos.

O B J E T I V O S

- Estandarizar los métodos de fijación, coloración y conservación más utilizados, para definir con precisión los caracteres taxonómicos de microfilarias y filarias adultas, seleccionando los más apropiados.
- Comparar la efectividad de los métodos de coloración en - relación a la contracción que sufren las microfilarias.
- Identificar a la filaria que infesta a Rana neovolcánica de Tecozautla Hidalgo México.
- Describir o redescubrir a la filaria.

MATERIAL Y METODOS

ANFIBIOS

COLECTA Y CONSERVACION

En el mes de mayo de 1985, se obtuvieron 9 ejemplares adultos de Rana neovolcánica, en el río Tecozautla que -- bordea al pueblo del mismo nombre en el Estado de Hidalgo, México (99°37' long. W y 20°32' latitud S. Fig. 1) a una altitud de 1700 m. sobre el nivel del mar. Esta pequeña corriente desagua en el río Moctezuma, de la cuenca del río Lerma.

La captura se realizó por la noche con lámparas sordas y redes de tul, de acuerdo con los métodos sugeridos por Knudsen (1966).

Para su traslado se utilizaron costales de manta de 20 x 20 cm. humedecidos y en bandejas de plástico con el fondo cubierto por poca agua.

En el laboratorio se mantuvieron vivos en un terrario de vidrio de 49 cm. de largo, 25 cm. de ancho y 30 cm. de alto, con tapa de tela de alambre.

El terrario se colocó cerca de una ventana, para que las ranas recibieran algo de sol 1 ó 2 horas al día; se les limpió y cambió el agua diariamente.

MARCADO

Se consideró que la distribución y forma de las manchas de su piel eran bastante diferentes en cada ejemplar, se hizo una clave esquematizándolas (fig. 2) para poder distinguir las y se les asignó un número correlativo (1 - 9), de acuerdo con Ilar, et al. (1974).

Figura No. 1. Ubicación del área de estudio

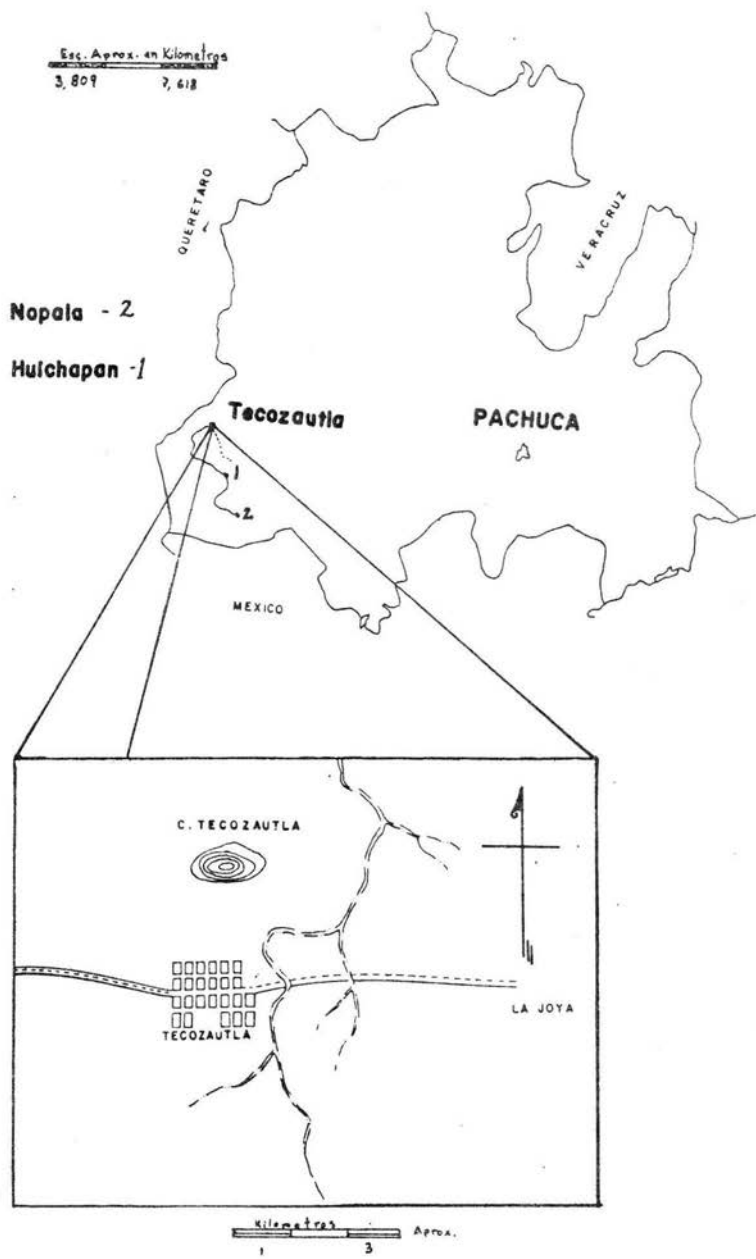
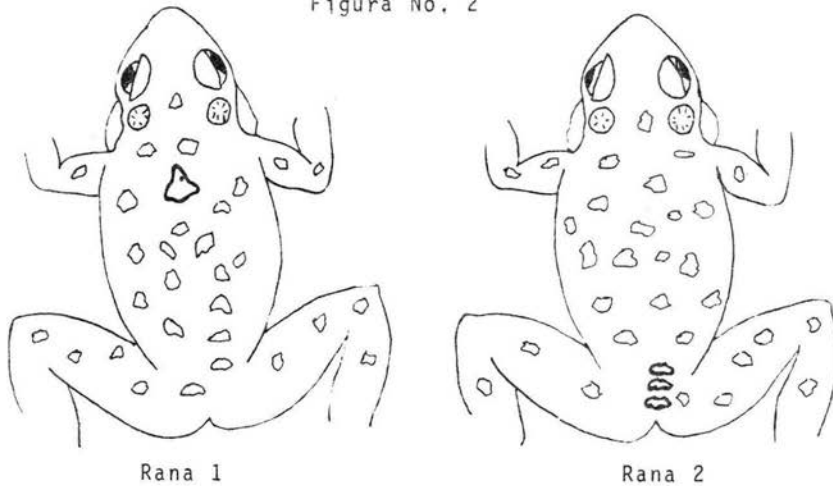


Figura No. 2



Esquematzación de la clave para la identificación

ALIMENTACION

Se alimentaron cada 8 días. Durante los meses de agosto y octubre con ortópteros (varias especies); los demás meses, con 3 ó 4 trozos pequeños de pescado fresco.

MICROFILARIAS

OBTENCION DE LA SANGRE

Las tomas de sangrese hicieron cada 8 días para evitar la posible anemia de los anfibios.

Antes de cada extracción se expusieron los ejemplares al calor de un foco de 60 w, teniendo cuidado de que no -

se deshidrataran. De cada rana se tomó una gota de sangre, - que se recibió en cubreobjetos limpios al cortar con una nava ja de rasurar nueva, el extremo del dedo más largo de una pa- ta, previamente secada.

OBSERVACION EN VIVO

La gota de sangre, entre porta y cubreobjetos, per- mitió determinar cuales de las ranas estaban parasitadas, la observación de los movimientos de los embriones y algunos de - sus caracteres diagnósticos, al mismo tiempo que la intensi- dad de la parasitosis; señalando ésta en cada caso, convencio- nalmente del modo que sigue:

Microfilarias por campo.
objetivo seco fuerte (10 X)

1 - 5	+
6 - 10	++
11 - 15	+++
más de - 15	++++

PREPARACIONES PERMANENTES

Las extensiones se hicieron en cubreobjetos de los números 1 y 2, preservadas con dos fijadores sucesivos; vapores de Yodo y Alcohol metílico absoluto libre de acetona, (ver apéndice).

COLORACION

Como las microfilarias no pueden ser estudiadas en detalle sino es mediante la coloración de sus estructuras in-

ternas, los diversos autores que se han ocupado de ello han empleado hasta ahora, con mayor o menor éxito, varios métodos (tabla II) de los cuales elegimos:

Giernsa, Hemalum de Mayer, Rojo neutro, Hematoxilina férrica y agregamos Hemateína de Roudabush, misma que se detalla en el apéndice.

La manipulación de los cubreobjetos con las extensiones de sangre se hizo con unas pinzas de plástico, para --evitar la reacción de los colorantes con el metal ó el sudor de las manos; y la tinción se llevó a cabo en vasos de Coplin para cubreobjetos.

T A B L A II

METODOS DE TINCION PARA MICROFILARIAS.

	Azur II Eosina	Giemsa	Hemalum de Mayer	Hemalum Eosina.	Rojo Neutro	Verde de Metil- Pironina	Hematoxilina Férrica	Negro de Clorazol E (KOHN)
Fülleborn 1914	+			+				
Ochoterena y Caballero, 1932		+		+				
Kotcher, 1941	+	+				+		
Cowper, 1945	+	+	+					
Golvan, 1957	+	+	+	+	+	+		
Peláez y Pérez- Reyes, 1958		+					+	
Peláez y Pérez- Reyes, 1960		+						
Benach y Crans, 1973	+	+			+			
Bain, Kim y Petit, 1979		+						
Peláez, 1980								+

ESTUDIO DE LAS PREPARACIONES

Se eligió una serie de preparaciones, de las que se dibujaron 20 microfilarias teñidas con cada método (100 en total) con la ayuda de la cámara clara de Abbé.

Sin cambiar la combinación óptica del microscopio, se colocó en la platina un micrómetro objetivo para dibujar su escala y después utilizarla para medir las microfilarias.

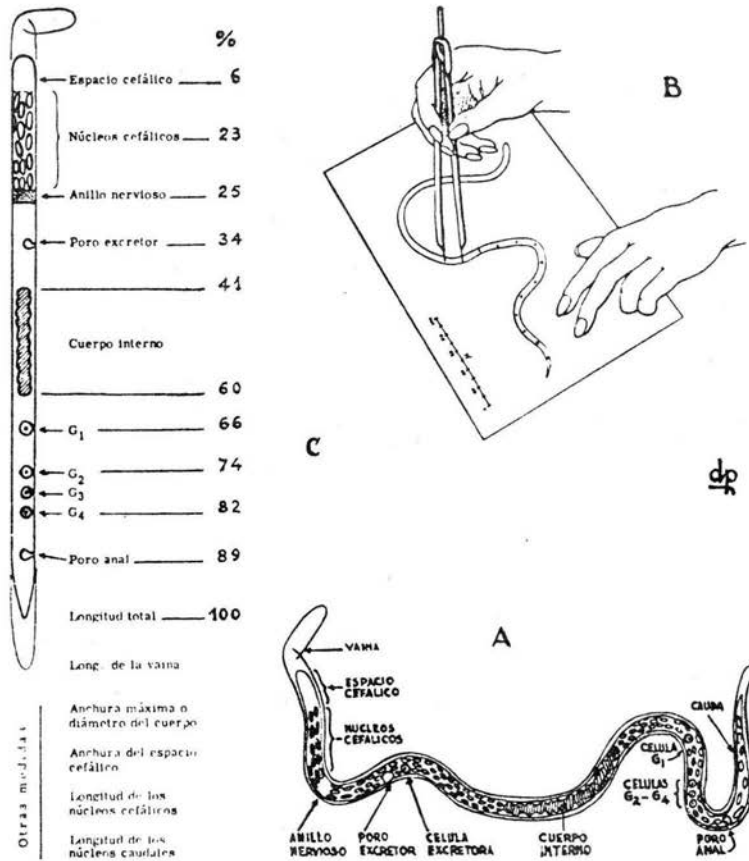
Los caracteres que se consideran de mayor importancia son (Fig. 3 A):

- 1) Presencia o ausencia de vaina.
- 2) Longitud total (sin vaina)
- 3) Anchura máxima o diámetro del cuerpo.
- 4) Longitud del espacio cefálico.
- 5) Diámetro del espacio cefálico.
- 6) Posición del anillo nervioso.
- 7) Posición del poro excretor.
- 8) Posición de la célula excretora.
- 9) Posición del cuerpo interno (Inner - Körper).
- 10) Posición de la célula G_1 .
- 11) Posición de las células $G_2 - G_4$.
- 12) Posición del poro anal.
- 13) Longitud de los núcleos cefálicos.
- 14) Longitud de los núcleos caudales.

Las medidas anteriores se tomaron de la siguiente forma:

Como no es posible que los embriones queden en línea recta, fue necesario utilizar un compás de 2 puntas como se indica en la figura 3 B.

Figura 3.



A) Dibujo semiesquemático de una microfilaria indicando los caracteres de mayor importancia.

B) Procedimiento utilizado para medir las microfilarias.

C) Expresión de las medidas en porcentajes.

