



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TOXICIDAD Y PATOGENICIDAD AGUDA
ORAL DEL HONGO *Metarhizium anisopliae*
var. *acridum* EH-502/8

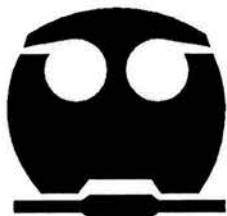
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA
BIÓLOGA

P R E S E N T A :

FABIOLA VEGA GARCIA



MÉXICO, D.F.



2004

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

JURADO ASIGNADO.

Presidente JOSÉ ALEXANDRO BONIFAZ TRUJILLO

Vocal MA. ANTONIETA SILVA CHAVEZ

Secretario CONCEPCIÓN TORIELLO NAJERA

1er Suplente BERTHA JOSEFINA ESPINOZA GUTIÉRREZ

2do Suplente JOSÉ CORDERO HERNANDEZ

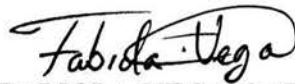
EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE MICOLOGÍA
BÁSICA, FACULTAD DE MEDICINA, DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA

Asesor



CONCEPCIÓN TORIELLO NAJERA

Sustentante



FABIOLA VEGA GARCIA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Fabiola Vega García

FECHA: 11 - Mayo - 2004

FIRMA: Fabiola Vega

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Concepción Toriello Najera por la oportunidad que me dio al desarrollar este proyecto, por la confianza y enseñanzas a lo largo de todo el tiempo en que realice esta tesis.

A la Dra. Teresa Mier por su asesoría académica y revisión crítica y exhaustiva del manuscrito.

Al Dr. Marte Lorenzana por su asesoría académica en el área de farmacología y metodos de inoculación de animales, y por las facilidades para el uso del bioterio del departamento de farmacología en la facultad de medicina.

Al Dr. Armando Pérez Torres por su asesoría académica en el área de histopatología así como en la interpretación de los resultados.

A los integrantes del laboratorio de Micología Básica, Hortensia Navarro, Amelia Pérez, Gina Cavallazzi, Patricia, Elena, David Basilio, Roberto Suárez, Daniel Villamil, por compartir sus conocimientos, consejos y apoyo técnico para la realización de este trabajo, pero por sobre todo por su amistad

DEDICATORIAS

A mi esposo Ricardo Alfaro Fuentes a quien amo y admiro, gracias por ser el mejor compañero y amigo, por su apoyo incondicional, por estimularme todos los días a terminar esta tesis y ayuda en momentos difíciles, pero sobre todo por su cariño, paciencia y por mirarme a los ojos todos los días.

Je t'aime, je t'aime et Je t'aimerai

A mi padre por toda la paciencia, ternura y apoyo incondicional que siempre me ha dado en todo momento. A mi madre por esa lucha incondicional para darme a mí y a mis hermanas todo lo que esta a su alcance. Ya que mis logros son los de ellos.

A mis hermanas Alma y Luisa por ser mis mejores amigas y el mejor regalo que me dieron mis padres

A mi sobrino Giovanni porque su mirada y su sonrisa son una luz en mi vida.

A mi amiga y hermana Guadalupe Olivares Redonda por todos estos años de amistad incondicional, porque siempre supo escucharme y apoyarme cuando lo he necesitado

A la Srita. Adelina García Zenil por saber darme un consejo acertado siempre que se lo he pedido y por todo el apoyo durante mi carrera

A la Sra. Estela Gomez y el Sr. Ernesto Moreno por su gran amistad incondicional, por alentarme a estudiar mi licenciatura y por la confianza que siempre han tenido en mí.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
3. Planteamiento del problema	6
4. Objetivo general	7
5. Objetivos particulares	7
6. Hipótesis	8
7. Material y metodos	9
◆ Hongo	9
◆ Inactivación (muerte) del hongo	9
◆ Inóculo	10
◆ Prueba de toxicidad y patogenicidad aguda oral intragástrica	10
• Animales	10
• Exámen clínico	12
• Coprocultivos	12
• Necropsias	13
8. Resultados	15
◆ Observaciones de crecimiento del hongo	15
◆ Inactivación (muerte) del hongo	15
◆ Prueba de toxicidad y patogenicidad aguda oral intragástrica	16
• Peso de los animales	16
• Examen clínico	17
• Coprocultivos	17
• Necropsias	18
9. Discusion	23
10. Conclusiones	25
11. Literatura citada	26
12. Anexos	29



INTRODUCCIÓN:

Cada vez se cuestiona más el uso de plaguicidas químicos para el control de plagas y enfermedades de los cultivos debido a su efecto negativo sobre los seres humanos y el medio ambiente. Entre algunas alternativas a los métodos químicos, se cuenta actualmente con los agentes microbianos para control biológico de plagas que contienen microorganismos como ingrediente activo. Estos agentes forman parte del control biológico dentro de un programa de manejo integrado de plagas. Recientemente a este tipo de control se le ha prestado mayor atención principalmente con el aprovechamiento de hongos entomopatógenos. Entre algunos agentes microbianos utilizados se encuentra *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, para el control biológico de la plaga de la langosta (Orthoptera:Acrididae).

Las preocupaciones de bioseguridad de un candidato para su uso en el control microbiano son expresadas inevitablemente cuando éste se va a producir en masa y va a ser diseminado en áreas grandes de cultivos agrícolas. Para poder llevar a cabo los requerimientos dispuestos por las autoridades mundiales y nacionales, a este respecto, se establecieron protocolos de bioseguridad. La meta de estos protocolos consiste en evaluar el riesgo para el hombre, los animales y las plantas que con lleva la aplicación de un agente microbiano en un ecosistema dado.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) propone evaluar el riesgo provocado por agentes microbianos y organismos utilizados para el control de plagas en mamíferos. Siegel (1997) parte de la propuesta formulada en 1981 por la OMS para integrar un esquema de pruebas basado en procedimientos que proponen la existencia de diferentes niveles para evaluar el riesgo que tendría sobre mamíferos un bioinsecticida cuyo principio activo es un agente microbiano para el control de plagas (AMCP) (Fig. 1).

Además de la OMS, existen diversos países y organizaciones como, la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD) de la Unión Europea, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Grupo Internacional de las Asociaciones Nacionales de Manufactura de Agroquímicos, y la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) para el registro de plaguicidas en Estados Unidos de Norteamérica, que han contribuido al desarrollo de



procedimientos para el registro de plaguicidas microbianos (bioinsecticidas) (Toriello, 2003). El principio en el que se basan es demostrar que el uso de AMCP presenta un riesgo aceptable para los usuarios, los consumidores de productos, fauna tratada y el medio ambiente.

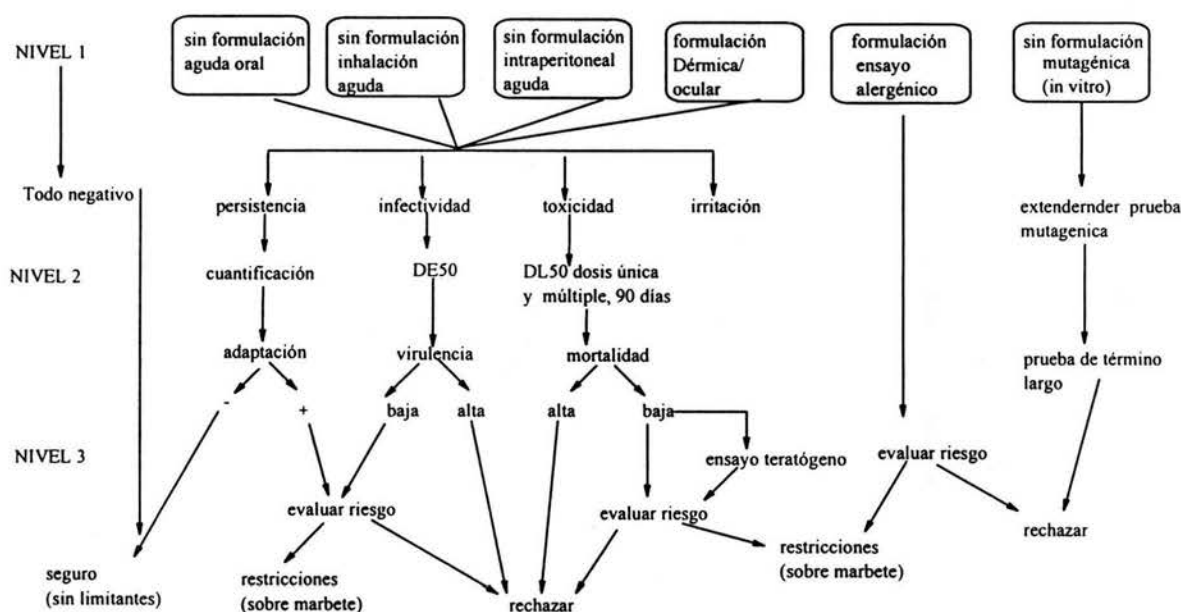


Fig. 1. Esquema de pruebas de bacterias y hongos para evaluar el riesgo de un AMCP en mamíferos. Modificado de Siegel (1997).

