

MICROTOMIA

Las muestras histológicas deberán de orientarse en forma adecuada. Para después de moldearse la pieza, según el método seleccionado se procede a la preparación de los cortes, que son fragmentos muy delgados de tejido cuyo espesor varía desde 4 a 16 micras. Al proceso mediante el cual se obtienen cortes finos con las características adecuadas para su observación al microscopio se le da el nombre de microtomía.

Los cortes se hacen mediante aparatos especiales denominados microtomos. Existen varios modelos según los diferentes tipos de inclusión entre los que mencionaremos los siguientes:

- 1) El microtomo de parafina
- 2) El microtomo de congelación
- 3) El criostato (microtomo refrigerado)
- 4) El microtomo de celoidina
- 5) El ultramicrotomo

Cortes en parafina.- Por este método se obtienen cortes muy finos que se unen entre si formando una cinta que se denomina "tenia" (cortes seriados)..

Los cortes que se obtienen con una cuchilla bien afilada deben tener una anchura máxima aunque siempre hay un ligero aplastamiento y esto va a depender de la orientación de la cuchilla. conviene afilar periódicamente las cuchillas para evitar un desgarramiento de los cortes.

Después de que se han obtenido los cortes necesarios se debe proceder al montaje, esto se logra colocando los cortes sobre agua con una temperatura ligeramente abajo del punto de fusión de la parafina, de esta manera el corte se extiende con ayuda de unas agujas de disección. El agua donde flotan los cortes debe ser destilada lo que evita el depósito de sales minerales en los cortes. Los cortes se pegan al portaobjetos con gelatina que puede ir disuelta en el agua (agua gelatinada) o bien se usa albúmina.

COLORACION

TEORIA DE LOS COLORANTES

Los colorantes han sido empleados desde hace mucho tiempo. en nuestra época, la abundancia y variedad de los colorantes es el fruto de investigaciones hechas en el siglo pasado. El primer colorante de alquitrán de hulla fué separado por Sir William Perkin en 1856. Actualmente el índigo, la alizarina y otros colorantes se producen por vía sintética y a poco costo a partir de sustancias obtenidas de alquitrán de hulla.

Un colorante consta de 3 partes:

- 1) El cromógeno (generador de color), que es la sustancia matriz de la que se puede considerar derivado el colorante.
- 2) Un cromóforo (grupo portador de color), el cual está contenido en el cromógeno.
- 3) El auxócromo, (grupo de ayuda al color) que es capaz de formar una sal con un ácido o una base.

Teoría de la coloración:

Existen dos teorías para explicar la coloración. La teoría física que nos indica que la penetración del colorante es un fenómeno osmótico y que su fijación a los tejidos es por absorción. La teoría química, que nos dice que hay una unión entre las moléculas del colorante con los constituyentes del tejido.

Factores que intervienen en la Coloración:

Tiempo de coloración: El tiempo que se emplea para la coloración va a depender del espécimen que va a teñir y del colorante empleado. El tiempo puede variar de algunos segundos hasta 24 horas o más. Previamente a la tinción de varias laminillas de un mismo tejido, conviene hacer una prueba para determinar el tiempo de tinción.

Temperatura ambiental: Con temperaturas superiores a las normales disminuye el tiempo de tinción ya que de esta manera el colorante penetra al tejido más rápidamente.

La solución colorante debe tener un pH definido: Si el pH es ácido favorecerá la acción de los colorantes ácidos. Por el contrario si el pH es alcalino favorecerá la acción de los colorantes básicos. Si necesitamos remover los colorantes de los tejidos, las soluciones ácidas y alcalinas remueven los colorantes básicos y ácidos respectivamente.

Concentración de colorante: Generalmente la concentración de un colorante debe estar entre 0.2 y 2%. Los colorante se pueden diluir en agua, alcohol o bien en otras sustancias, lo que generalmente se hace a temperatura ambiente.

Métodos de Coloración:

Un método de coloración se puede definir como un proceso mediante el cual los cortes o pequeños animales e sometén a la acción de uno o varios colorantes, de tal manera que al final se pueden observar los diferentes tejidos y estructuras celulares de los mismos.

Los métodos de coloración se pueden aplicar a los cortes histológicos obtenidos por cualquiera de los métodos antes mencionados. O bien se pueden aplicar a todo el individuo completo como por ejemplo embriones y algunos animales pequeños (coloración en bloque). Este último método no encaja dentro de las técnicas generales de histología.