La posición de los diferentes órganos rudimentarios se tomó siempre indicando la distancia a que se encuentran cada uno, del extremo anterior de la microfilaria. Todas las medidas se anotaron en milímetros y se expresan en porcentos (Fig. 3 C).

FILARIAS ADULTAS.

COLECTA, FIJACION Y CONSERVACION.

Al morir las ranas, se practicó la necropsia.

En el momento de poner las vísceras al descubierto, se buscó el corazón e hígado, después de asegurarse que no había filarias en su peritoneo, se extrajeron para hacer extensiones de sangre, fijándolas como ya se explicó (ver apéndice).

A continuación, con ayuda del microscopio estereoscópico, se revisó el peritoneo, tanto visceral como parietal, moviendo los órganos de un lado a otro y agregando un poco de solución salina al 4% para evitar la desecación; al asegurarse de la posición de las filarias, se extrajeron los órganos en un sólo paquete y se colocaron en una caja de Petri con solución salina limpia para extraer los gusanos adultos.

Para ello se utilizaron agujas de disección muy delgadas, fabricadas con alfileres entomológicos, con el fin de dilacerar el peritoneo fácilmente.

Los parásitos se colocaron en solución salina al 4% limpia, para dejarlos libres de residuos y después fijarlos, sumergiéndolos en Alcohol al 30% caliente (hasta el primer hervor). Hay que tener mucho cuidado de que el Alcohol no --

hierva más de 3 veces; de ser así, es más adecuado poner Alcohol nuevo, por que de lo contrario las filarias revientan.

Posteriormente se revisó la cavidad del cuerpo, asegurándonos de haber extraído todas las filarias.

Una vez fijadas, se contaron y se separaron hembras de machos en frascos con Alcohol al 50% frío, cambiando el Alcohol cada 12 horas (aproximadamente) hasta llegar a Alcohol al 70%, para después pasarlos individualmente en tubos, en donde se conservaron para su estudio después de etiquetarlos con los datos correspondientes.

PREPARACION DE LAS FILARIAS ADULTAS

TRANSPARENTACION

En una caja de Siracusa conteniendo Lactofenol de Amann se colocaron los adultos para su estudio, una vez transparentados se pusieron entre porta y cubre, con bastante Lactofenol. Hechas las observaciones necesarias, se lavaron con agua de la llave y se pasaron a Alcohol al 30% (15 minutos), 50% (15 minutos) y 70%.

OBSERVACION DE LAS PAPILAS

Para poder observar con detalle las papilas cefálicas y caudales, se adaptó el método de Anderson (1958) haciendo lo siguiente:

Se corta el extremo anterior hasta 1 mm de longitud aproximadamente, y se pasa a una gota de Lactofenol sobre un portaobjetos, entre 2 soportes con un espesor mayor al de la gota; se cubre con un cubreobjetos del número 1 y se observa -

al microscopio estereoscópico para orientar la pieza en vista apical y poder observarla en el microscopio compuesto.

Se cortó el extremo posterior de los machos, hasta la primera vuelta de la espiral, cuidando de no romper las espículas y se colocó de la misma forma que en el caso anterior, logrando así la posibilidad de mover el corte para orientarlo en vista ventral y poder observar las papilas y estructuras caudales.

TINCIONES

Para destacar mejor los órganos internos se tiñeron los extremos anterior y posterior de hembras y machos practicando los siguientes métodos:

Preparación del material para teñir.- Al microscopio estereoscópico (lupa) y con un trozo de navaja de rasurar nueva, se seccionó transversalmente la región anterior de los adultos a una distancia de 1 mm posterior al comienzo del intestino; la parte posterior en las hembras, desde 1 mm antes del final del intestino y en los machos 1 mm antes del origen de la espícula mayor.

Para evitar que con la manipulación se maltrataran los cortes, se trabajaron de la siguiente manera:

A partir de la rehidratación y hasta antes de la -- deshidratación, las piezas se pusieron en un tubo de ensayo -- aforado a 5 y 10 ml, y de la deshidratación hasta el Xilol en un pocillo de Siracusa con tapa, donde se aplanaron de la siguiente forma: Se corta un portaobjetos transversalmente en tres partes y dentro del pocillo se pone una de ellas. Sobre

ésta se colocan las porciones seccionadas de las filarias has ta que queden inmersas en el líquido que se esté usando, cubriéndolas con otro fragmento del portaobjetos cortado.

En la deshidratación no importa si las piezas se -- quedan de un día para otro, siempre que se tape el pocillo y que éste contenga suficiente líquido para evitar que se sequen.

Para hacer notorias las estructuras ya mencionadas se utilizaron como colorantes: Hemalum de Mayer, Hemateina - de Roudabush y Verde de Metil-Pironina; que se detallan en el apéndice.

CARACTERES TAXONOMICOS

Para obtener las medidas diagnósticas, se dibujaron de 15 hembras y 15 machos los caracteres de mayor importancia valiéndose de la cámara clara de Abbé y, al igual que en las microfilarias, en cada diseño se dibujó la escala del micrómetro objetivo.

Para hembras y machos.

Longitud total.
 Diámetro máximo.
 Número de papilas cefálicas.
 Longitud del atrio-bucal.
 Diámetro del atri-bucal.
 Longitud total del esófago.
 Longitud de su porción muscular.
 Diámetro de su porción muscular.
 Longitud de su porción glandular.
 Diámetro de su porción glandular.
 Posición del anillo nervioso.
 Diámetro máximo del intestino.

Exclusivos de hembras

Posición de la vulva.
 Posición del poro anal.

Exclusivos de machos

Posición de la cloaca.
 Longitud de la espícula mayor.
 Diámetro de la espícula mayor.
 Longitud de la espícula menor.
 Diámetro de la espícula menor.
 Posición de la última asa testicular anterior.
 Número de papilas caudales.

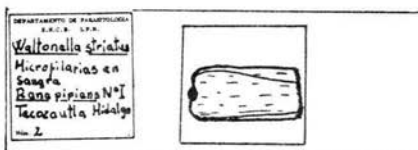
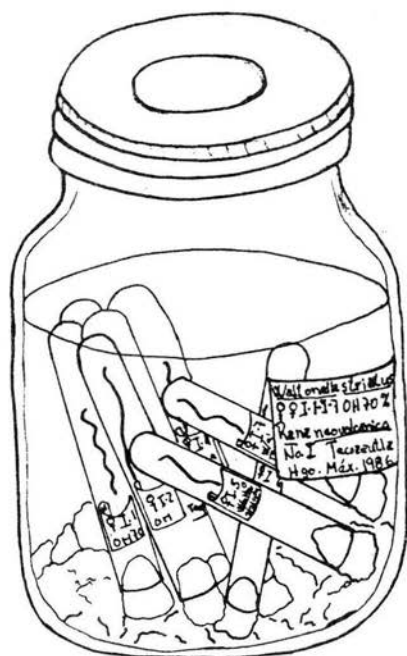
Para obtener la longitud total, los ejemplares ya fijados, se midieron mediante una regla milimétrica, entre porta y cubreobjetos.

Los demás caracteres se indicaron considerando que la posición de los órganos cercanos al extremo anterior se refieren siempre a la distancia que estén de éste y viceversa a los que se encuentran cerca del extremo posterior; todas las medidas se expresan en milímetros.

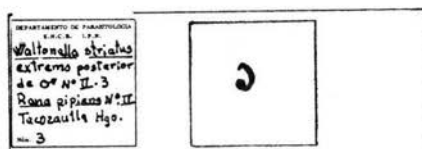
CONSERVACION Y DEPOSITO DEL MATERIAL ESTUDIADO

Los adultos no montados en preparaciones, se separaron en tubitos individuales con Alcohol 70%, tapados con algodón, los cuales se reunieron en frascos bocales, con una capa de algodón en el fondo y cierre firme (fig. 4) con suficiente Alcohol de la misma graduación para cubrirlos.

FIGURA 4



Fij. con Vaporas de
 Iodo y Malonal
 Hematina de
 Roubabush 24hs.
 Dif. E. de Glasa.
 Resina Síntetica
 Fecha: 18.XI.1985
 Prepar. Sonia D. B.



Fij. Malano: 30%
 caliente.
 Hemalum de
 Mayer 24 hrs.
 Diferenciado.
 Resina sintética
 Fecha: 10.V.1986
 Prepar. S. D. B.

La partes teñidas y las preparaciones de sangre de-
 bidamente numeradas, al igual que los ejemplares adultos, se
 etiquetaron con los datos respectivos y se han depositado en
 la colección del Departamento de Parasitología de la Escuela
 Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Na-
 cional. México, D.F.

R E S U L T A D O S

MICROFILARIAS

En la observación de las mismas en vivo se advierte que sus movimientos son muy activos y serpenteantes (en una ocasión se logró mantener vivas a las microfilarias por dos horas y cuarto en dos gotas de solución salina al 10% entre porta y cubre sellados con vaselina neutra).

De las nueve ranas, ocho resultaron positivas al -- exámen parasitológico con los siguientes resultados:

Rana No.	Microfilarias
1	+++
2	++++
3	+++
4	+
5	+
6	++
7	+
8	++++

En la sangre de la rana 9 sólo se encontró tripanosoma (T. rotatorium) y hasta su muerte no mostró microfilarias.

El resultado obtenido de la doble fijación fué muy bueno, se consiguió tener microfilarias casi rectas.

Por lo que hace a los resultados comparativos de -- los colorantes ensayados para las microfilarias se constató -- lo siguiente:

Rojo neutro.- Permitted distinguir perfectamente todas las estructuras internas. El máximo de coloración se dió a los 90 minutos y, aunque quedaron muy curvadas, fué factible trazar los dibujos necesarios.

Giensa.- Aunque es el colorante más usado para este tipo de estudios, los resultados no fueron muy satisfactorios pues sólo se consiguió teñir bien la columna de núcleos, quedando incoloros los espacios que están ocupados por otras estructuras y sólo en contadas ocasiones, fue posible percibir apenas algunos contornos de los mismos. La vaina se tiñó de rosa pálido.

Hemalum de Mayer.- La vaina tomó un color violeta azulado y se pusieron de manifiesto los órganos internos; sólo las células G_2 y G_3 quedaron poco diferenciadas.

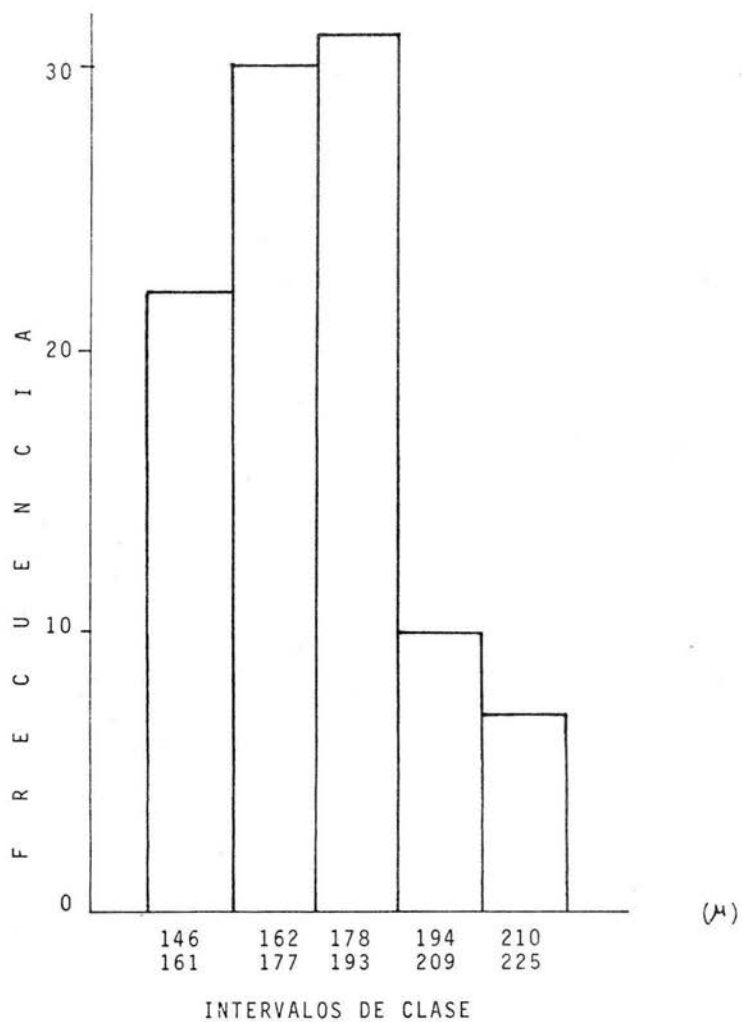
Hematoxilina férrica.- Se consiguió mayor nitidez que con el colorante anterior para las 4 células G. Las microfilarias tomaron un color amarillento, lo que hizo que el contorno no se aprecie muy bien y la vaina se tiñó de pardo grisáceo.