DE50 = dosis de efectividad media

DL50 = dosis letal media

El nivel 1 de la propuesta de Siegel (1997) consiste en pruebas cortas de cuatro semanas o menos, evaluándose la infectividad, toxicidad, irritabilidad y alergenidad; dosis única para exposición oral e inhalación, inoculación intraperitoneal, dérmica y ocular (Fig. 1). Cuando el AMCP no muestra efectos dañinos en estas pruebas, se considera seguro. Si se detectara algún efecto indeseable se deberán llevar a cabo las pruebas correspondientes a los niveles 2 y 3. Éstas consisten en pruebas a largo plazo, exposición a dosis únicas y múltiples, así como la cuantificación de la toxicidad con la



dosis letal media (DL50), infectividad con la dosis de efectividad media (DE50), e irritabilidad.

La evaluación del AMCP requiere el recabar la información pertinente para observar si el microorganismo tiene efectos patógenos, tóxicos o nocivos en los mamíferos. Al realizar las pruebas de bioseguridad en mamíferos la mayoría de las pruebas de toxicidad deberán ser negativas debido a la especificidad del AMCP, pero al ser un microorganismo que se encuentra dentro del sistema y que va a existir en mayor cantidad, es necesario evaluar todas las posibilidades de riesgo.

Las pruebas de bioseguridad en mamíferos se llevan a cabo debido a la posibilidad de provocar infección no sólo en el insecto blanco del AMCP sino también en otras especies no blanco que podrían ser afectadas. Es poco probable que un AMCP que haya pasado las pruebas del nivel 1 sin producir efectos nocivos cause problemas al ser liberado masivamente (Goettel *et al.*, 2001).

Las circunstancias bajo las que el AMCP produce infección y/o mortalidad deben ser bien identificadas. La búsqueda de estos datos han llevado al estudio de la infectividad, toxicidad y patogenicidad del agente candidato en mamíferos.

Actualmente se han utilizados hongos entomopatógenos con éxito y seguridad como agentes de control biológico; Burgues (1981) resume de manera elocuente la dificultad de evaluar un AMCP cuando menciona:

“Una situación libre de no-riesgo no existe, definitivamente no con plaguicidas químicos, e incluso con agentes biológicos, no se puede probar con certeza absoluta un resultado negativo. El registro de un químico es esencialmente, una declaración de uso, en los cuales los riesgos son aceptables, lo mismo debe aplicarse para agentes biológicos”.



ANTECEDENTES

Recientemente se ha puesto especial atención al control biológico, y a los agentes microbianos, por ejemplo los hongos, que han resultado ser enemigos naturales de las plagas. Los hongos tienen una variedad de propiedades que ayudan a su viabilidad en la naturaleza y son relativamente comunes e importantes regulando poblaciones de insectos. Los hongos entomopatógenos presentan la capacidad de generar enfermedades en insectos, disminuyendo el número de individuos plaga que causan bajas significativas en el rendimiento de cultivos (Butt *et al.*, 2001).

Varias especies de hongos entomopatógenos se han desarrollado como agentes microbianos para el control biológico, entre ellos, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride* (actualmente *M. anisopliae* var. *acridum*) y *Paecilomyces fumosoroseus* (Prior & Greathead, 1989). En años recientes el género *Metarhizium* fue revisado por secuenciación del DNA ribosomal y RAPD-PCR, ahora el género consta de 10 clados, entre los cuales está *M. anisopliae* var. *acridum* antes *M. flavoviride* (Driver *et al.*, 2000).

Una de las plagas que se encuentra en todo el mundo y ha causado estragos en los cultivos es la langosta (*Schistocerca gregaria* ssp. *piceifrons*). En África se desarrolló el programa de control biológico de langosta y chapulines denominado LUBILOSA, (Lutte Biologique contre les Locustes et Sauteriaux). En este encontraron que *M. anisopliae* var. *acridum* fue el entomopatógeno más común y con mayor dispersión en poblaciones de acrididos (Prior *et al.*, 1992). El desarrollo de este proyecto por varios años llevó al desarrollo de un micoinsecticida registrado como “Green Muscle” (Lomer, 2001).

En Australia existe otro bioinsecticida constituido por el mismo hongo denominado “Green Guard” con registro provisional (Lomer, 2001), que se utiliza para el control de la langosta australiana *Chortoicetes terminifera* (Orthoptera: Acrididae) (Hunter *et al.*, 2001).

En México, la plaga de la langosta se ha detectado en varios estados de la República como Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán



(SAGAR, 2000, 2001). Desde 1992 el Centro Nacional de Referencia en Control Biológico (CNRBC) inició un programa para detectar hongos entomopatógenos de la

langosta, llegando a tener actualmente diversas cepas de estos hongos. El CNRBC de Colima lleva a cabo un programa de carácter regional y nacional contra la langosta en el cual se evalúan aislados del hongo *M. anisopliae* var. *acridum*. Recientemente se determinó la eficiencia de algunos aislados como control de esta plaga en el campo mostrando un 80-90 % de control de la población de insectos (Hernández-Velásquez, 2003).

Para poder registrar y comercializar este hongo para su uso en el campo se necesitan diversos estudios que demuestren la bioseguridad de este microorganismo. En África, se han llevado a cabo diversos estudios para el registro de la cepa IMI330189, y se encontró que el hongo es inocuo para insectos benéficos, insectos no blanco, reptiles y aves (Stolz, 1999).

En México, se han desarrollado ensayos para demostrar la inocuidad de diversos hongos entomopatógenos por inoculación intraperitoneal y subcutánea de hongos entomoftorales *Erynia neoaphidis* y *Conidiobolus major* (Toriello *et al.*, 1986), de *Hirsutella thompsonii* (Mier *et al.*, 1989), y de *Verticillium lecanii* (Mier *et al.*, 1994) en ratones, cobayos y hámsters. También se desarrolló el ensayo de la DL50 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* cepa EH-172, aislada de la mosca pinta (Homoptera: Cercopidae), como apoyo al registro de insecticidas biológicos, mostrando una DL50 subaguda intraperitoneal mayor a 2400 mg de conidios/kg de peso del ratón demostrando la inocuidad de este hongo (Toriello *et al.*, 1999). Zimmerman (1993) describe estudios de seguridad en *M. anisopliae* en diferentes animales en donde confirma que el hongo no es agresivo para los animales utilizados. Sin embargo, faltan pruebas de bioseguridad para cepas de *M. anisopliae* var. *acridum* aisladas en México.

El resultado de proyectos en colaboración entre la UNAM, UAM-X y CNRBC sugieren que la cepa 502/8 (MaPL40) es un candidato ideal para su uso en el campo agrícola. Por lo tanto, se procedió a iniciar los estudios de seguridad recomendados por la EPA y la Norma Oficial Mexicana (NOM-049-FITO-1995) con la prueba de toxicidad y patogenicidad aguda oral en ratones.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para obtener el registro de agentes microbianos para el control biológico de plagas agrícolas son necesarias diferentes pruebas de bioseguridad. En México, no existe información sobre estas pruebas en *M. anisopliae* var. *acridum*. En este trabajo nos enfocaremos a evaluar la inocuidad de este hongo mediante la aplicación de la prueba de toxicidad y patogenicidad aguda oral en ratones de acuerdo a las normas establecidas por la Norma Oficial de México (NOM-70-FITO-1995) y los lineamientos establecidos por la EPA (USDA, 1996).



OBJETIVO GENERAL

Demostrar la inocuidad del cultivo monospórico EH-502/8 de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* en mamíferos (ratones), evaluando la toxicidad y patogenicidad aguda oral intragástrica con una sola exposición del hongo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el medio de cultivo sólido óptimo para la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.
2. Obtener conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* en cantidad suficiente para el desarrollo del experimento.
3. Determinar el tiempo y la temperatura donde *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* pierde el 100% de viabilidad.
4. Demostrar la inocuidad del hongo administrado oralmente mediante la realización de la prueba de toxicidad y patogenicidad aguda oral intragástrica en ratones CD-1.
5. Comparar los resultados de todos los estudios y observaciones de los animales inoculados con el hongo viable, muerto y testigos para considerar la bioseguridad del hongo.