Los métodos de coloración se pueden clasificar en:

- 1) Vitales.- Cuando el colorante no provoca la muerte celular. Con éste método se tiñen estructuras vivas. Los colorantes empleados son el azul de metileno, rojo neutro, azul de trypano, etc. Estos métodos de coloración se pueden aplicar en vivo o in vitro.
- 2) Supravitales.- Estos métodos se aplican cuando el material es previamente fijado.
 - Directas.- Cuando el colorante se aplica directamente al tejido que se desea colorear.
 - Indirectas.- Si previamente a la coloración se aplica un mordente al tejido.
 - Progresivas.- Cuando se procesan varios cortes del mismo tipo con tiempos diferentes de coloración.

Regresivas.- Cuando el colorante se deja actuar hasta que sobretaña para después decolorar con soluciones como el agua o el alcohol acidulado hasta obtener la tinción adecuada.

Pancromaticas.- Cuando en un solo colorante se obtienen diferentes tonos en los diferentes componentes celulares.

TECNICA PARA LA COLORACION DE CORTES INFILTRADOS EN PARAFINA (Hematoxilina y Eosina)

1.- Xilol I	5 min.
2.- Xilol II	5 min.
3.- Alcohol absoluto	3 min.
4.- Alcohol 96	3 min.
5.- Alcohol 80	3 min.
6.- Agua destilada	Lavado
7.- Hematoxilina de Harris	Determinar tiempo
8.- Agua destilada	Lavado
9.- Agua acidulada	De 5 a 10 seg.
10.- Agua destilada	Lavado
11.- Agua amoniacal	De 5 a 10 seg.
12.- Agua destilada	Lavado
13.- Eosina	Determinar tiempo
14.- Alcohol 80	De 2 a 5 seg.
15.- Alcohol 96	De 2 a 5 seg.
16.- Alcohol absoluto	De 2 a 5 seg.
17.- Xilol I	5 minutos
18.- Xilol II	5 minutos
19.- Montaje en resina	5 minutos

PREPARACION DE SOLUCIONES

Agua acidulada	
Agua destilada	400 ml
Acido clorhídrico	40 gotas
Agua amoniacal	
Agua destilada	400 ml
Hidróxido de amonio	40 gotas
Hematoxilina de Harris	
Hematoxilina	5 grs.
Alumbre de potasio	100 grs.
Alcohol etílico absoluto	50 grs.
Agua destilada	1,000 ml
Oxido rojo de mercurio	2.5 grs.
Acido acético	40 ml

Diluir la hematoxilina en el alcohol y el alumbre de potasio en el agua destilada (60°C). Mezclar las dos soluciones y calentar a punto de ebullición. Después de retirarlo del

mechero, inmediatamente se agrega el óxido rojo de mercurio. Se deja enfriar y se le agrega el ácido acético.

Eosina (Sol. madre)

Eosina y	5 grs.
Acido clorhídrico	5 ml.
Agua destilada	500 ml.

Se mezclan los reactivos y se dejan reposar un día. Se filtra con doble papel tirándose el líquido que pasa a través de él. Se pasa agua durante dos días por el filtro que se paso para fijar la solución. Después pasa a la incubadora donde se seca.

Se corta en trozos que se colocan en un frasco que contenga 500 ml de alcohol 96.

Eosina (Sol. Madre)	25 ml.
Alcohol 96	75 ml.

El medio que se usa para el monteje de los cortes es la resina sintética, balsamo de Canadá, clarite, etc.

Se recomienda para la observación inclusiones de virales, la técnica de coloración de Hematoxilina y Eosina, Giemsa, Fulgen, Tricromico de Masson.

Para colorear bacterias en tejidos se puede aplicar la Tincion de Gram, Giemsa, ByB Gram, Acido rápido, PAS.

La Técnica de Coloración de Gomori, PAS+HyE o por medio de impregnación de Plata son adecuadas para la identificación de Hongos y tricromicos para algas y depósitos de fierro en branquias.

En la observación de zooparásitos la técnica de Hematoxilina y Eosina proporciona resultados satisfactorios además de Giemsa para microsporidios y tricromicos para aflotoxinas HyE+Giemsa.