Hemateína de Roudabush.- De todos los colorantes ensayados éste es el que dió mejores resultados. La vaina se coloreó en azul violáceo y, en general, se vieron bien los órganos internos, sobre todo las células G, que son difíciles de distinguir.

Con las medidas obtenidas de la longitud total, se elaboraron 2 gráficas; una para comprobar que sólo se estudió una especie y la otra para ver la variabilidad en la longitud total de las microfilarias en función a los métodos de tinción ensayados.

El histograma 1 muestra la presencia de ejemplares muy pequeños (Longitud máxima = 224 y Longitud mínima = 146) pero el mayor número de los mismos se encuentra en los intervalos de clase más cercanos al del promedio, con distribución bastante homogénea.

El diagrama 1 muestra el promedio y la desviación estandar, permitiendo comparar fácilmente la retractilidad de las microfilarias con cada método de tinción. El método que más contrajo los ejemplares fué el de la Hematoxilina férrica, puesto que se salió por completo de los intervalos obtenidos con el Rojo neutro, mismo que se tomó como apoyo para la comparación, porque siendo un colorante supravital, hizo posible efectuar las medidas de las microfilarias en vivo.



Histograma I.- Longitudes totales de 100 microfilarias,
 (Longitud promedio 176 μ).

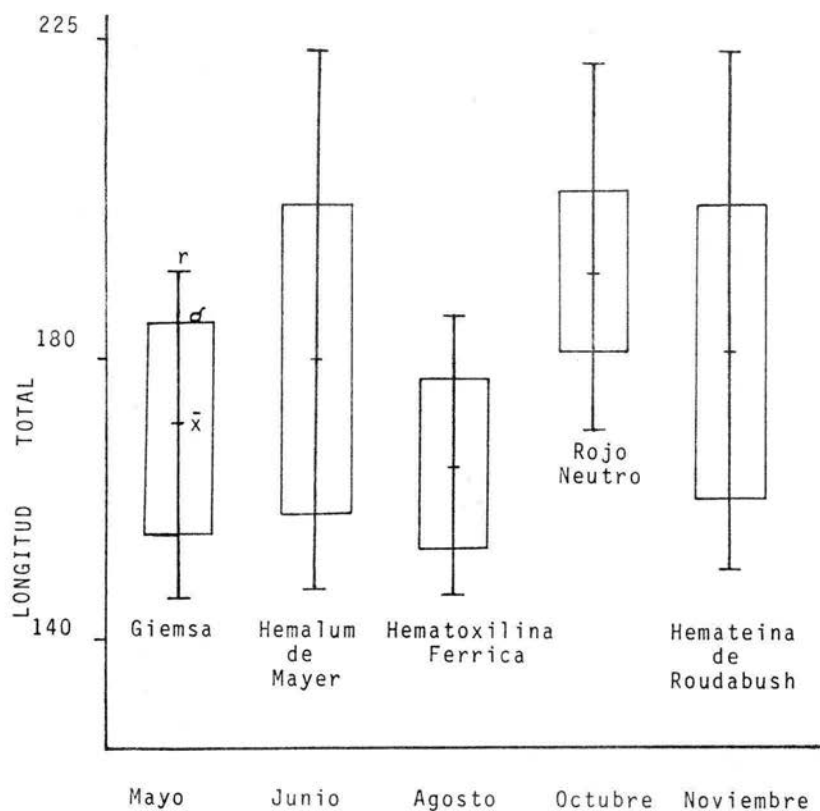


Diagrama 1.- Variabilidad de la longitud total de microfilarias en los diferentes metodos de tinción.

(20 microfilarias por c/método).

Rango - r
 Desviación estandar - σ
 Promedio - \bar{x}

FILARIAS ADULTAS

No fué necesario sacrificar las ranas, ya que éstas fueron muriendo en los diferentes tiempos que se anotan, desde la fecha de su captura y primer exámen de sangre (9.V.1985) Tabla III.

TABLA III

TIEMPO DE VIDAD DE LAS RANAS

RANA No.	TIEMPO DE VIDA
1	3 meses
2	11 meses
3	4 meses
4	12 meses
5	5 meses
6	6 meses
7	7 meses
8	5 meses
9	11 meses

En general, las filarias se encontraron en mesenterio y peritoneo de estómago, intestino, bazo e hígado; solo en la rana 8 se localizó una hembra y un macho en peritoneo cardiaco, una hembra en cloaca y otra en peritoneo parietal de la región abdominal.

La fijación con Alcohol Etílico al 30% en caliente dió exelentes resultados, puesto que las filarias quedaron es tiradas y flexibles.

El número de filarias encontradas en cada rana se -

anotan en la tabla IV donde se aprecia un notable equilibrio - en la proporción de los sexos.

TABLA IV.

NUMERO DE FILARIAS EN CADA RANA

Rana No.	♀ ♀	♂ ♂	Totales
1	20	12	32
2	1	2	3
3	4	6	10
4	1	1	2
5	1	5	6
6	5	1	6
7	1	2	3
8	25	33	58
Totales	8	58	62

Como transparentador, el Lactofenol hizo notorios -- los caracteres específicos, aunque algunos no se apreciaron -- con bastante nitidez.

Sin embargo las porciones separadas de las regiones anterior y posterior permitieron distinguir en su totalidad y conocer la posición correcta de las papilas cefálicas y acudales.

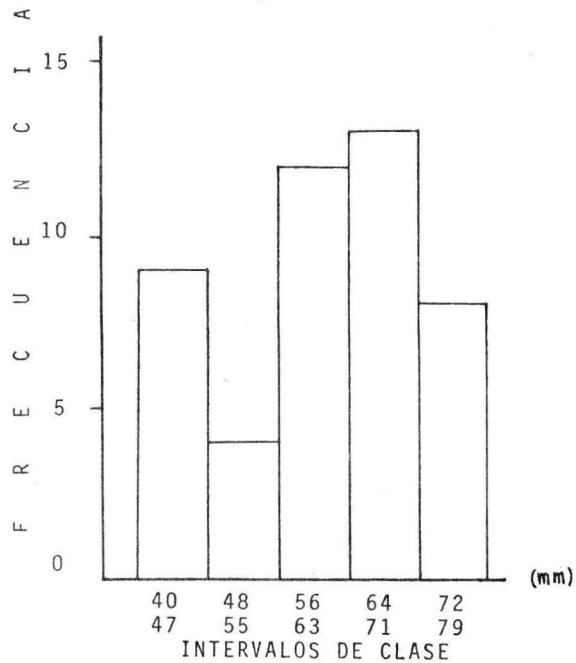
Al teñir con Hemalum de Mayer y Hemateina de Rouda--bush se observaron con mayor claridad los órganos, sobre todo el poro anal y el punto exacto donde el testículo termina (detalles difíciles de apreciar con el sólo aclaramiento).

Al igual que con las microfilarias, se tomaron las -

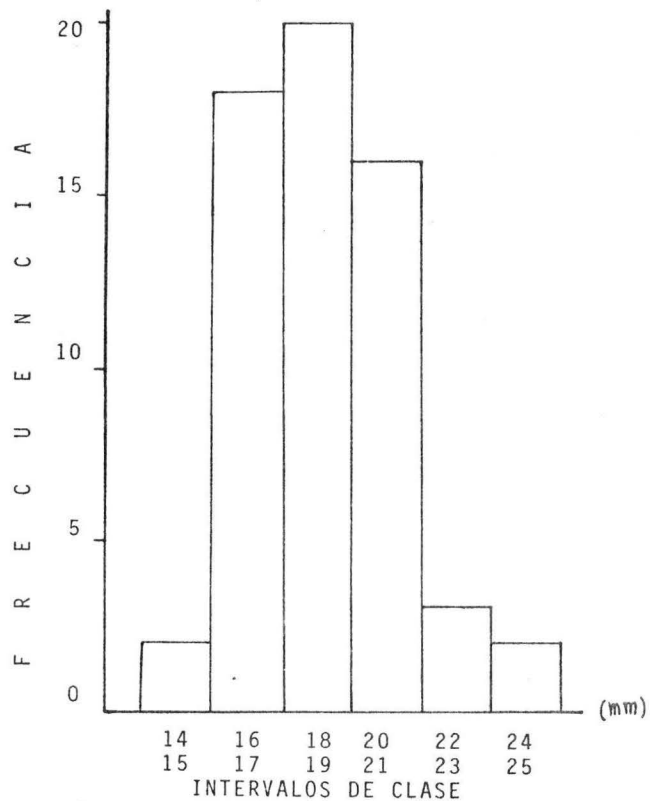
longitudes totales para elaborar una gráfica para cada sexo.

En el Histograma 2 se aprecia que la longitud de las hembras abarca grandes rangos, pero que el mayor número de organismos caen en el intervalo de clase en que se encuentra el promedio; también revela para el primer intervalo de clase, -- que la frecuencia de estas medidas es mayor que las que se encuentran a cada lado del intervalo con mayor frecuencia (en el que se encuentra el promedio) lo que nos hace pensar que encontramos varias filarias en desarrollo.

El Histograma 3 muestra una distribución normal, -- puesto que los organismos de mayor longitud presentan frecuencias menores que las que están cerca al promedio (las longitudes menores muestran el mismo comportamiento). Por lo tanto -- podemos suponer que las longitudes menores son de machos jóvenes, y las mayores tal vez sean el tamaño máximo que alcanzan éstos nemátodos cuando las condiciones para su desarrollo son adecuadas.



Histograma 2.- Longitudes totales de 46 ♀♀ (Longitud promedio 61 mm).



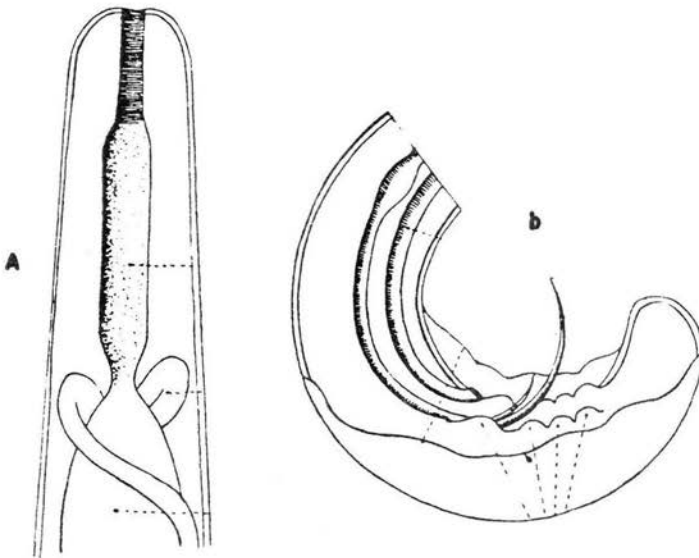
Histograma 3.- Longitudes totales de 61 ♂♂ (Longitud promedio 18 mm).

REDESCRIPCION DE LA ESPECIE DE FILARIA

Por lo anterior y las observaciones hechas acerca de la morfología general de este nemátodo al parecer es una sola especie perteneciente al género Waltonella (descrito anteriormente cuyos caracteres anotamos seguidamente:

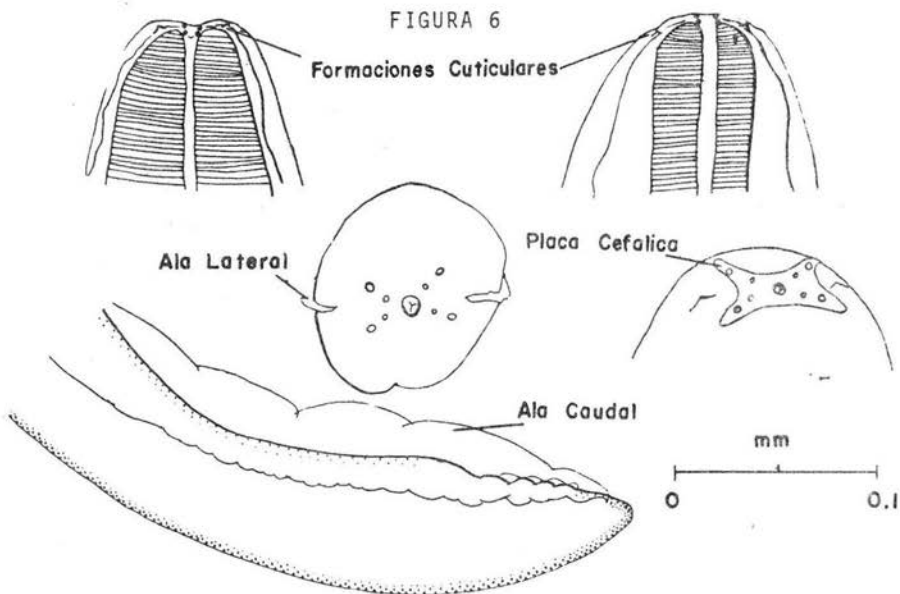
Waltonella striatus (Ochoterena y Caballero, 1932).