HIPÓTESIS

El hongo entomopatógeno *M. anisopliae* var. *acridum* es inocuo en lo concerniente a patogenicidad y toxicidad para los ratones en experimentación al ser inoculados experimentalmente por vía oral intragástrica con dosis única.



METODOLOGÍA

Hongo

Se utilizó el cultivo monospórico EH-502/8 de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* del aislado original MaPL40 del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV), SAGARPA. Este aislado presentó la mayor virulencia hacia la langosta *S. piceifrons* y está siendo utilizado en aplicaciones en el campo agrícola para el control biológico de la langosta (Barrientos-Lozano *et al.*, 2001; Hernández-Velásquez *et al.*, 2003). El aislado está conservado en aceite a 4 °C, en agua destilada, y en agua glicerinada al 10% en nitrógeno líquido a -196 °C en la colección de hongos del laboratorio de Micología Básica, Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

El hongo se cultivó en agar papa dextrosa (APD), en medio de Sabouraud (Bioxón, México) y Sabouraud con antibióticos (Bioxón, México) a 28 °C durante 7-12 días para observar las características de la colonia y crecimiento en estos medios (Anexo 1).

Después del tiempo de incubación en agar papa dextrosa, los conidios se rasparon con asa micológica de la superficie del agar, agregando 5 ml de Tween 80 al 1 % que se utilizó como surfactante. La suspensión de conidios se contó en cámara de Neubauer y la concentración se ajustó a 2×10^8 conidios/ml para poder inocular 10^8 conidios en 0.5 ml por ratón.

Antes de inocular al animal se centrifugó la suspensión conidial para sustituir el Tween 80 por solución salina fisiológica estéril (SSFE). Se obtuvo una relación de 1 ml de tween 80 al 1 % por 19 ml de SSFE. La viabilidad del hongo se determinó por medio de unidades formadoras de colonias (UFC).

Muerte del hongo por calor

Para evaluar las características tóxicas de los conidios del hongo se realizó la inactivación (muerte) por medio de calor, manteniendo la integridad estructural de los conidios. Se probaron varias temperaturas a diferentes tiempos para obtener la muerte del hongo: 50, 55 y 60 °C a 1, 2 y 3 h. Para esta prueba se preparó una suspensión fúngica de 2×10^8 conidios/ml.



Inóculo

Se prepararon 55 ml de una suspensión del hongo con 2×10^8 conidios/ml para inocular los animales. Se tomaron 15 ml de esta suspensión, se inactivó por calor con el resultado del método descrito anteriormente, y se utilizaron para la inoculación del hongo muerto. Para los testigos se preparó Tween 80 al 1 % y vehículo manteniendo la relación 1 ml de Tween por 19 ml de SSFE como se determinó con anterioridad.

Prueba de toxicidad y patogenicidad aguda oral intragástrica

La prueba de toxicidad y patogenicidad aguda oral fue llevada a cabo siguiendo el método descrito por la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA, 1996: www.epa.gov/pesticides/biopesticides/guidelines/oppts_885_3050) y la Norma oficial de México, NOM-70-FITO-1995. La prueba se realizó con tres repeticiones. Cada una duró 21 días a partir de la inoculación de los animales, con necropsias a los 3, 7, 10 y 21 días (Fig. 2).

Animales

Los animales en estudio fueron ratones CD-1 adultos jóvenes de 25 a 30 g \pm 20% de peso corporal medio, libres de parásitos y/o patógenos. Se estudiaron un total de 114 ratones, 57 hembras y 57 machos. Para cada prueba, se colocaron en jaulas separadas por sexo y tipo de suspensión inoculada. Cada repetición se llevó a cabo de la misma manera (Anexo 2).

Los animales permanecieron sin alimento 24 h antes de la inoculación. A cada ratón se le introdujeron 0.5 ml al estómago de la suspensión fúngica correspondiente por vía oral con la ayuda de una cánula (Fig. 3). En cada prueba los ratones se dividieron en jaulas de acuerdo al tipo de hongo o vehículo como se muestra en la Tabla 1.



Fig. 2. Diagrama de la prueba de toxicidad y patogenicidad aguda oral.

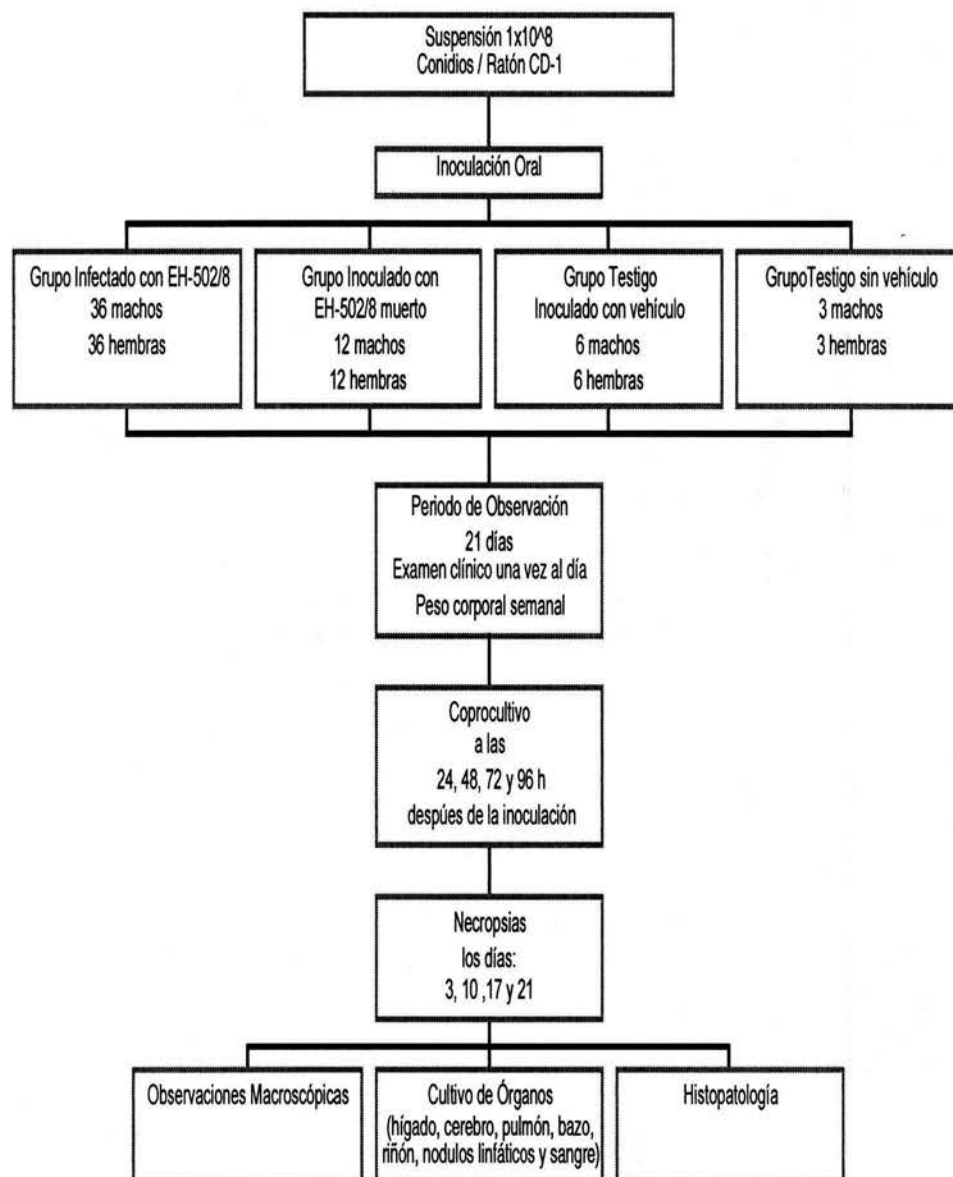




Fig. 3. Inoculación de los animales.

Tabla 1. Número de ratones utilizados por hongo viable, hongo muerto y testigos.

Número de ratones		Inóculo
Hembras	Machos	
36	36	Suspensión del hongo viable
12	12	Suspensión del hongo muerto
4	4	Testigo con suspensión de Tween 80 al 1%
2	2	Testigo con SSFE y Tween 80 al 1% (19:1 v/v)
3	3	Testigo de anaquel (ratón marcado en la oreja sin inocular, dentro de la jaula de inoculados con el hongo viable)
57	57	Total de ratones

Se determinaron los pesos individuales de los animales poco antes de su inoculación, después, semanalmente y en cada fecha de sacrificio.