CAPILLA ALFONSIÑA

REFERENCIAS

Carleton, H.M, Drury, R. 1967. *Histological Technique*. Oxford University Press.

Davenport, H.A. 1960. *Histological and Histochemical Technics*. Ed. Sounders.

Ham, A. 1975. *Tratado de Histología*. Ed. Interamericana.

Leeson, C.R., Lesson, T.S. 1977. *Histología*. Ed. Interamericana.

Salle, A.J. 1964. *Bacteriología*. Gustavo Gili, S.A.

PREPARACION DE SOLUCIONES

Agua destilada	100 ml
Acido clorhidrico	40 gotas
Agua amoniacal	
Agua destilada	400 ml
Hidroxido de amonio	40 gotas
Hematoxilina de Harris	
Hematoxilina	5 grs.
Alumbre de potasio	100 grs.
Alcohol etilico absoluto	50 grs.
Agua destilada	1000 ml
Oxido rojo de mercurio	2.5 grs.
Acido sódico	40 ml

Disolver la hematoxilina en el alcohol, y el alumbre de potasio en el agua destilada. Mezclar las dos soluciones y calentar a punto de ebullición. Después de retirarlo del

CONTROL DE ENFERMEDADES

Lucio Galaviz Silva y Roberto Mercadò Hernández
Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.

INTRODUCCION

Los peces al igual que todos los animales, son susceptibles a sufrir diversas enfermedades de origen viral bacteriano, parasitario u otras causas etiológicas. Las enfermedades rara vez son un problema serio en los organismos silvestres, pero en los peces sujetos a condiciones de cultivo aumentan en magnitud y deben ser controlados para evitar pérdidas severas en la producción.

Los fundamentos que se emplean para tratar enfermedades de peces son iguales que para animales domésticos ó al hombre mismo con la diferencia que la quimioterapia en peces es más complicada porque el medio acuático tiene un papel muy trascendental que determina el tipo y efectividad del tratamiento. Pero además el tratamiento no se aplica a individuos aislados, sino a poblaciones enteras.

La quimioterapia no es la única manera de erradicar los agentes infectivos, existen además las medidas preventivas entre las cuales podemos citar: (1) Inmunización vs. bacterias y algunos parásitos, (2) Implementación de barreras físicas, (3) Medidas cuarentenarias y (4) Métodos biológicos de prevención o control.

La mayoría de los problemas que surgen en los centros acuícolas se debe a la falta de atención y capacitación de los piscicultores, por ser ellos la clave del éxito de la producción. Por ello el piscicultor debe utilizar agua: (1) libre de peces, (2) de buena calidad, (3) si esta proviene de rios o lagos proveerse los filtros de arena, (4) evitar introducir peces de otras piscifactorias y si se obtienen por esta vía certificar la salud de los organismos, (5) evitar el hacinamiento, (6) evitar el estrés.

Antes de iniciar un tratamiento necesitamos decidir si es conveniente o no la aplicación de la quimioterapia y conocer el pronóstico; o si el tratamiento es factible economicamente de acuerdo el manejo y el pronóstico, además de conocer la resistencia al tratamiento

También debemos considerar la calidad del agua, constitución del pez, conocer el químico y la enfermedad. La aplicación de compuestos necesita mucha reponsabilidad por el efecto secundario que pueden ocasionar al ecosistema circundante y además a la diferente reacción que presenta cada especie de pez y aún sobre la misma especie en diferentes centros, debido a la calidad del agua. Por este motivo es recomendable realizar pruebas preeliminares al utilizar un compuesto por vez primera.

Debido a la escasez de investigaciones sobre el efecto de sustancias químicas en animales poiquiloterms, el listado compuesto es muy limitado en comparación con el que se conoce para medicina veterinaria. Aún así, necesitamos no emplear indiscriminadamente las sustancias químicas pues muchas de ellas estan en proceso de investigación y son de uso restringido por la FDA (Food and Drug Administration) y EPA (Environmental Protection Agency).

Siempre que sea posible necesitamos conservar un límite de seguridad en las aplicaciones y especialmente si no contamos con alguna referencia sobre la dosis específica para nuestra especie de organismos ó si es la primera vez que lo aplicamos, pues a diferencia de los tratamiento veterinarios, en sanidad acuícola se realizan en masa, lo cual convierte a la quimioterapia en una técnica de alto riesgo.