FIGURA 5



- A) Extremo cefálico de la hembra de (Foleyella Striata) W. striatus.
 b) Extremo caudal del macho.

♂.- Cuerpo cilíndrico, adelgazado hacia ambos extremos, con una longitud total de 14 - 23 mm y 0,322 - 0,341 mm de diámetro; cutícula con finas estriaciones transversales poco aparentes, mismas que se pierden hacia el extremo posterior; región anterior roma, con 4 pares de papilas submedianas, laterales a la abertura oral, los 2 pares menores internos y los mayores externos (Fig. 6A); anfidios pequeños; cápsula bucal rudimentaria, no quitinizada (Fig. 6B); extremo caudal enrollado ventralmente en espiral con una y media o dos vueltas; alas caudales bien desarrolladas, abarcando casi hasta la punta que es roma (Fig. 6C) región ventral caudal cubierta por pequeños tubérculos ordenados en hileras transversales y 4 pares de papilas.



Waltonella striatus A y B extremo anterior de un ♂ en vista lateral y apical; C y D extremo anterior de una ♀, en vista lateral y apical; E. extremo caudal de un ♂ en posición lateral.

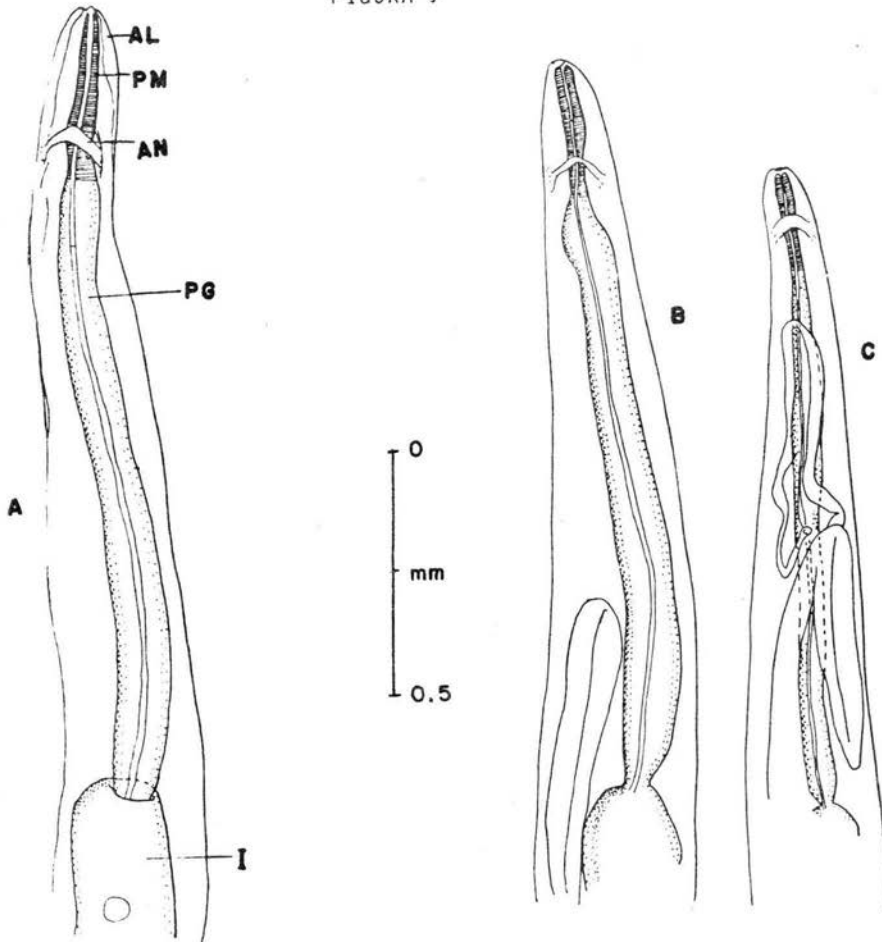
Esófago largo (Fig. 7A) con 1,40 - 1,48 mm de longitud y dividido en dos porciones, de las que la anterior es muscular (0,25 - 0,30 mm) subcilíndrica y con 0,024 - 0,033 mm de diámetro, y la posterior glandular (1,10 - 1,23 mm) engrosada progresivamente hacia su extremo distal, en el que alcanza un diámetro de 0,106 - 0,123 mm, comunicándose con el intestino mediante una válvula. Intestino casi recto, de mayor calibre que el esófago, alcanzando su mayor diámetro muy cerca de la unión con éste (0,207 - 0,227 mm).

El anillo nervioso dista del extremo anterior 0,223 - 0,241 mm y se halla situado en la región muscular del esófago.

El testículo, largo, sinuoso y doblado anteriormente, forma una asa que alcanza hasta la porción media del esófago - (Fig. 7 B y C) El orificio cloacal se abre a 0,08 - 0,012 mm. del extremo caudal. No hay gubernáculo. Sus 4 pares de papilas, sésiles y simétricas, están distribuidas de la siguiente forma (Fig. 8) un par pre o adcloacal, que son las de mayor tamaño y están una a cada lado del orificio cloacal y 3 pares -- postcloacales; disminuyendo su tamaño, forman aproximadamente una V, con el vértice hacia el extremo caudal (Fig.8B).

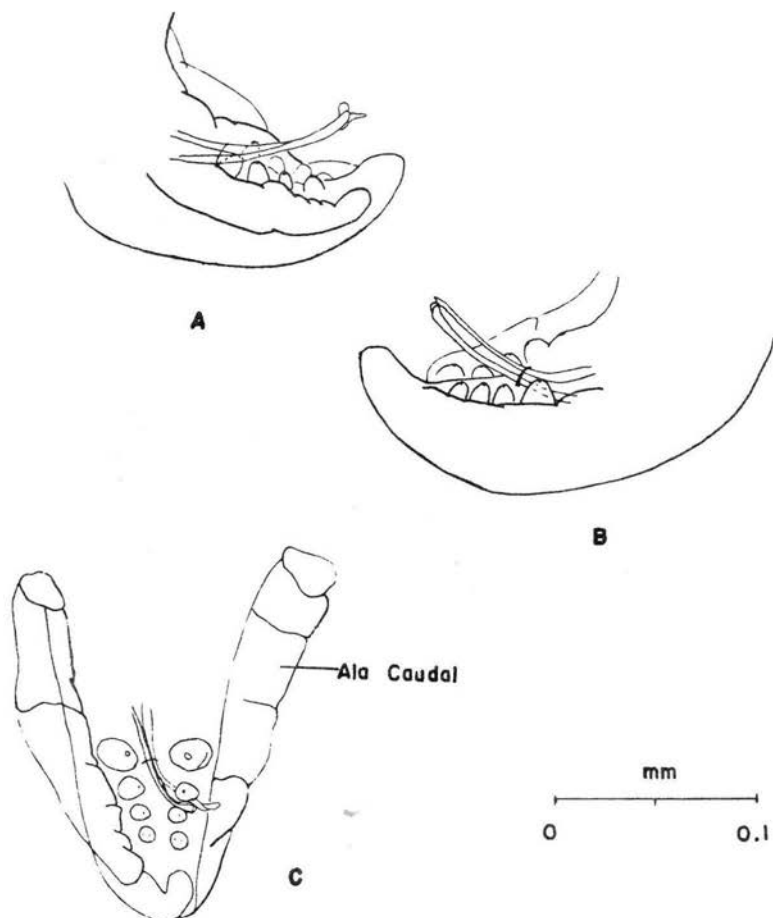
Espículas disímiles, tanto en forma como en tamaño, parcialmente quitinizadas en los bordes y algo más amplias en el anterior; la espícula mayor formada por dos porciones, la proxima ancha y la distal filiforme, midiendo en total 0,234 - 0,412 mm de largo por 0,006 - 0,015 mm de diámetro máximo y la menor 0,201 - 0,342 mm de largo por 0,005 - 0,012 mm de diámetro máximo (Fig. 9).

FIGURA 7



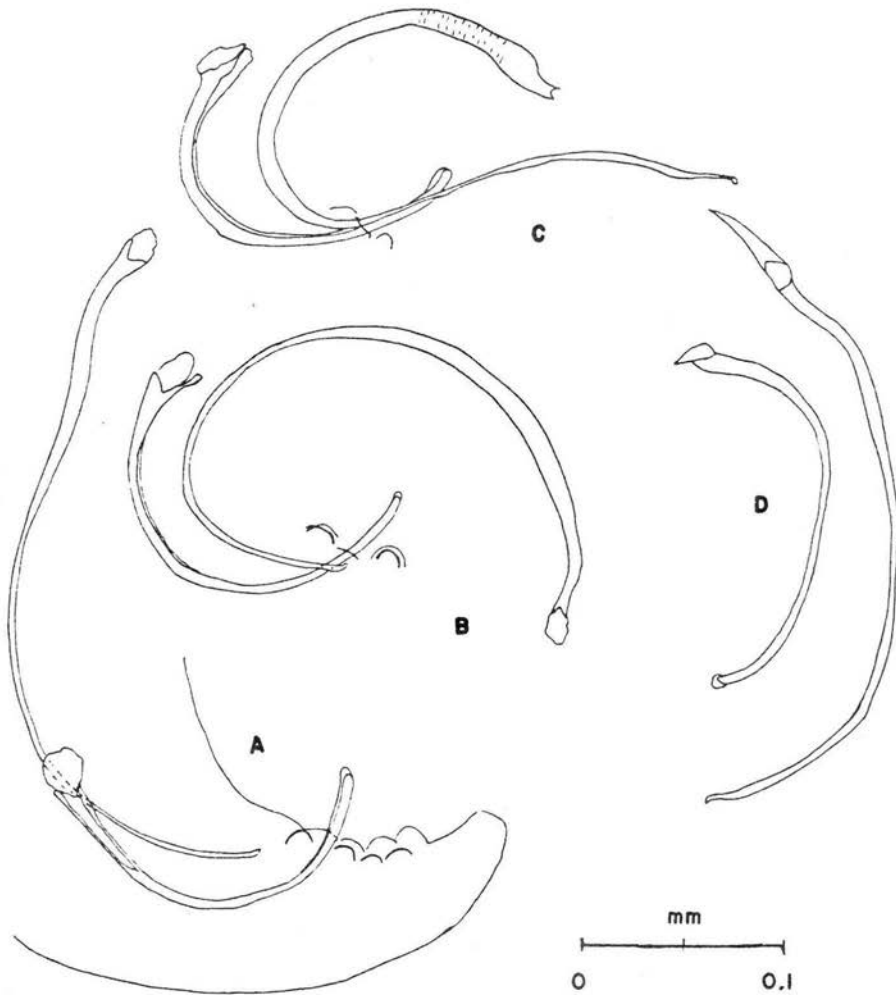
- A) Extremo anterior de un ♂: AL ala lateral; PM porción muscular del esófago; AN anillo nervioso; PG porción glandular; I intestino.
- B y C) Extremo anterior de 2 ♂♂ , en vista lateral con diferentes posiciones del asa testicular.

FIGURA 8



A y B, vista lateral del extremo caudal de un ♂ por ambos lados y C, vista ventral del extremo caudal de un ♂.

FIGURA 9



A, Extremo caudal de un ♂ en vista lateral; B y C, vista lateral de 2 pares de espículas en posiciones diferentes y D, espículas, mayor y menor fuera del organismo, en vista lateral.

♀ Cilíndrica, con el extremo anterior semejante al del macho, aunque más romo, y el posterior más delgado, digitiforme y casi recto; mide 40 - 76 mm de longitud y 0,651 - 0,725 mm de diámetro máximo. (Fig. 6 D y E).