Se realizó un examen clínico cuidadoso a todos los animales por lo menos una vez al día registrando si existieran cambios en:

- ◆ Piel y pelo
- ◆ Ojos y membranas de las mucosas
- ◆ Sistema respiratorio
- ◆ Sistema nervioso central y sistema autónomo
- ◆ Actividad somatomotora
- ◆ Patrón de comportamiento

Coprocultivos

Se realizaron coprocultivos los días 1, 2, 4 y 5 después de la inoculación de los animales. Se recogieron aproximadamente 2 g de heces por jaula de ratones infectados y testigos (Fig. 4). Se realizó el método de UFC para cuantificar el hongo por g de heces.

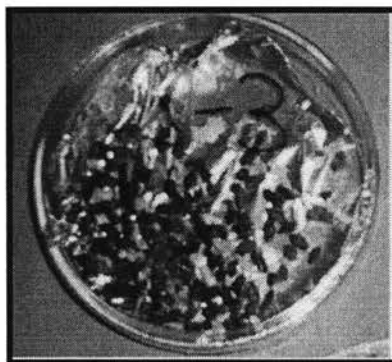


Fig. 4. Recolección de heces.

Las heces se procesaron de la siguiente manera: 1 g de heces para 9 ml de Tween 80 al 1 %, y 4 diluciones (10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5) a partir del concentrado. Todas las suspensiones se sembraron en medio de Sabouraud con antibióticos (Bioxón). Se depositaron 100 μ l de cada una de las suspensiones anteriores en cada caja con medio y se homogeneizaron con triángulo de vidrio. Las cajas se incubaron por un mínimo de 5 días a 28 °C, revisándolas cada 24 h.

Necropsias

Se realizaron necropsias a los 3, 10, 17 y 21 días a partir del día de inoculación de los animales. Estos se sacrificaron en condiciones asépticas. Se programaron los ratones de acuerdo a los grupos mencionados (Tabla 2).

Tabla 2. Ratones sacrificados en las necropsias.

Día de necropsia	Sacrificios programados
3, 10 y 17	9 ratones macho infectados
	9 ratones hembra infectadas
	3 ratón macho inoculado con el hongo muerto
	3 ratón hembra inoculada con el hongo muerto
21	9 ratones macho infectados
	9 ratones hembra infectadas
	3 ratón macho inoculado con el hongo muerto
	3 ratón hembra inoculada con el hongo muerto
Total	9 ratones macho testigos
	9 ratones hembra testigos
Total	114 ratones utilizados



Durante las necropsias se realizaron exámenes macroscópicos de los órganos del animal. Se observaron y estudiaron el bazo, cerebro, hígado, pulmón, riñón y nódulos linfáticos. Se tomaron fragmentos de cada órgano para dos análisis:

Cultivo para reislamiento del hongo

Una parte del órgano se sembró de forma directa en cajas de Petri con medio de Sabouraud con antibióticos (Bioxón). La otra parte fue macerada y sembrada en el mismo medio en condiciones asépticas. Se obtuvo una muestra sanguínea y fue sembrada en forma directa en medio de Sabouraud (Bioxón). Las cajas fueron incubadas a 28 °C por 7 días.

Estudios de histopatología

Un fragmento de cada tejido fue depositado en frascos viales con 5 ml de medio de Zamboni (Zamboni y De Marino, 1965) con excepción de la sangre, para realizar estudios histopatológicos con las tinciones de Hematoxilina y Eosina, método de Gomori, la modificación por Grocott con metenammina de plata (Anexo 3). Se anotó la presencia/ausencia del hongo y la reacción tisular correspondiente.

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Histopatología, Depto. de Biología Celular y Tisular, de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la dirección del Dr. Armando Pérez Torres.



RESULTADOS

1. Observaciones del crecimiento de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.

Metarhizium anisopliae var. *acridum* es un hongo mitosporico que presenta fiálides en forma de clavas (9-14 x 3-4.5 μ m) y conidios uninucleados, catenulados, basípetos, elipsoidales de (6.5-) 7.9 [-11] x 4.5-5.5 μ m (Fig. 5A). La colonia presenta un color verde a un distintivo amarillo-verde (Fig. 5B), en los medios de cultivo APD, Sabouraud y Sabouraud con antibióticos. En el medio de APD se obtuvo un mayor desarrollo colonial en menos tiempo y mayor cantidad de conidios. Este fue el medio seleccionado para la obtención de conidios para todos los ensayos.

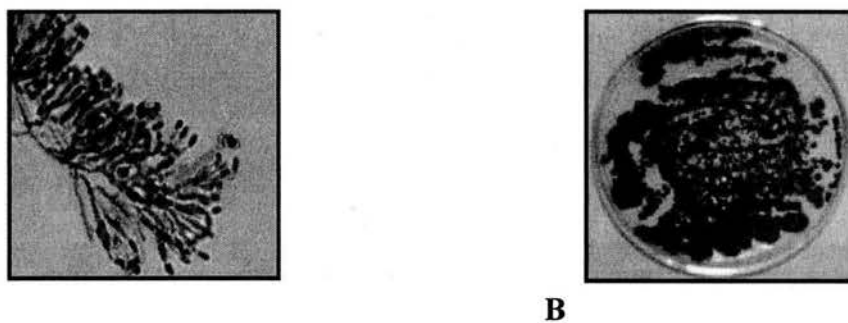


Fig. 5. Morfología microscópica y colonial del cultivo monospórico *M.anisopliae* var. *acridum* EH-502/8. A) Conidióforo y conidios del hongo. B) Colonia del hongo en agar de papa y dextrosa.

2. Inactivación (muerte) del hongo

Para inocular a los animales con el hongo muerto se realizó una curva para verificar la viabilidad de los conidios. Se observó que al incubar la suspensión fúngica a 50 °C se obtuvieron 12,7 y 3 UFC a 1,2 y 3h de incubación, respectivamente. Cuando se incubó a 55 °C se obtuvieron 4, 3 y 2 UFC a 1, 2 y 3 h respectivamente, mostrando todavía viabilidad a las 3 h. Por último, se obtuvo viabilidad nula a 60 °C a partir de 1 hora (Fig. 6).

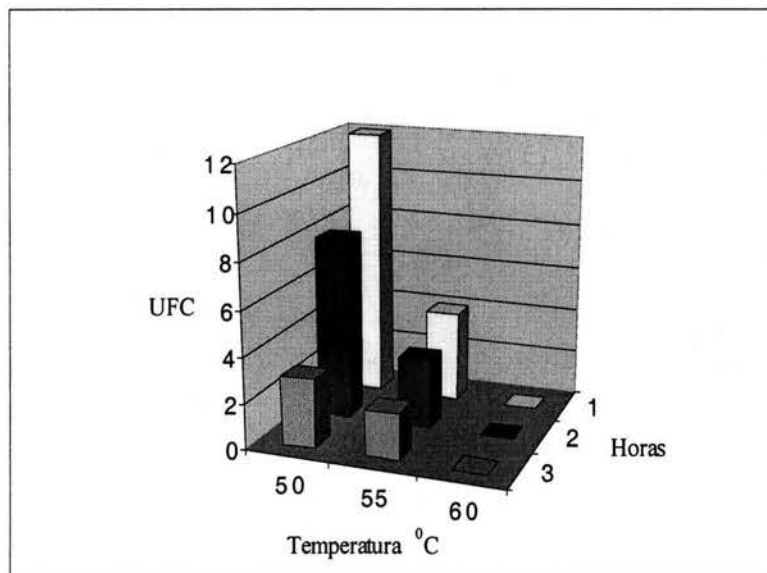


Fig. 6. Viabilidad determinada por unidades formadoras de colonias (UFC) de *M. anisopliae* var. *acridum* EH-502/8 a diferentes tiempos y temperaturas.

3. Prueba de toxicidad y patogenicidad aguda oral

Los resultados de la prueba fueron similares en cada repetición con algunas variaciones que se mencionarán en cada determinación.

3.1. Peso del animal

El peso fue aumentando de manera similar en todos los animales, registrando un peso promedio inicial de 27.6 g en machos y 29.3 g en hembras, con un peso promedio final de 33.6 g en machos y 37.3 g en hembras. La Fig. 7 muestra el promedio total (machos y hembras) de los pesos de los ratones durante los cuatro sacrificios en los 21 días de prueba. Para los ratones infectados el peso promedio fue de 24.7 g inicial y 33.3 final; para los ratones con el hongo muerto el peso promedio inicial fue de 25.9 g y el final de 32.1 g; y para los testigos, el peso promedio inicial fue de 23.9 g y el final de 34.3 g.0.3

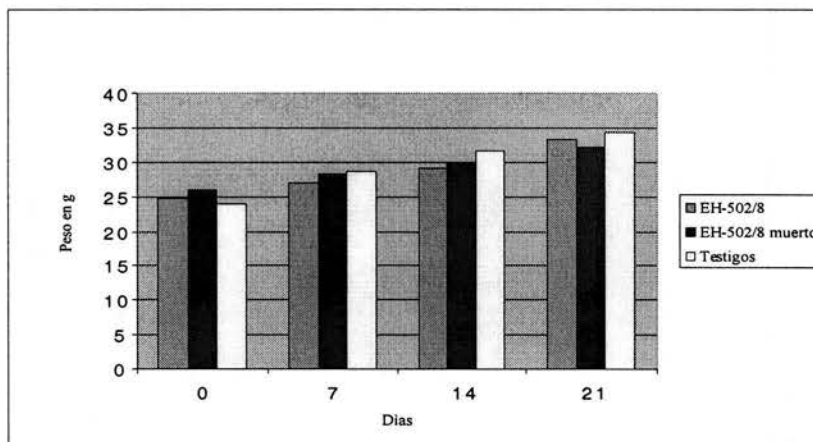


Fig. 7. Peso corporal promedio total por grupo de ratones durante los 21 días del experimento.

3.2. Examen clínico

Los animales se revisaron diariamente en cada experimento, y no se observaron alteraciones en piel y pelo, ojos y membranas de las mucosas, sistema respiratorio, sistema nervioso central y sistema autónomo, actividad somatomotora y el patrón de comportamiento fue siempre normal.

3.3. Coprocultivos

Los exámenes se realizaron a las 24, 48, 72 y 96 h después de la inoculación. Se observó crecimiento fúngico en las cajas de cultivo de las heces fecales de los ratones inoculados con el hongo viable solamente a las 24 h (Fig. 8). En todos los demás ensayos no se volvió a reaislar el hongo de las heces. Estos resultados fueron similares en las tres repeticiones y mostraron un promedio de 2.47×10^3 UFC/g de heces en los cultivos de las 24 h después de la inoculación. El porcentaje de jaulas con coprocultivos positivos del hongo en las heces de los animales de acuerdo a los días de muestreo se observa en la Fig. 9.

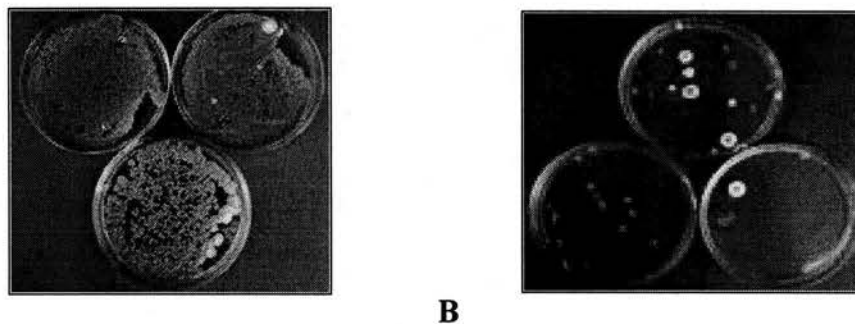


Fig. 8. Coprocultivos de ratones infectados. A) Coprocultivos positivos de *M. anisopliae* var. *acridum* del concentrado y las diluciones a las 24 h de la inoculación. B) Coprocultivos negativos a las 48 h de la inoculación.

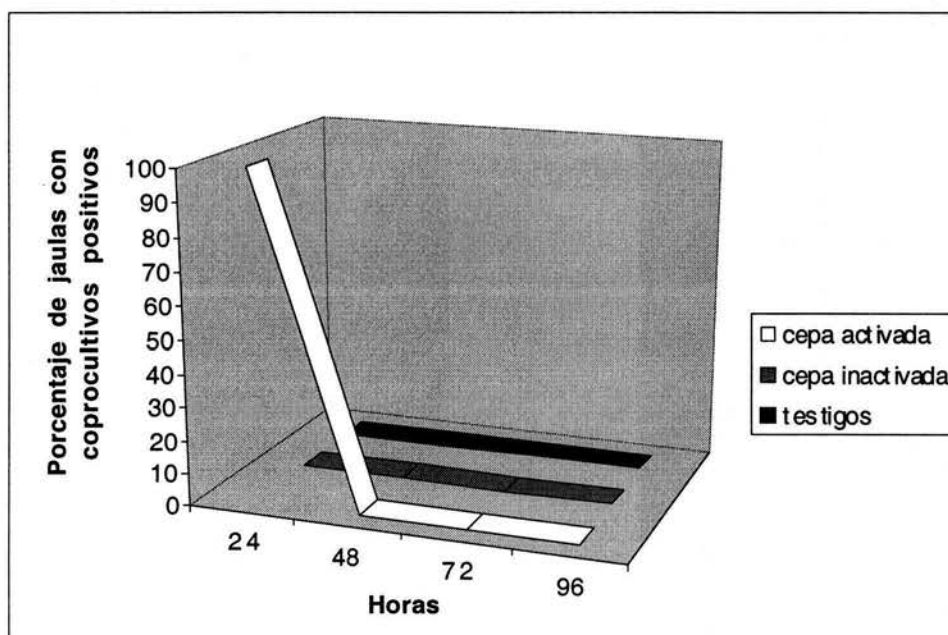


Fig. 9. Aislamiento del hongo de las heces fecales de ratones inoculados con el hongo viable, el hongo muerto y testigos.

3.4 Necropsias

la determinación de la patogenicidad y toxicidad del hongo se llevó a cabo con base en los resultados de las necropsias, en cuanto a alteraciones macroscópicas, cultivo de órganos e histopatología. Se describen a continuación para observar la persistencia, multiplicación, diseminación y reacciones tisulares producidos por el hongo.



• Alteraciones macroscópicas

Las únicas alteraciones macroscópicas observadas en algunos de los ratones fueron: el ganglio axilar inflamado hipertrofiado con absceso y esplenomegalia. Las alteraciones macroscópicas encontradas en cada ratón y necropsia se describen en la tabla 3. Las alteraciones disminuyen a los 21 días de la prueba (Fig. 10).

Tabla 3. Alteraciones macroscópicas observadas en los animales utilizados en cada sacrificio.

Sacrificio	Ratones (inóculo)	Observaciones
3 días	4 (hongo viable)	Ganglio axilar inflamado hipertrofiado con absceso
	2 (hongo muerto)	Ganglio axilar inflamado hipertrofiado con absceso y esplenomegalia
10 días	6 (hongo viable)	Ganglio axilar inflamado hipertrofiado con absceso, tres con esplenomegalia
	1 (hongo muerto)	Esplenomegalia
17 días	4 (hongo viable)	Ganglio axilar inflamado hipertrofiado con absceso y uno con esplenomegalia
	2 (hongo muerto)	Esplenomegalia
21 días	3 (hongo viable)	Ganglio axilar inflamado hipertrofiado con absceso
	1 (hongo muerto)	Esplenomegalia

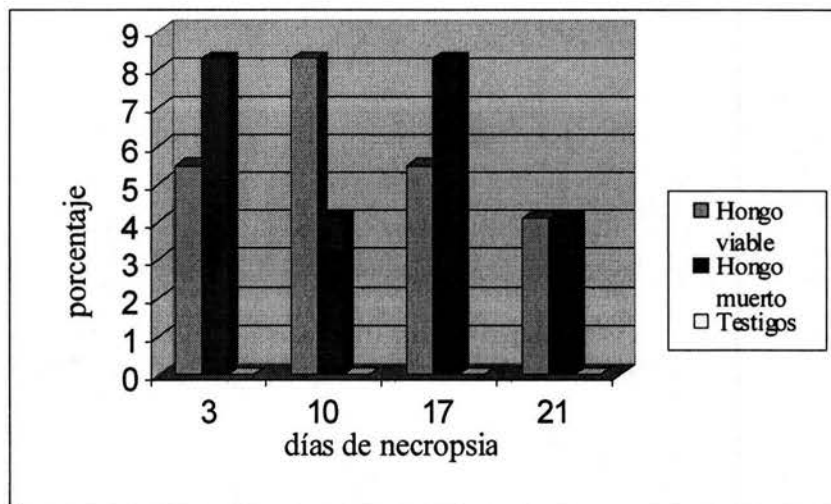


Fig. 10. Alteraciones macroscópicas en los ratones inoculados con el hongo viable, muerto y testigos en las cuatro necropsias a los 3, 10, 17 y 21 días de la prueba.