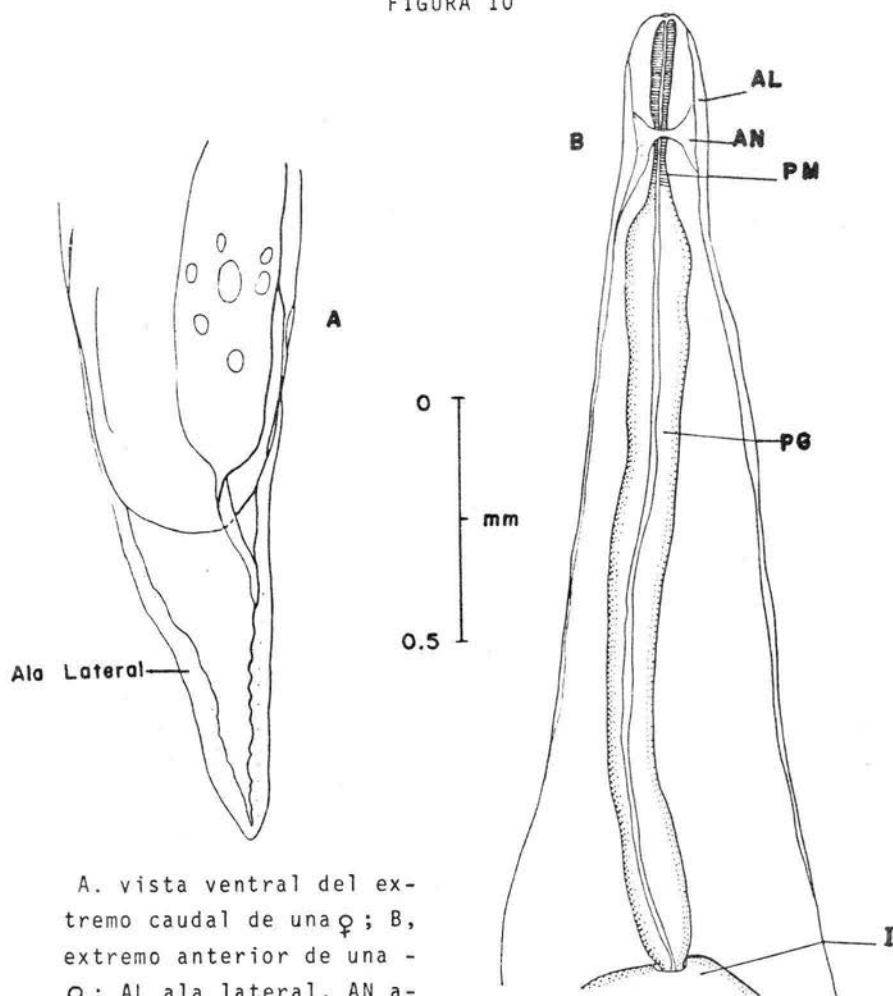
Cutícula con estriaciones transversales poco aparentes y alas laterales que llegan hasta poco antes de la punta del extremo posterior (Fig. 10 A).

Esófago largo, pero no tanto como en el sexo opuesto (Fig. 10 B) mide en total 1,90 - 2,234 mm, correspondiendo 0,370 - 0,402 mm la porción muscular y 1,530 - 1,832 mm a la región glandular, con 0,04 - 0,05 y 0,104 - 0,141 mm de diámetro máximo respectivamente; el anillo nervioso dista del extremo anterior 0,231 - 0,252 mm.

Aparato reproductor anfídelfo, con úteros tubulares muy largos y repletos de microfilarias; el ovario anterior, formando numerosas y complicadas asas; la vulva se abre a 0,917 - 1,65 mm del extremo anterior (Fig. 11); la vagina, difícil de ver* se encuentra a 10,422 mm del extremo anterior. El orificio anal se abre a 0,301 - 0,451 mm del ápice posterior del cuerpo (Fig. 11 C).

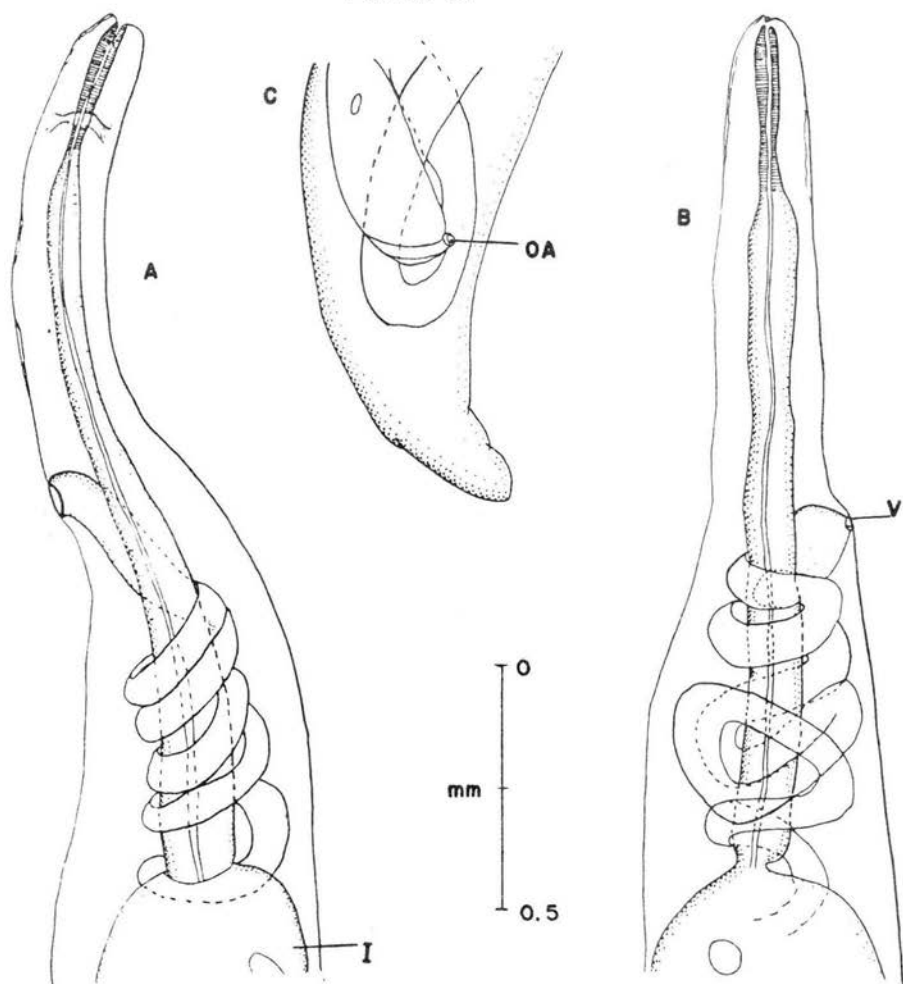
* Sólo se observó claramente en un ejemplar.

FIGURA 10



A. vista ventral del extremo caudal de una ♀; B, extremo anterior de una ♀; AL ala lateral, AN anillo nervioso, I intestino, PG porción glandular del esófago, PM porción muscular.

FIGURA 11



A y B Extremo anterior de 2 ♀♀ y C extremo posterior de una ♀ todas en vista lateral.
I intestino, OA orificio anal y V vulva.

Microfilarias,.- Abundantes en la sangre, grandes y con vaina flexible y ajustada; mide 0,146 - 0,224 mm de longitud por 0,003 - 0,004 mm de diámetro.

Extremo cefálico redondeado y el caudal adelgazado y romo; la cadena nuclear es compacta; los núcleos cefálicos (2) más grandes que el resto 0,0015 - 0,002 mm de longitud; - espacio cefálico amplio, con 0,004 - 0,005 mm de largo por -- 0,005 - 0,006 mm de ancho; el anillo nervioso dista 0,024 - - 0,030 mm del extremo anterior; el poro excretor y la célula - excretora a 0,041 - 0,045 mm y 0,044 - 0,056 mm respectivamente; el cuerpo interno, no muy largo, presenta su extremo anterior a 0,102 - 0,116 mm; la célula G₁, muy grande, abarca casi el diámetro total de la microfilaria y se encuentra a - - 0,107 - 0,135 mm; la célula G₂ y G₃ muy juntas, están a 0,135 - 0,155 mm; la G₄, que está separada de éstas, se halla a -- 0,156 - 0,163 mm y el poro anal se encuentra a 0,148 - 0,160 mm del extremo anterior (es poco visible).

Tomando el extremo cefálico como valor 0 (cero) y - el caudal como 100, la localización de las estructuras en términos de tanto por ciento, fue como sigue:

Anillo nervioso	14,90	-	14,92 %.
Poro excretor	22,38	-	25,46 %.
Célula excretora	27,86	-	27,32 %.
Cuerpo interno	57,72	-	63,37 %.
Célula G ₁	66,45	-	67,16 %.
Célula G ₂ y G ₃	77,11	-	83,85 %.
Célula G ₄	81,09	-	86,89 %.
Poro anal	78,10	-	85,04 %.

Localidad,.- México D. F. y Tocoautla Hidalgo, México.

Huésped definitivo,.- Rana pipiens y Rana neovolcánica (respectivamente).

Como complemento de la descripción anterior y con objeto de que pueda identificarse fácilmente esta especie, se presenta una clave para todas las del género Waltonella conocidas hasta 1979, misma que se elaboro con toda la información bibliografica disponible y la siempre valiosa dirección del Prof. Dionisio Peláez F.

Para ello se utilizaron fundamentalmente los caracteres de las papilas caudales de los machos, por lo que no se incluyen las especies:

W. leiperi (Railliet, 1916) de Bufo regularis. Sudán.

W. albareti (Bain, Kim y Petit, 1979) de Bufo marinus Guyana, Francesa.

W. dufuræ (Bain, Kim y Petit, 1979) de Bufo marinus Guyana, Francesa.

ya que las descripciones respectivas corresponden exclusivamente a hembras.

CLAVE PARA LA IDENTIFICACION DE LAS ESPECIES DE GENERO

Waltonella.

- 1 - Sin papilas pre- o adcloacales; sólo con 4 pares de papilas postcloacales; machos, 13 - 17 mm; hembras 50 - 63 mm; microfilarias, 0,263 - 0,295 mm.

W. dolichoptera y (Wehr y Causey, 1939).

Estados Unidos Americanos.

Rana pipiens y R. sphenoccephala.

- 1' - Con papilas precloacales o adcloacales y papilas postcloacales 2
- 2 (1) - Con un par de papilas pre- o adcloacales..... 3
- 2' (1) - Con 2 - 4 pares de papilas pre- o adcloacales... 10
- 3 (2) - Con una papila impar más un par de papilas pre- o adcloacales..... 4
- 3' (2) - Sin papilas impares pre- o adcloacales..... 6
- 4 (3) - Con 4 - 5 pares de papilas postcloacales, todas pedunculadas; machos, 15 mm; hembras, 18 - 47 mm microfilarias, 0,078 - 0,120 mm.

W. flexicauda (Schacher y Crans, 1973).

Stirling. New Jersey (E.U.A.).

Rana catesbeiana.

- 4' (3) - Con 3 pares de papilas postcloacales todas sésiles..... 5
- 5 (4') - Todas las papilas postcloacales son de igual tamaño; machos, 26 mm; hembras, 33 - 69 mm; microfilarias, 0,160 - 0,205 mm.

W. royi Bain, Kim y Peteit, 1979.

Maripasoula (Guyana).

Bufo marinus.

- 5' (4') - El primer par de papilas postcloacales son muy pequeñas, las del segundo más grandes y las -- del tercer par las mayores; machos 22,7 mm; -- hembras, 39 mm; microfilarias, 0,072 - 0,118mm.

W. oumari Bain, Kim y Petit, 1979.

Maripasoula (Guyana).

Bufo marinus.

- 6 (3') - Con 5 - 6 pares de papilas postcloacales; machos, 15 - 18 mm; hembras, 60 - 72 mm; microfilarias, 0,120 - 0,168 mm.

W. brachyoptera (Wehr y Causey, 1939).

Florida (E.U.A.).

Rana sphenocephala

- 6' (3') - Con 3 pares de papilas postcloacales 7
- 7 (6') - Longitud de la hembra menor que el doble de la del macho..... 8
- 7' (6') - Longitud de la hembra mayor que el doble de la del macho..... 9
- 8 (7) - Macho 21 - 25 mm; hembras, 26 - 45 mm; microfilarias, 0,130 - 0,190 mm.

W. guyanensis Bain y Prod'hon, 1974.

Maripassoula (Guyana Francesa).

Bufo marinus.

- 8' (7) - Machos 34 - 36 mm; hembras, 35 - 43 mm; microfilarias desconocidas.

W. scalaris (Travassos, 1929).

Brasil.

Leptodactylus ocellatus.

- 9 (7') - Machos, 9 - 12 mm; hembras, 22 - 33 mm; microfilarias, 0,145 - 0,215 mm.

Leopoldville (Congo Belga).

"sapo gigante y "rana no determinada".

W. duboisi (Gedoelst, 1916), (Witenberg y --
Gerichter, 1944).

especie tipo del género.

Lago Huleh (Norte de Palestina).

Rana esculenta ridibunda.

- 9' (7') - Machos, 14 - 23 mm; hembras 40 - 80 mm; microfilarias, 0,146 - 0,224 mm.

W. striatus (Ochoterena y Caballero, 1932).

México, D.F.

Rana pipiens, Rana halecina.

Tecozautla, Hidalgo (México).

Rana neovolcánica.