Se observó un total de 22.2% de ganglios hipertrofiados y 5.5% de esplenomegalia en el grupo de ratones inoculados con el hongo viable y 4.1% de ganglios hipertrofiados y 20.8% de esplenomegalia en el grupo de ratones inoculado con el hongo muerto. No se observaron alteraciones macroscópicas en los ratones testigo.

- *Cultivo de órganos*

En todas las repeticiones de la prueba, algunos de los órganos estudiados presentaron cultivos positivos para el hongo inoculado solamente en el primer sacrificio a los tres días después de la inoculación. En total se obtuvo un porcentaje de cultivos positivos de *M. anisopliae* var. *acidum* de 11.1% en hígado y bazo, 9.7% en riñón, 8.3% en pulmón, 4.1% en cerebro y en nódulos linfáticos mesentéricos del grupo de ratones inoculados con el hongo viable. En dos de los 8 ratones con cultivo positivo de los 72 infectados se aisló el hongo del hígado, bazo, riñón, pulmón y nódulos linfáticos mesentéricos. En las siguientes necropsias de los 7, 10 y 21 días ya no se observó ningún cultivo positivo de todos los fragmentos tisulares estudiados y no se obtuvieron cultivos positivos de las muestras de sangre estudiadas.

En los cultivos de los órganos se observó *M. anisopliae* var. *acidum* como la colonia típica descrita anteriormente cubriendo la mayor parte o todo el fragmento tisular (Fig. 11). Los órganos que presentaron un mayor porcentaje de reaislamiento del hongo fueron el hígado y el bazo como se muestra en la Tabla 4 y en la Fig. 12.

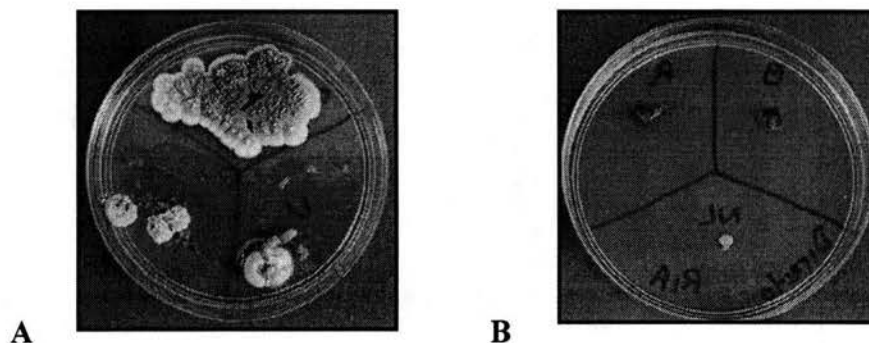


Fig. 11. Cultivos de fragmentos tisulares de ratón. A) Tejidos con cultivo positivo. B) Tejidos con cultivo negativo.

000 X.



Tabla 4. Porcentaje de fragmentos tisulares en donde se realizó el hongo en cada necropsia.

Días	Hígado	Bazo	Riñón	Cerebro	Pulmón	NL
3	44.4	44.4	38.8	16.6	33.3	16.6
10	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0

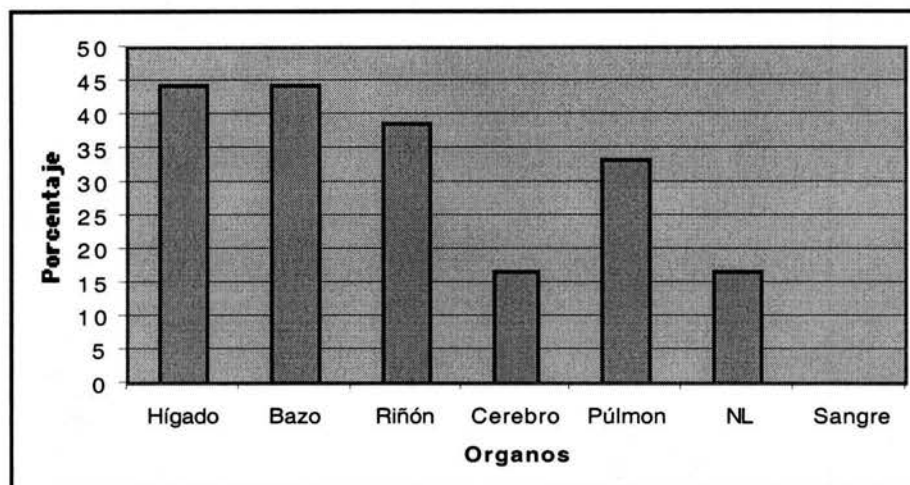


Fig. 12. Porcentaje de tejidos con cultivo positivo del hongo en la necropsia del día 3 después de la inoculación. NL = nódulos linfáticos.

En las muestras de sangre no se obtuvo ningún cultivo positivo del hongo a partir de los órganos de los animales inoculados con el hongo viable, ni de los animales de todos los grupos testigo en ninguno de los sacrificios durante la prueba.

- *Histopatología*

El estudio histopatológico de los órganos estudiados mostraron en general, poca respuesta inflamatoria en los tejidos. En el hígado de un ratón inoculado con el hongo viable (1 de 72 inoculados) y uno de un ratón inoculado con hongo muerto (1 de 24 inoculados) se observó una leve infiltración de células polimorfonucleares en las áreas periportales y alrededor de las venas centrolobulillares (Fig. 13 A-D). En este caso, las células de Küpffer parecen activadas y contienen depósitos de gránulos cafés en su citoplasma, correspondiendo probablemente a detritos celulares. La esplenomegalia observada en un ratón (1 de 72 inoculados) se debió a la pulpa roja congestiva con megacariocitos grandes y numerosos. En general, no se observó respuesta inflamatoria en los cortes de los órganos estudiados. Por



ejemplo, en la Fig. 14 se observan estructuras fúngicas teñidas de negro (tinción de Grocott), en los intersticios del tejido, sin ninguna afectación al tejido hepático, tanto en órganos de ratones inoculados con el hongo viable (Fig. 14 A) como de ratones inoculados con el hongo muerto (Fig. 14 B). Estas mismas imágenes se pudieron observar en los otros órganos estudiados. El resto de órganos examinados no presentó cambios patológicos, confirmando por comparación con tejidos de ratones inoculados con el hongo muerto, y con muestras tisulares de los ratones testigo.

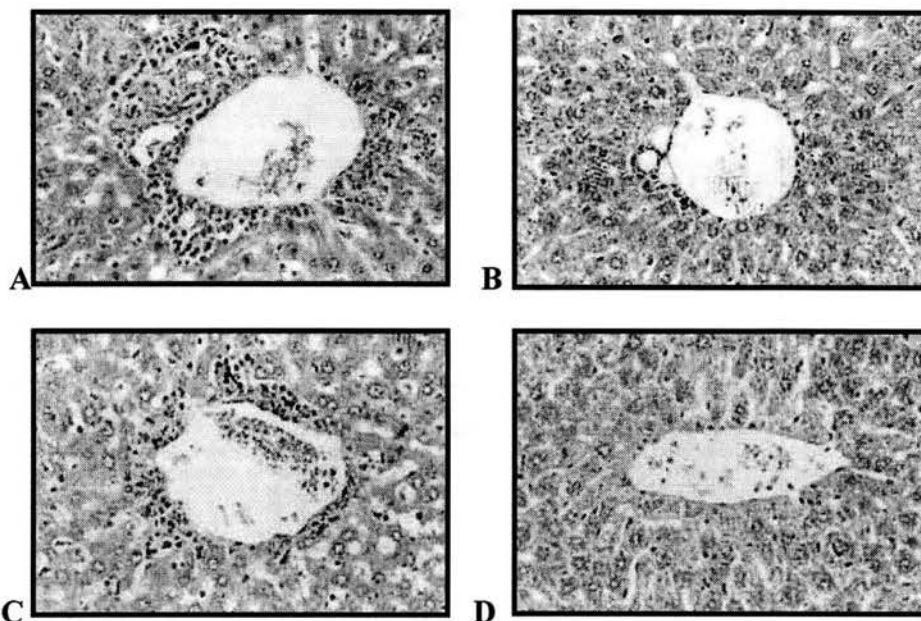


Fig. 13. Histopatología de hígado de ratón, a los 10 días de la inoculación con el hongo viable(A,B) y con hongo muerto (C,D) áreas periportales (A,C) y vena controlobulillar (B,D) rodeadas de una leve infiltración de células polimorfonucleares. Tinción de HE, magnificación 200 X.

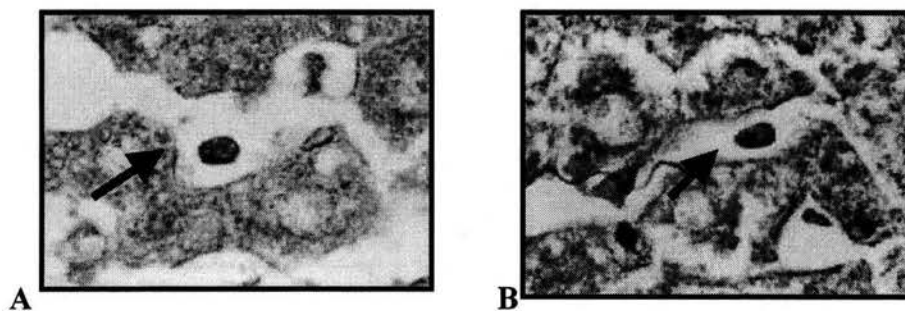


Fig. 14. Histopatología de hígado de ratón a los 10 días de la inoculación con el hongo viable (A) hongo muerto(B). Las estructuras fúngicas (flecha) se encuentran en los intersticios de las células hepáticas normales. Tinción de Grocott, magnificación 1000 X.



DISCUSIÓN

En los experimentos de la inactivación del hongo por calor, se observaron 2 UFC después de someter la suspensión de conidios durante 3 h a una temperatura de 55 °C. Estos últimos resultados son congruentes con otros estudios que indican que este hongo puede crecer a temperaturas mayores a 37 °C (Welling *et al.*, 1994), aunque su crecimiento *in vitro* tenga una temperatura óptima menor, también sugieren que *M. anisopliae* var. *acridum* podría soportar las temperaturas elevadas del campo agrícola donde se encuentra naturalmente.

Todos los ratones estudiados tanto los infectados con el hongo, los inoculados con el hongo muerto como los testigos, incrementaron su peso corporal cada semana, de manera similar. Asimismo, no se encontraron diferencias entre el aspecto y comportamiento de los animales inoculados con respecto a los testigos. Estos resultados sugieren que el hongo no afectó de ninguna manera a los animales. Estudios similares coinciden en la inocuidad de otros hongos entomopatógenos al ser inoculados en roedores (Siegel, 1997; Zimmerman, 1993).

Los animales en estudio eliminaron parte del hongo a las 24 h después de su inoculación oral. Este hecho sugiere que el hospedero fue capaz de eliminar una cantidad considerable del hongo inoculado en un breve periodo de tiempo después de haber sido infectado, apoyando la inocuidad del microorganismo.

La presencia de ganglios hipertrofiados y esplenomegalia observada solamente en un limitado número de animales (17 y 9 ratones de 72 infectados y 24 inoculados con el hongo muerto, respectivamente) podría sugerir una respuesta inflamatoria vigorosa en estos ratones debido a la presencia del hongo, semejante a las respuestas desencadenadas a cuerpo extraño.

De algunos de los órganos estudiados se reisló el hongo solamente, en los tres primeros días después de la inoculación. Sin embargo, posteriormente, todos los cultivos fueron negativos lo cual sugiere que *M. anisopliae* var. *acridum* fue incapaz de implantarse en el hospedero, colonizar y multiplicarse en sus tejidos y provocar un proceso infeccioso.

En otros estudios donde se demuestra la inocuidad de *Erynia neoaphidis* y *Conidiobolus major* en ratones y cobayos (Toriello *et al.*, 1986), no se reisló el hongo



en ningún cultivo, observándose, en cambio, un alto porcentaje de alteraciones microscópicas tisulares, que desaparecieron en el transcurso del experimento.

En trabajos previos sobre la patogenicidad de otro hongo entomopatógeno, *Hirsutella thompsonii*, se encontraron lesiones consistentes en zonas abscesadas rodeadas por una reacción a cuerpo extraño que fueron evolucionando hasta convertirse en un tejido fibroso y finalmente desaparecer (Mier *et al.*, 1989). Zimmermann (1993) menciona varios estudios de *M. anisopliae* en diferentes especies de mamíferos, inoculados por diferentes vías y encontró que el hongo era inocuo para estos animales. Por otro lado Toriello (1999) encontró una DL50 subaguda intraperitoneal mayor a 2,400 mg de conidios/kg de peso del ratón con *M. anisopliae* mostrando la inocuidad de este hongo, ya que a mayores dosis utilizadas es menor la toxicidad en el animal.

La única imagen histopatológica (Fig. 13 A-B) donde se ve una leve reacción inflamatoria a los 10 días de la inoculación, tanto del hongo viable como del hongo muerto (dos ratones de 96 inoculados con hongo) muestra células de Küpffer activadas, lo que sugiere que las células fagocitaron (probablemente el hongo) y se encuentran restos del hongo dentro de las células como depósitos de detritos celulares. En el resto de los resultados de histopatología, se observa el hongo, tanto el viable como el muerto en intersticios celulares de hígado, bazo, pulmón, etc., y no dentro del parénquima tisular, lo que sugiere que el microorganismo no es capaz de persistir, multiplicarse y causar infección. Estos datos sugieren la inocuidad del hongo, y la capacidad del hospedero para eliminarlo sin problema.

Los resultados demostraron el carácter no patogénico de *M. anisopliae* var. *acridum* debido a que aunque se puede presentar brevemente en el hospedero y desencadenar una respuesta inflamatoria leve no es capaz de multiplicarse ni persistir en sus tejidos. También se demostró que el hongo no es tóxico para los ratones en estudio ya que el hongo muerto por calor induce una respuesta o reacción similar a cuerpo extraño en los ratones. Los resultados de histopatología confirmaron la no persistencia, y ausencia de patogenicidad y de toxicidad del hongo en estudio en el hospedero.

El análisis de los resultados obtenidos demuestra la ausencia de patogenicidad y toxicidad del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* var. *acridum* cepa EH-502/8 cuando es administrado por vía oral intragástrica en ratones CD-1 y, por consiguiente debe considerarse su inocuidad en los animales utilizados.



CONCLUSIONES

- El medio de cultivo agar papa dextrosa, mostró ser el medio óptimo para obtener la cantidad necesaria de conidios de *M. anisopliae* var. *acridum* para los ensayos.
- Los conidios pierden el 100% de su viabilidad cuando son mantenidos a una temperatura de 60 °C durante 1 h. El hongo presenta termotolerancia a 55 °C
- El presente trabajo muestra la inocuidad de la cepa EH-502/8 de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* por vía oral intragástrica en una sola dosis en ratones CD1.



LITERATURA CITADA

- ◆ Barrientos LL, Milner RJ. 2001. Uso actual y potencial de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* para el control biológico de acridoideos en América Latina. En: Memoria del Taller Internacional. Transferencia de Tecnología en Control Microbiano de Langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker. SAGARPA (Eds), Mer., Yucatán, Octubre 2-5. p 43-48.
- ◆ Butt TM, Jackson C, Magan N. 2001. Introduction. En: Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. Butt TM, Jackson C, Magan N (Eds.), CABI Publishing. Wallingford, UK.
- ◆ Driver F, Milner RJ, Trueman JWH. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycol. Res. 104: 134-150.
- ◆ Goettel MS, Hajek AE, Siegel JP, Evans JC. 2001. Safety of Fungal Biocontrol Agents. En: Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. Butt TM, Jackson C, Magan N (Eds.) CABI Publishing. Wallingford, UK.
- ◆ Grocott RG. 1995. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori methanamine silver nitrate technique. Am. J. Clin. Pathol. 25: 975-979
- ◆ Hernández-Velázquez VM, Hunter DM, Barrientos-Lozano L. 2003. Susceptibility of *Schistocerca piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) to *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Deuteromycotina: Hyphomycetes): Laboratory and field trials. J.Orthoptera Res. In press.
- ◆ Hunter DM, Milner RJ, Spurgin PA. 2001. Aerial treatment of de Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera* (Orthoptera: Acrididae) with *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Bull. Ent. Res. 91: 93-99.
- ◆ Lomer C. 2001. World-wide survey of regulations affecting biopesticides. Locusts and Grasshoppers. Biocontrol Newsletter 1: 10.
- ◆ Mier T, Pérez J, Carrillo-Farga J, Toriello C. 1989. Study on the innocuity of *Hirsutella thompsonii*. I. Infectivity in mice and guinea pigs. Entomophaga 34: 105-110.
- ◆ Mier T, Rivera M, Rodríguez Ponce P, Carrillo Farga J, Toriello C. 1994. Infectividad del hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii* en ratones y cobayos. Rev. Lat.-Amer. Microbiol. 36: 107-111.