- 10 (2') - Con 2 pares de papilas pre- o adcloacales..... 11

- 10' (2') - Con 3 - 4 pares de papilas pre- o adcloacales... 13

- 11 (10) - Con 4 pares de papilas postcloacales cuyo tamaño va decreciendo del primer al último par en que son diminutas y muy cerca del extremo posterior; machos, 5 - 6.5 mm; hembras y microfilarias desconocidas.

W. confusa (Schmidt y Kuntz, 1969).

Luzón, Islas Filipinas.

Rana limnocharis vittigera.

11' (10) - Con tres pares de papilas postcloacales 12

12 (11') - Machos, 15 mm; hembras, 27 - 32 mm;

microfilarias desconocidas.

W. convoluta (Molin, 1858).

Brasil.

Leptodactylus pentadactylus, L. ocellatus.

L. typhonius, Hyla faber, Bufo marinus ?.

12' (11) - Machos, 36 mm; hembras, 37 - 50 mm:

microfilarias desconocidas.

W. vellardi (Travassos, 1929).

Brasil.

Bufo marinus.

13 (10') - Con 4 pares de papilas postcloacales y 3 pares -

de papilas pre- o adcloacales; machos, 8,7 mm;

hembras, 16,5 mm; microfilarias, 0,090 - 0,123mm.

W. ranae (Walton, 1929).

Louisiana (E.U.A.).

Rana catesbeiana, R. calamitans y R. sphenoccephala.

13' (10') - Con 3 pares de papilas postcloacales y 4 pares de

papilas pre- o adcloacales; machos, 23 mm; hembras

50 mm;

microfilarias desconocidas.

W. americana (Walton, 1929).

Illinois y Wisconsin (E.U.A.).

Rana pipiens.

D I S C U S I O N

Al estudiar las filarias de anfibios y las especies cercanas que parasitan reptiles, encontramos que en México, - la información acerca de ellas es escasa, sólo hay publicaciones de Ochoterena y Caballero (1932); Caballero (1935 y 1944) sobre filarias de "ranas" y "sapos", y dos descripciones de - Peláez y Pérez-Reyes (1958 y 1960) de filarias de reptiles.

Como ya se indicó previamente, la taxonomía de las filarias ha sufrido una serie de cambios y ajustes al parecer muy acertados, además de que se han tomado en cuenta caracteres que no se utilizaban y son importantes, como el que la -- vaina fuera o no flexible y que estuviera o no ajustada al -- embrión; la longitud del esófago en el tercer estadio larval y la forma de la estructura cefálica de los adultos.

Todo esto llevó a los autores interesados en el tema a la formación de una nueva subfamilia y un nuevo género - para filarias de anfibios; separandolas por completo de las - de los reptiles que son notablemente parecidas.

La frecuencia de filarias en la población de Rana - neovolcánica del río Tecozautla es apreciable, puesto que 8 - de los 9 ejemplares capturados estaban parasitados y en 4 de éstos la abundancia de microfilarias era notoria.

Por lo que hace a las microfilarias, al comparar el número de adultos por cada rana (Tabla IV) con la abundancia de éstas, parece no haber relación alguna, puesto que en el caso de la rana 1, que albergaba 20 hembras y 12 machos, la - abundancia de microfilarias fue menor que en el caso de la - rana 2, en la que sólo se encontró una hembra y 2 machos.

Esto se puede deber a que en la rana 1 había pocas hembras adultas y no todas estaban fecundadas, y probablemente las que lo estaban, aún no llegaban al momento exacto para la oviposición, puesto que al revisarlas contenían huevos embrionados, algunos ya muy cerca de la vulva; además, entre -- los machos tal vez había pocos adultos. En cambio la rana 2 la única hembra que tenía, era adulta y al revisarla, prácticamente tenía vacío el útero, y los dos machos, por su tamaño es probable que fueran adultos.

La técnica de vapores de Yodo para la fijación de - microfilarias da buenos resultados, ya que las mata casi al - instante, evitando que se contraigan demasiado.

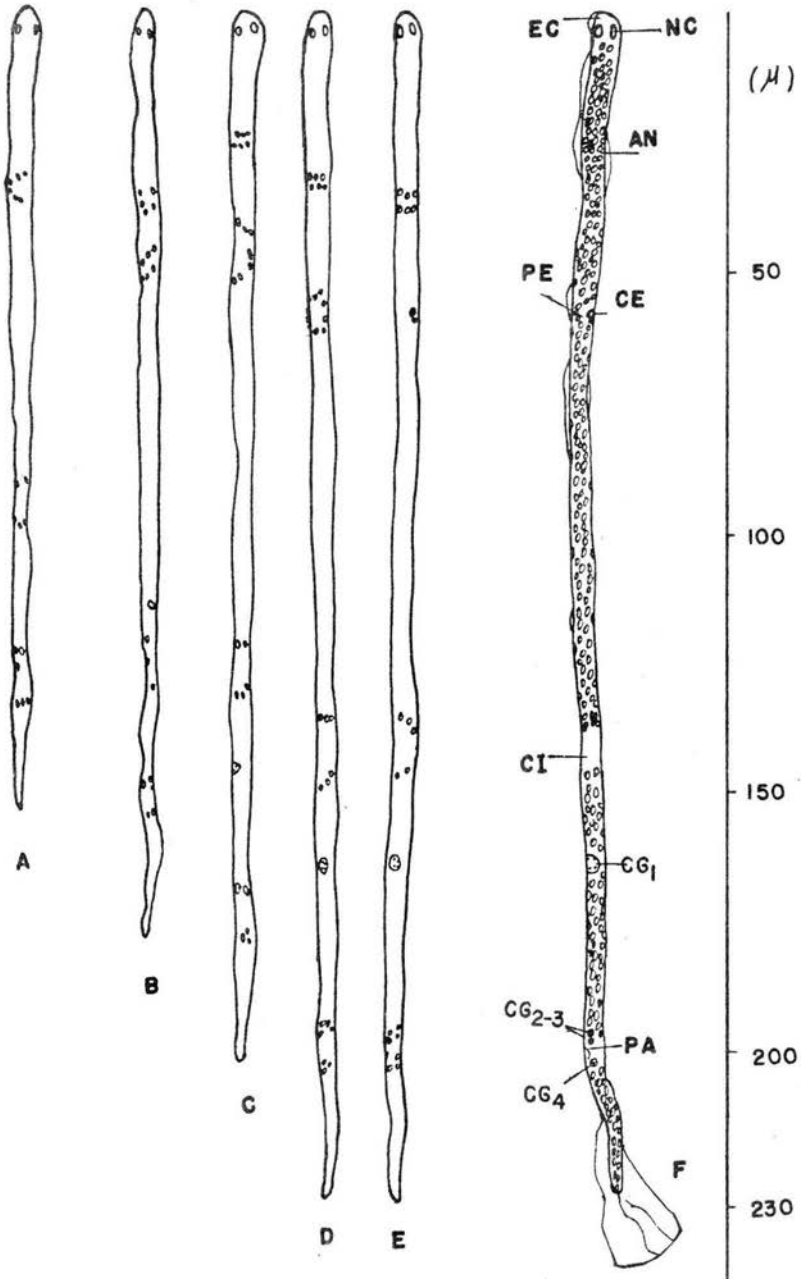
Para comparar la efectividad de los colorantes y mé todos de tinción se utilizó el Rojo Neutro como referencia, - puesto que en este método no se utiliza fijador.

Por lo que se muestra en el esquema de la Fig. 13 - la contracción de las microfilarias es uniforme, puesto que - la posición de sus órganos es proporcional a su contracción.

Los métodos que dieron mejores resultados fueron la Hemateína de Roudabush y el Hemalum de Mayer, mientras que el Giemsa las retrajo un poco más, la Hematoxilina férrica parece haber sido la que originó mayor contracción, debido probablemente al paso que implica sumergirlas en una solución ca-- liente a 40° durante diez minutos.

FIGURA 13.

Microfilarias en vista lateral teñidas con los diversos métodos de tinción: A. Hematoxilina férrica; B, Giemsa; C Hemalum de Mayer; D, Hemateina de Roudabush y E, Rojo neutro. F, microfilaria teñida con Rojo neutro, mostrando los principales caracteres taxonómicos; AN anillo nervioso, CE célula excretora; CG₁ - CG₄ células G₁-G₄; CI cuerpo interno (Inner - Körper); Ec es pacio cefálico; NC núcleo cefálico; PA pro anal y PE pro excretor.



Con relación a los adultos, en general siempre se colectaron en las hojas peritoneales, y en el caso de la rana 8, es de suponer, que su presencia en otras áreas del cuerpo quizá se debiera a la notoria abundancia de parásitos.

Al parecer no causan ninguna lesión grave al huésped, ya que al revisar internamente a éste, no encontramos ninguna anomalía notoria.

El estudio morfológico de las filarias no es complicado puesto que basta aclarar con Lactofenol para poder ver la mayor parte de sus órganos; pero puede cambiar la interpretación de su anatomía topográfica cuando sólo se utiliza éste o cualquier otro método para su detallada observación, por lo que es necesario anotar cuidadosamente las técnicas seguidas en cada caso.

Cuando se cuenta con una buena cantidad de ejemplares se pueden separar la región anterior y posterior con un corte apropiado para observar sus detalles mediante la transparentación y la tinción.

La tinción de los adultos implica tiempo, aunque sólo pueden ser teñidos cuando se les fragmenta, los resultados en este caso son satisfactorios. Los ejemplares que se tiñeron fueron aquellos que ya presentaban alguna ruptura a lo largo de su organismo, siempre y cuando no fuera muy cerca de las áreas de interés. Estas filarias no fueron tomadas en cuenta para los cálculos, puesto que pudieron haber experimentado algún cambio por la ruptura.

Acerca de la morfología de los adultos al compararlos, no se encontraron diferencias, aunque aparecieron variaciones notorias en sus longitudes, como lo muestran los histogramas 2 y 3. Al respecto es de suponer que esto se debe a -

las distintas etapas de desarrollo, en las que se pueden encontrar éstos nemátodos; por ejemplo, en las hembras (en donde se aprecia con más claridad) se encontró que de aquellas que presentan las longitudes menores, algunas no tienen microfilarias, y en las que si presentan, éstas se encuentran lejos de la vulva, por lo que probablemente se trate de hembras inmaduras. Ahora bien, en el caso contrario, se puede deber a una anomalia, ya que las tres de mayor tamaño sólo presentan unas cuantas microfilarias en los úteros, además dos de ellas coinciden con la mínima abundancia de microfilarias en la sangre (Rana 5 y 7), mientras que en la rana 2 que presenta gran abundancia, la longitud de su hembra fué de 66 mm.

Con los machos tambien se puede hablar de una anomalía puesto que de 61 ejemplares, sólo 2 sobrepasaron el patrón y los más pequeños es de suponer que están en etapa juvenil.

Al comparar los datos obtenidos, con los presentados por Ochoterena y Caballero (1932) se encontraron algunas diferencias (Tabla V) considerando que éstos autores no dispusieron del número de ejemplares con el que se contó en esta ocasión, ni practicaron los cortes de las regiones anterior y posterior empleando métodos de tinción más modernos; sus dibujos pueden referirse a la misma filaria con que se trabajó en esta ocasión, sólo que en una nueva localidad y tal vez en un nuevo huésped definitivo. No debemos olvidar que ahora al nombre de Rana pipiens es muy general; mientras que en aquel tiempo era más específico.

Waltonella striatus es un parásito que al parecer se encuentra sólo en ranas y hasta ahora sóloamente se ha reportado del centro de México.

Del huésped intermediario sólo se puede suponer que se trate de algún Culex ya que tanto en el Distrito Federal -

(de donde se tiene el primer reporte de éste parásito) como - en Tecozautla, las poblaciones de mosquitos son en su mayoría de especies de éste género.

TABLA V.
COMPARACION DE LAS MEDIDAS DE OCHOTERENA Y CABALLERO
(1932) CON LAS OBTENIDAS

MEDIDAS EN mm.	MACHOS	OCHOTERENA Y CABALLERO.	MEDIDAS OBTENIDAS.
Longitud total		15	14 - 25 (19).
Longitud entre el último - par de papilas y el extremo caudal.	De su base	0,069	0,034 - 0,042 (0,036)
	De su ápice		0,038 - 0,046 (0,042)
MEDIDAS EN mm.	HEMBRAS		
Longitud total		50 - 80	40 - 76 (66).
Posición del poro anal.		0,415	0,35 - 0,50 (0,42)
Posición de la vulva		3,663	1,35 - 1,70 (1,52).
MEDIDAS EN μ	MICROFILARIAS		
Longitud total		225	146 - 224 (177).
Posición del anillo nervioso		36	31 - 38 (32).
Del anillo nervioso al poro excretor		20	28 - 20 (15)
Entre el poro anal y la G ₁		46	46 - 51 (48).
Entre las células G y el extremo posterior.		32	23 - 31 (28).

Las medidas que se encuentran entre parentesis son los promedios.

C O N C L U S I O N E S

Las técnicas de fijación; así como ciertas modificaciones en los métodos de tinción, nos permitieron agregar algunos datos para el mejor estudio y conservación de este tipo de nemátodos.

Los mejores métodos de tinción fueron el Rojo Neutro, la Hemateína de Roudabush y el Hemalum de Mayer, sin descartar por completo al Giemsa y la Hematoxilina férrica, que probablemente para microfilarias desnudas den mejores resultados.

Por lo que respecta a la tinción de los adultos, se considera que éstos métodos son muy recomendables para aprovechar en todo lo posible el material que está a punto de ser desechado, por estar maltratado o roto, siempre y cuando se puedan obtener las partes de mayor importancia; así se pueden rescatar y usarse como material didáctico y de comparación.

La identificación de éstos helmintos, se basa en la posición de sus órganos, por lo que es de gran importancia indicar, las técnicas de fijación y métodos de tinción utilizados, al igual que la forma de medir y las escalas empleadas.

Las filarias estudiadas en éste trabajo pertenecen en su totalidad a Waltonella striatus (Ochoterena y Caballero 1932) con un nuevo huésped definitivo y nueva localidad.

El manejo y mantenimiento de las ranas en el laboratorio, no presentó dificultad alguna, lo que nos hace pensar que ésta contribución al estudio de filarioideos en anfibios puede servir para fines didácticos y quizá para obtener mode-

los biológicos que auxiliien en el estudio y tratamiento de -- las filariasis humanas, como son: "el gusano del ojo" (Loa -- loa) y las elefantiasis" (Brugia malayi, Onchocerca volvulus y Wuchereria bancrofti) puesto que éstos nemátodos pertenecen a la misma familia de las filarias con las que se trabajó.

A P E N D I C E

FIJACION DOBLEFIJACION CON VAPORES DE YODO
(Peláez *)

1.- En un pocillo de Siracusa con tapa, se colocan unos cuantos cristales de yodo, poniendo la caja tapada debajo de una lámpara, hasta que los vapores de éste saturan el recipiente (color naranja).

2.- El cubreobjetos invertido, con la gota de sangre -- pendiente, se expone a los vapores de yodo durante 15 - 20 segundos, cuidando que la gota de sangre no se coagule y que no toque los bordes del pocillo. Hay que evitar que los vapores escapen en demasía e inmediatamente, con otro cubre, se extiende la sangre así fijada.

FIJACION CON METANOL.

3.- Antes de que seque la sangre, se cubre la extensión con Metanol absoluto.

4.- Según la tinción que se vaya a emplear, convendrá - pasar la preparación, todavía húmeda, al colorante o se puede dejar secar a temperatura ambiente.

ROJO NEUTRO

(Según Langeron, 1949).

Colorante:

R rojo neutro en polvo..... unos gramos

Agua destilada 3 a 5 mililitros.

* Comunicación personal. A pesar que esta técnica se ha venido usando desde hace tiempo en el Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N. el Profesor D. Peláez no la ha publicado aún.

El colorante debe quedar en una concentración de 1% a 1‰.

Con un palillo húmedo, se toman unos granos de colorante y se disuelven en 3 ó 5 ml de agua, hasta que la solución tome un color púrpura (preparada cada semana).

En porta objetos limpios y libres de grasa, colocar una gota de la solución colorante, extendiéndola aproximadamente un cm en forma circular para que quede homogénea y dejar secar a la temperatura ambiente.

Método:

1.- En el portaobjetos ya preparado, recibir la sangre directamente de la rana.

2.- Cubrir con un cubreobjetos.

3.- Sellar con vaselina neutra, mediante una aguja doblada en ángulo, en la que se funde la vaselina a fuego directo y con la que se bordea el cubre.

GIEMSA

(Según Peláez, 1979).

Colorante:

Solución madre: esta solución se puede obtener ya hecha en el comercio; pero, también se prepara fácilmente en el laboratorio con la fórmula siguiente:

Azur II Eosina	3,0 g
Azur II	0,8 g

Glicerina Q.P.250,0 g (200 ml).
 Alcohol metílico absoluto250,0 g (312 ml)

a.- En un matraz Erlenmeyer, disolver el AzurII -- Eosina y el Azur II en la glicerina caliente a 60° agitando - bien durante 15 minutos.

b.- Agregar el Alcohol metílico y agitar otros 10 minutos, dejando después la solución en reposo durante 24 horas en el matraz perfectamente tapado; conviene cubrir su boca con papel de estaño o encerado.

c.- Filtrar a través de papel filtro de grado medio, descartando el residuo que queda en él y conserva el filtrado (Solución madre) en un frasco bien tapado.

Notas.- Conviene calentar previamente la Glicerina hasta 60° antes de agregar las sustancias colorantes, dejando reposar durante 2 horas después que se hayan disuelto y antes de adicionar el Alcohol metílico.

Se debe conservar en lugar fresco y en frasco ámbar.

Para teñir, se diluyen 2 gotas de la solución madre por cada milímetro de agua destilada.

Método:

1.- Directamente de la fijación, sumergir las extensiones en la solución acuosa de Giemsa20 minutos.

2.- Lavar con agua corriente, de la llave, hasta que no suelten color, cuidando que el agua no caiga con fuerza directamente en la extensión.

3.- Dejar secar a temperatura ambiente.

4.- Montar en Bálsamo de Canadá o Resina sintética.

En los métodos de tinción que a continuación se presentan, aparecen 3 modificaciones en común, para la tinción - de microfilarias:

- La rehidratación se comenzó con Alcohol 96%, descendiendo cada 10° hasta llegar al Alcohol 30% y de ahí pasar al agua destilada.

- Se aumentó el tiempo de tinción a 24 horas. De esta forma, al sobreteñir, la diferenciación se efectuó lentamente.

- La deshidratación se hizo con los mismos pasos que la rehidratación, a la inversa; las extensiones se pasaron -- por Alcohol absoluto (1 minuto) y Xilol (30 minutos) para asegurar que no quedara agua; así, al aclarar con Esencia de Clavo se consiguieron preparaciones limpias.

Los cambios individuales se irán indicando en forma de nota al final de cada método.

Todas las preparaciones se montaron en Resina Sintética.

HEMATOXILINA FERRICA

(Según Langeron, 1949)

Colorante:

Hematoxilina al 1% de Shortt

Hematoxilina 1 g.
 Agua destilada95 ml.
 Acido fénico licuado 5 ml.

Disolver lentamente a ebullición la Hematoxilina en el agua destilada; cuando se ha disuelto por completo, se aña de el Acido Fénico licuado (para licuarlo se puede hacer con calor o un poco de agua, hasta que quede como jarabe).

Mordente:

Solución de Alumbre de Hierro al 2%

Sulafato amónico-férrico 2 g
 Agua destilada100 ml.

Se hace en FRIO y preferentemente cuando vaya a --
 usarse.

Método:

Después de fijar y antes que seque la preparación:

- 1.- Poner los cubres en alcohol 70% 2 min.
- 2.- Sumergirlos en alcohol 70% yodado 2 min.
- 3.- Pasarlos sucesivamente a alcohol de 70 y 50%. 2 min.
- 4.- Lavarlos en agua destilada 2 min.
- 5.- Sumergirlos en Solución de Alumbre de Hierro (acuosa al 2%) CALIENTE a 40°..... 2 min.
- 6.- Lavarlos en agua corriente de la llave 3 min.
- 7.- Teñir las preparaciones por inmersión en la Solución de Hematoxilina al 0,5% 2 min.
- 8.- Lavar con agua corriente 2 min.
- 9.- Diferenciar con Solución acuosa de Alumbre de Hierro al 2% FRIA, entre porta y cubre y al microscopio.

- 10.- Lavar con agua15 min.
- 11.- Sumergirlas, sucesivamente, en Alcohol de 70, 80, 90% y absoluto 2 min.
- 12.- Pasarlos a Xilol5a10min.
- 13.- Montar en Bálsamo de Canadá, Clarite o Permont.

NOTA: Se suprimieron los pasos 1 y 2 ya que los fijadores no contienen mercurio. Se aumentó a 10 minutos en el mordente disminuyendo a 1 minuto el tiempo de lavado, para asegurar la tinción. Después de la diferenciación, se hicieron 7 cambios en el lavado, para quitar por completo el diferenciador.

HEMALUM DE MAYER
(Mayer, 1909)*

Colorante:

Agua destilada	100 ml
Hematoxilina, cristales (Geigy)	1 g
Yodato de Sodio (o K)	0,2 g.
Alumbre potásico	50 g

Se mezcla todo y se deja disolver a la temperatura ambiente hasta que tenga color violáceo, lo que indica que la oxidación es total. Si ésta es lenta, puede ponerse en la estufa a 37° durante algunas horas.

Método:

Después de fijar y antes de que se seque la preparación;

- 1.- Rehidratar con alcohol de 50% y 30% 15 min.c/u
- 2.- Agua destilada 15 min.
- 3.- Teñir con Hemalum 20 min. a varias horas.

* La fórmula más reciente de Mayer es la publicada en 1909: Ztschr. F. wiss. Mikr., 20: 240 (Según Langeron, 1949).

- 4.- Lavar con agua hasta que la preparación no suelte color.
- 5.- Decolorar con agua destilada acidulada (HCl al 1%)
- 6.- Lavar con agua destilada 3 cambios
- 7.- "Virar" con agua alcalina débil (Solución muy débil de Carbonato de Litio o de Bicarbonato de Sodio en agua destilada).
- 8.- Lavar con agua destilada15 a 20 min.
- 9.- Deshidratar con la serie de alcoholes....15 min. c/u
- 10.- Transparentar con Creosota o Esencia de Clavo.
- 11.- Montar en Bálsamo de Canadá.

NOTA: Se suprimió el viraje con agua alcalina débil, ya que el agua de la llave del laboratorio tiene un pH de 7,3, suficiente para virar, y con 5 cambios más se eliminó en absoluto el agua acidulada (decolorante).

HEMATEÍNA DE ROUDABUSH
(Según Peláez, 1979)

Colorante:

Solución A	{ Sulfato aluminico potásico .. 25 g. Agua destilada500 ml.
Solución B	

Añadir lentamente la solución A a la B. Dejar reposar media hora y filtrar. Mantener al filtrado en un frasco ámbar, en maduración 2 meses.

Método:

Después de fijar y antes de que seque la preparación.

- 1.- Hidratar con alcohol de 50 y 30% 20 min.
a 1 hora
- 2.- Lavar con agua.
- 3.- Colorante 1 Hora
- 4.- Lavar 3 veces con agua, c/u 5 min.
- 5.- Desteñir con alcohol de 35% clorhídrico,
hasta color rosa (6 gotas de Acido clor-
hídrico en 100 ml de Alcohol etílico 35%).
- 6.- Agua amoniacal (2 gotas de NH_4OH en 500
ml de agua). 20 min.
- 7.- Lavar varias veces con agua.
- 8.- Deshidratar con Alcoholes de 35, 50, 70,
85 y 90%, c/u. 5 min.
o más
- 9.- Creosota 1 Hora.
- 10.- Xilol 2 cambios
- 11.- Montar en Xilol-Dammar.

NOTA: En la hidratación sólo se dieron 15 minutos para cada Alcohol; en el agua amoniacal se hicieron 2 cambios de 10 - minutos cada uno y cambiamos la Creosota por Esencia de Clavo.

Tanto en el Hemalum de Mayer como en la Hemateína de Roudabush al utilizarles para la tinción de adultos se les hicieron 3 cambios a los ya mencionados en la tinción empleada para las microfilarias:

- Al rehidratar las piezas, se procedió así:

Alcohol 70%	+	Alcohol 60%	a.a.	30 min.
Líquido anterior	+	Alcohol 60%	a.a.	" "
Líquido anterior	+	Alcohol 50%	a.a.	" "
Líquido anterior	+	Alcohol 50%	a.a.	30 "

Así sucesivamente hasta que quedaron completamente en agua destilada.

- La deshidratación se hizo a la inversa, aumentando el tiempo a 60 minutos en cada líquido, hasta llegar a Alcohol Absoluto.

- Para aclarar se uso Xilol, con dos cambios de 60 minutos en cada uno.

VERDE DE METIL-PIRONINA

(Método de Fülleborn, según Golvan, 1957)

Colorante:

Verde metilo	1,50 g.
Pironina	2,5 g.
Alcohol 95%	5 ml.
Glicerina	20 g.
Agua destilada fenicada al 0,5%	100 ml.

Se prepara en frío y se conserva varios meses en la obscuridad.

En el momento de emplearse agregar 10% de suero fisiológico a 9%.