- ◆ Prior C, Greathead DJ. 1989. Biological control of locusts: the potential for the exploitation of pathogens. *FAO Plant Prot. Bull.* 37: 37-48.
- ◆ Prior D, Lomer CJ, Herren H, Paraiso A, Kooyman C, Smit. JJ. 1992. The IIBC/IITA/DFPV collaborative research programme on the biological control of locust and grasshoppers. 8-18 p. In: Lomer CJ, Prior C (eds.). *Biological control of locusts and grasshoppers*. Cab International, Wallingford, Inglaterra.
- ◆ Stolz I. 1999. The effect of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (=flavoviride) *Gams* and *Roszytal* var. *acridum* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on non-target Hymenoptera. Tesis Doctoral, Universität Basel.
- ◆ SAGAR. 2000. Manejo integrado de langosta y chapulín. Sagar, México D.F.
- ◆ SAGARPA. 2001. Taller Internacional. Transferencia de Tecnología en Control Microbiano de Langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker. SAGARPA (Eds), Mer., Yucatán, Octubre 2-5.
- ◆ Siegel JP. 1997 Testing the pathogenicity and infectivity of entomopathogens to mammals. In: Lacey L. (Ed), *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, New York. pp. 325-335
- ◆ Toriello C, Hernández Ibáñez J M, López-Martínez A, López- González L, Mier T, Carrillo J, Latgé J P. 1986. The pathogenic fungi of the spittlebug in México. III. Innocuity of *Erynia neophidis* and *Conidiobolus major* in experimental animals. *Entomophaga* 31: 371-376.
- ◆ Toriello C, Navarro-Barranco H, Martínez-Jacobo A, Mier T. 1999. Seguridad en ratones de *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) Sorokin aislado de *Aeneolamia* sp. (Homoptera: Cercopidae) en México. *Rev. Mex. Mic.* 15: 123-125.
- ◆ Toriello C. 2001. Bioseguridad de *Metharhizium anisopliae* (METSCH.) Sorokin. En: memoria del Taller Internacional. Transferencia de Tecnología en Control Microbiano de Langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker. SAGARPA (Eds), Mer., Yucatán, Octubre 2-5. p. 81-86 .
- ◆ Toriello C. 2003. Bioseguridad de *Metharhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) Sorokin (HYPHOMYCETE) *Vedalia* 9-10: 107-113.



- ◆ Welling M, Nachtigall G, Zimmerman G. 1994. *Metarhizium* ssp. isolates from Madagascar: morphology and effect of high temperature on growth and infectivity to the migratory locust, *Locusta migratoria*. Entomophaga 39: 351-361.
- ◆ Zamboni L, De Marino C. 1965. Buffered picric acid-formaldehyde: a new rapid fixative for electron microscopy. J. Cell. Biol. 35: 148 A.
- ◆ Zimmerman G, 1993. The Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. Pestic. Sci. 37: 375-379.



ANEXO 1

MEDIOS DE CULTIVO

-*Medio de agar papa y dextrosa*. Utilizado para el cultivo del hongo y obtención de conidios.

Se preparó el medio con papa natural de la siguiente manera:

Se pelaron y cortaron las papas en trozos pequeños, se colocaron en un recipiente con 1 L de agua destilada y se calentaron hasta hervir. Se filtró para desechar la papa y el concentrado se aforó a 1 l de agua agregándole 15 g de agar y 20 g de dextrosa.

-*Medio de Sabouraud (Bioxon)*. Utilizado para el reislamiento del hongo en caso de obtenerlo a partir de los órganos en estudio.

Agar	15 g
Dextrosa	40 g
Peptona de carne	5 g
Peptona de caseína	5 g
Agua c.b.p	1 L

-*Medio de Sabouraud con antibióticos (Bioxon)*. Utilizado para el reislamiento del hongo en caso de obtenerlo a partir de los órganos en estudio.

Agar	15 g
Dextrosa	20 g
Cicloheximida	50 g
Cloramfenicol	500 g
Peptona de carne	5 g
Peptona de caseína	5 g
Agua c.b.p	1 L

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



ANEXO 2 COLOCACIÓN DE LOS ANIMALES EN JAULAS

En cada repetición los animales se colocaron de la misma manera.

JAULA	ANIMALES
J-1	4 machos inoculados con EH-502/8 muerto
J-2	4 hembras inoculadas con EH-502/8 muerto
J-3	6 machos inoculados con EH-502/8 + 1 testigo de anaquel
J-4	6 machos inoculados con EH-502/8
J-5	6 hembras inoculados con EH-502/8 + 1 testigo de anaquel
J-6	6 hembras inoculados con EH-502/8
J-7	2 machos testigo con vehículo
J-8	2 hembras testigo con vehículo



ANEXO 3

TÉCNICAS DE HISTOPATOLOGÍA

-Grocott modificación de Gomori del método con metenamina de plata

El ácido crómico oxida los aldéhdos de los polisacáridos de la membrana celular. Los productos de la oxidación del aldéhdido reduce el nitrato de plata de la metenamina a plata metálica. Las paredes de la célula se ennegrecen.

1. Eliminar la parafina
2. Enjuagar con agua destilada
3. Oxidar en una solución de ácido crómico al 5%, 1 h
4. Lavar con agua corriente de 5-10 min
5. Tratar con bisulfito de sodio, 1 min para eliminar cualquier exceso de ác. crómico
6. Lavar con agua corriente de 5 a 10 min
7. Lavar con agua destilada tres o cuatro veces
8. Poner en una solución de plata preparada en el momento de emplearla de 30 a 60 min a 60°C
9. Enjuagar en agua bidestilada seis veces
10. Tratar con solución de cloruro de oro a 0.1%, 2 a 5 min
11. Enjuagar con agua bidestilada
12. Quitar la plata no reducida tratando con el tiosulfato de sodio del 2% por 1-2 min
13. Lavar con agua corriente
14. Contrastar con una solución de verde brillante de 30 a 40 s
15. Deshidratar, limpiar con xileno y montar



-Procedimiento general para la tinción de Hematoxilina y Eosina usando la formulación de Delafield, Ehrlich o Harris.

El método de H & E consiste en varias tinciones, colocando en recipientes por separado, a cada uno de los reactivos necesarios en cada paso. Se recomienda hacer el lavado con agua corriente en los procesos de lavado y enjuagado que se requieran. Los tejidos deberán ser colocados en los cestos de tinción, el cesto es transferido al siguiente reactivo cuando el tiempo de inmersión del reactivo anterior ha terminado.

1. Hidratar la muestra en portaobjetos.
2. Remover cuidadosamente en caso necesario. Sin precipitados mercuriosos, pigmentación formal, o color amarillo causados por la fijación de ácido pícrico (fluido de Bouins).
3. Teñir, aplicando las formulaciones de Delafield, Ehrlich o Harris durante 8 a 15 min
4. Enjuagar los portaobjetos con agua para remover el exceso de hematoxilina.
5. Diferenciar usando una mezcla de ácido clorhídrico en metanol al 70%. Usualmente de 5 a 10 min es tiempo suficiente; sin embargo, esto puede cambiar dependiendo de los resultados en la evaluación con microscopio.
6. Enjuagar solo una vez para remover el exceso del diferenciador.
7. Teñir de azul, colocando de 30 a 90 s en una solución de amoníaco o en una solución diluida de carbonato de litio.
8. Lavar y enjuagar con agua de 5 a 10 min
9. Realizar una contra tinción en la solución de eosina, el tiempo de contra tinción puede llevar de 15 s hasta 3 min dependiendo de la tinción deseada o de que tan viejo se encuentre el reactivo.
10. Deshidratar en dos pasos con diferentes soluciones de alcohol al 95% por 1 o 2 min en cada una. El exceso de eosina se remueve en esta fase.
11. Deshidratar posteriormente en dos pasos de 1 a 2 min usando etanol absoluto.
12. Limpiar en una mezcla 1:1 de etanol absoluto y xileno, seguido de dos cambios de xileno.
13. Montar y aplicar resina.