Método:

- 1.- Sin fijar y sin que se seque, llevar inmediatamente a la solución colorante 4 ó 6 hrs
- 2.- Lavar con agua de la llave.
- 3.- Diferenciar con al serie de Alcoholes de la siguiente manera:

5 segundos.....	Alcohol 70%
10 "	" 85%
15 "	" 95%
20 "	" absoluto
1 minuto	" absoluto

- 4.- Pasar por Tolueno o Xilol.
- 5.- Montar en Balsamo de Canadá.

NOTA: Como este método de tinción es para extensiones de sangre, se comienza en tales casos por la deshemoglobinización, que aquí no cabe, ya que se utilizó para adultos.

La rehidratación se hizo como ya se indicó; la deshidratación se aumentó a 90 minutos en cada líquido, ya que con el Alcohol se lleva a cabo la decoloración.

Al llegar al Alcohol 80%, las estructuras internas deben diferenciarse, y a partir de aquí, si se quiere se puede reducir a 60 minutos el tiempo en cada caso.

LITERATURA CITADA

- Ahmed, S. A. 1966.- Location of developing. and. adult worms of Brugia sp. in naturally and experimentally - infected animals. Jour. Trop. Med. & Hyg. 69. - 291 - 293. (Citado por Faust et al., 1981).
- Anderson, R. C. 1958.- Méthode pour L'examen des nématodes - en vue apical, Ann. Parasitol. Hum. Comp., 33 - (1 - 2): 171 - 172.
- Anderson, R. C. 1958.- The comparative morphology of cephalic structures in the superfamily Filarioidea (Nematoda). Canadá. Journ. of Zool. 46: 181 - 199.
- Anderson, R. C. y O. Bain 1976.- Keys to genera of the order Spirurida. Part. 3 Diplotriaenoidea, Aproctoidea and Filarioidea. CIH Keys to the nematode - parasites of Vertebrates, pp. 59 - 116. Edit. por R.C. Anderson et al. Commonw., Agric. Bur., Fernham Royal, England.
- Bain, O. y J. Brunhes 1968.- Un nouveau genre de filaire, - parasite de grenouilles malgaches. Bull. Mus. - Nat. Hist. Nat. (Paris). 2Ser, 40: 797 - 801.
- Bain, O., D. Ch. Kim y G. Petit 1979.- Diversité spécifique des flaires du genre Waltonella coexistant chez Bufo marinus. Bull. du Muséum National d' Hist. Nat., 4^a serie 1 (Sect. A): 199 - 212.
- Bain, O. y J. Prod'hon 1974.- Homogénéité des filaires de ba traciens des genres Waltonella, Ochoterenella et Madochotera; création de Waltonellinae n. --

- subfam. *Annls. Parasit. Hum. Comp.*, 49; 721 - 739.
- Baylis, H.A. y R. Daubney 1926.- A. sinopsis of the families and genera of Nematoda, 277 pp., British Museum London (Citada por Hyman, 1951).
- Benach, J. L. y W. J. Crans 1973.- Larval development and -- transmission of Foleyella flexicauda Schacher -- and Crans, (Nematoda: Filarioidea) in Culex -- territans *J. Parasit.* 59 (5): 797 - 800.
- Caballero, E. 1935.- Nemátodos parásitos de los batracios de México. III. *An. Inst. Biol. UNAM.*, México, 6: 103 - 117.
- Caballero, E. 1944.- Estudios helmintológicos de la región - oncocercosa de México y de la República de Guatemala; Nematoda; la parte Filarioidea I. *An. - Inst. Biol. Univ. México.*, 15: 87 - 108, 18 Figs.
- Causey, O. R. 1939.- Development of larval stages of Foleyella brachyoptera in mosquitoes. *Amer. J. Hyg.* - 30 (Sect. D): 69 - 71.
- Causey, O. R. 1939.- A. Description of three species of frog microfilariae, whit notes en staining methods - *Amer. J. Hyg.*, 30 (Sect. D): 117 - 121.
- Cowper S. G. 1945.- Some observation on a Filaria, Foleyella leiperi (Railliet, 1916) of the north american leopard-frog. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 39: 119 - 123.

- Chabaud A. G. 1974.- Keys to subclasses, orders and superfamilies CIH Keys to the nematode parasites of -- vertebrates, pp. 6 - 17. Edit. por R.C. Anderson et al. Commonw. Agric. Bur. Farnham Royal, Bucks, England.
- Chabaud A. G. y R.C. Anderson 1959.- Nouvel essai de classification des filaires (superfamille des Filarioidea) II. 1959. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 34 - (1 - 2): 64 - 87.
- Chabaud, A. G. y M. T. Choquet 1953.- Nouvel essai de classification des filaries (superfamille des Filarioidea). Ann. de Parasitologie, 28 (3): 172 - 192.
- Chitwood, B. G. 1937.- A revised classification of the Nematoda, pp 69 - 80. In Skrjabin Festschrift (Moscu). (Abstract, J. Parasitol., 20 (2), 1933, p. 131). (Citado por Faust et al., 1981).
- Chitwood, B. G. y M. B. Chitwood 1937 y 1938.- An introduction to Nematology. Sect. 1 Pt, 1: 53 pp. y Pt. 2: 55 - 125 pp. (Citado por; Yamaguti, 1961).
- Chitwood, B. G. y M. B. Chitwood 1950.- An introduction to -- nematology Sect. 1 Anatomy. Monumental. Printing Co. Baltimore. (Citado por Chabaud, A. G. y R.- C. Anderson 1959).
- Duke, B.O.L., D. J. Lewis y P.J. Moor 1966.- Onchocerca-Simulium complexes. I. Transmission of Forest and - Sudan-savanna strains of Onchocerca volvulus -- from Cameroon, by Simulium dannosum from various

- West African bioclimatic zone. Ann. Trop. Med. & Parasit. 60: 318 - 336. (Citado por Faust et al, 1981).
- Faust, E. C., P. F. Rusell y D. R. Lincicome 1981.- Craig y Faust Parasitología Clínica. Versión español de la 8a. ed. amer., VIII + 888 pp., Salvat Mexicana de Ediciones, S. A. de C. V., México.
- Fulleborn, F. 1914.- Zur technik der Microfilarien Farbung. Centralb. F. Bakteriolog. Paraitenk. u. Infektionskr. 73: 427 - 444. (Según Langeron, 1949; 952 953).
- Geddoelst, L. 1916.- Notes sur la faune parasitaire du Congo Belge. Revue. Zool. Afr., 5: 1 - 90. (Citado por Bain y Prod'hon, 1974).
- Golvan, Y. J. 1957.- Les principales techniques de coloration des microfilaries sanguicoles. Bull. Soc. Pathol Exot., 50 (1): 143 - 157.
- Hillis, D. M. y J. S. Frost 1985.- Three new species of Leopard frogs (Rana pipiens complex) from the Mexican Plateau. Occas. Papers. of the Mus. of Nat. Hist., Univ. Kansas. Lawrence Kansas, Nr., 117: 1 14.
- Hillis, D. M., J. S. Frost y D. A. Wright 1983.- Phylogeny - and biogeography of the Rana pipiens Complex: - A biochemical evaluation. Syst. Zool., 32: 132 143.
- Hyman, L. H. 1951.- The Invertebrates: Acanthocephala, Asche]

minthes y Entoprocta. The pseudocelomate Bilateria. Vol. III, 1^a ed, McGraw-Hill Book Company, Inc., VIII + 572 pp.

- Ilar, 1974.- Amphibians: guidelines for the breathing, care - and management of laboratory animals. A report of the Sub committee on amphibian standards. Committee on Standards. National research council. National Academy of Science. Washington
- Kundsén, J. W. 1966.- Biological techniques Collecting Preserving and Illustrating Plants and Animals. -- Harper & Row, Publishers New York., XI + 525 pp.
- Kotcher, E. 1941.- Studies on the development of frog Filariæ. Amer. J. Hyg., 34, Sect. D: 36 - 65.
- Langeron, M. 1949.- Précis de Microscopie, VIII + 1430 pp. - Masson et Cie, Aditeurs, Paris.
- Lebiel, B. 1961.- Introduction a la theorie de L'evolution - intrasynetiale des filariata. I. Sur la phagocytose des microfilaires Onchocerca volvulus -- par les fibres musculaires thoraciques chez Simulium. Rev. Parasitol. 22: 107 - 136. (Citado por Faust et al., 1981).
- Linstow, O. von. 1899.- Nematode aus berliner zoologischen. Sammlung Mitt. zool. Samml. Musc. Naturk Berlin I (2): 3 - 28, 78 Figs.
- Nelson, G. S. 1960.- The identification of filarial larve in the their vectors. Indian J. Malariol., 14: 585 592. (Citado por Faust et al., 1981).

- Ochoterena I. y E. Caballero 1932.- Una nueva filaria parásita de las ranas. An. Inst. Biol. Univ. México., 3 (1): 29 - 32.
- Peláez, D. y M. Cortés J. 1980.- El diagnóstico de laboratorio en Parasitología Médica. (Manual para un curso Teórico Práctico) 53 pp. Escuela de Graduados, Universidad de Guadalajara, México.
- Peláez, D. y R. Pérez Reyes 1958.- Piratuba prolifica nov. sp., parásita de un Sceloporus mexicano. Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IX (1 - 4): 49 - 59.
- Peláez, D. y R. Pérez Reyes 1960.- Piratuba lanceolata nov. sp, parásita de la lagartija Sceloporus teapensis Gunther, 1890, (Nemat. Filar.) Revista Latinoamericana de Microbiología. 3 (2): 67 - 73.
- Post D. D. y D. Pettus 1966.- Southwest. Natur. 11: 476. (Según, Littejohn y Oldham, 1968).
- Railliet, A. 1916.- Sur les filaires de batraciens. Bull. -- Soc. Path. Exot., 9: 137 - 140 (Citado por Bain y Prod'hon, 1974).
- Rodríguez López-Neyra, C. 1956.- Revisión de la superfamilia Filarioidea (Wainland, 1858). Revista Iberica de Parasitología. 16 (ene. - oct.): 3 - 225.
- Rodríguez López-Neyra, C. 1957.- Revisión de la superfamilia Filarioidea (Weinland, 1858) (Adiciones). Revista Ibérica de Parasitología. 17 (julio): 169 - 273.

- Schacher, J. F. 1975.- Waltonella, nom. nov. for subgenus -- Waltonia (Nematoda: Filarioidea) Schacher and -- Crans, 1973, preoccupied by Waltonia Davisson, 1850 (Brachiopoda). Research note. J. Parasit., 61 (1): 58.
- Schacher, J. F. y W. J. Crans 1973.- Foleyella flexicauda sp. n. (Nematoda: Filarioidea) from Rana catesbeiana in New Jersey with a review of the genus and -- erection of two new subgenera, J. Parasit., 59 (4): 685 - 691.
- Schacher, J. F. y G. M. Khalil 1967.- Foleyella philistinae sp. n. (Nematoda: Filarioidea) from the lizard Agama stellio in Lebanon with notes on Foleyella agamae (Rodhain, 1906). J. Parasit. 54: 763 - - 767.
- Schmidt, G. D. y R. E. Kuntz 1969.- Nematodes parasites of - Oceanica VI. Foleyella confusa sp. nov. (Fila-- rioidea) and other species from philippine amphi-- bians. Parasitology, 59: Parte 4: 885 - 889.
- Seurat. L. G. 1917.- Filaires des Reptiles et des Batraciens Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord. 8: 236 - 242, Figs. 1 - 8 (Citado por Wehr. 1935).
- Travassos, L. 1929.- Filaridés de Batraciens du Brésil. C.R. Soc. Biol., 100 (11): 967 - 968.
- Walton, A. C. 1929.- Studies on some Nematodes of North Ame-- rican frogs. I. J. Parasit., 15 (4): 227 - 239.
- Wehr, E. E. 1935.- A revised classification of the nematode

superfamily Filarioidea, Proc. Helm. Soc. Wash.
2 (2): 84 - 88.

Wehr, E. E. y O. R. Causey 1939.- Two new Nematodes (Filarioidea: Dipetalonematidae) from Rana sphenoccephala. Amer. J. Hyg., 30 (Sect. D): 65 - 68.

Witenberg, G. y C. Gerichter 1944.- The morphology and life history of Foleyella duboisi with remarks on -- allied filariids of amphibia. J. Parasit., 30 (abril): 245 - 254.

Yamaguti, S. 1961.- Systema Helminthum. Vol. III (Parts I y II); The nematodes of vertebrates, 1261 pp. Interscience Publishers, New York, London.

Yorke, W. W. y P. A. Maplestone 1926.- The Nematode parasites of Vertebrates 563 pp. J. & A. Churchill, - London.