

TINCIÓN DE *Fasciola hepatica* SIN GLICOCÁLIX, UNA ALTERNATIVA PARA LA OBSERVACIÓN DE ESTRUCTURAS INTERNAS DEL PARASITO ^a

Rosa María Sánchez Manzano^b
Sergio Ignacio Alva Estrada^c
Carlos Ramón Bautista Garfías^{b, d}

RESUMEN

Sánchez M R M, Alva E S I, Bautista G C R. *Téc. Pec. Méx.* Vol 36 No 2 1998. pp.159-162. Las técnicas habituales de fijación y tinción de *Fasciola hepatica* usando Hematoxilina y Carmín, tienen el inconveniente de que tiñen el intestino del parásito, lo que impide la visualización de otras estructuras. Por este motivo, se utilizaron tres técnicas de tinción (Hemalum de Mayer, Hematoxilina de Delafield y Carmín) en fasciolas adultas con y sin glicocáliz (Glix). En los parásitos en que se eliminó el Glix, no se tiñó el intestino, lo que facilitó la observación de otras estructuras anatómicas.

PALABRAS CLAVE: *Fasciola hepatica*, Glicocáliz, Tinción.

El uso de las técnicas de tinción en parasitología resulta de gran utilidad, tanto para el diagnóstico como para el estudio de la morfología de algunos protozoarios y helmintos (1).

En general, la identificación de protozoarios parásitos se efectúa por medio de la observación directa al microscopio, sin que exista en muchas ocasiones, la necesidad de utilizar algún tipo de coloración. En el caso de algunas cestodiasis en donde se requiere de una identificación precisa, se tiene que recurrir a técnicas de tinción; por ejemplo, para el análisis diferencial de proglótidos grávidos de *Taenia solium* y *Taenia saginata*, donde es menester contar sus ramas uterinas (2).

Las técnicas de tinción por otro lado, no se utilizan rutinariamente en los laboratorios clínicos, sino solo en aquellas instituciones dedicadas a la investigación y/o a la docencia. La mayoría de las técnicas de fijación y tinción empleadas para *Fasciola hepatica* favorecen la coloración del intestino, el cual, debido a su conformación sinuosa y ramificada, oculta otras estructuras anatómicas. Marchesi y Andrews (3) y Marchesi *et al.*, (4) desarrollaron un método para la obtención de glicoproteínas (glicocáliz) de la membrana de eritrocitos de humano; este método fue utilizado posteriormente para obtener el glicocáliz de helmintos parásitos (5), entre ellos *Fasciola hepatica*, sin que éstos sean dañados por el tratamiento.

^a Recibido el 4 de junio de 1997 y aceptado para su publicación el 25 de mayo de 1998

^b Departamento de Parasitología, ^c Departamento de Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, Col. Santo Tomás, México 11340, D.F.

^d CENID-Parasitología Veterinaria, INIFAP-SAGAR, Apdo. postal 206, CIVAC 62500, estado de Morelos, México.

Con base en lo anterior y en que se carece de información acerca de técnicas alternativas de preparación de ejemplares adultos de *F. hepatica* previas a la tinción, se llevó a cabo el presente estudio, cuyo objetivo fue el de tratar de resaltar otras estructuras anatómicas diferentes al

sistema digestivo, por medio de un tratamiento previo del parásito, que consistió en la eliminación del glicocálix antes de la tinción por medio de tres técnicas diferentes.

Se utilizaron 60 fasciolas adultas completas, colectadas de hígados de bovino obtenidos en el rastro. Los parásitos, se colocaron en agua destilada y se mantuvieron durante 24 h en refrigeración a 4 C, para eliminar el contenido intestinal; posteriormente, fueron distribuidos en dos grupos de 30 ejemplares, uno que fungió como testigo y otro como tratado. A las fasciolas del segundo grupo se les extrajo el glicocálix por medio del método de Marchesi y Andrews (3, 4, 5). Una vez sin glicocálix, fueron fijadas en alcohol-formol-ácido acético (AFA) durante 10 min, presionándolas fuertemente entre dos placas de vidrio (6), y se pusieron en alcohol etílico al 70% donde se mantuvieron hasta el momento de realizar la tinción. Similarmente, los ejemplares del grupo testigo fueron fijados en AFA y se pusieron en alcohol etílico al 70% .

Posteriormente, los grupos testigo y tratado fueron divididos en tres subgrupos de 10 fasciolas cada uno. Los parásitos de los subgrupos 1 (S1), 2 (S2) y 3 (S3) fueron teñidos por medio de las técnicas Hemalum de Mayer, Hematoxilina de Delafield y Carmín, respectivamente; estos métodos son los que con mayor frecuencia se utilizan para la elaboración de preparaciones permanentes de trematodos y cestodos (1).

En las fasciolas sin glicocálix, con las tres técnicas de tinción se pudieron apreciar de manera clara algunas estructuras

internas como los conductos eferente y deferente de los testículos, ootipo, glándulas de Mehlis y conductos vitelógenos (Fig. 1). En ninguno de los ejemplares sin glicocálix se observaron los ciegos intestinales completos, solamente se apreciaron restos de las ramas intestinales en el cono cefálico de algunos especímenes (Fig. 2). De las tres técnicas de tinción utilizadas, la de Hemalum de Mayer fue con la que se obtuvieron los mejores resultados; por ejemplo, al contraste de color, las glándulas vitelógenas se observaron teñidas en amarillo y las demás estructuras en azul (Fig. 3). Cabe señalar que en los parásitos de los tres subgrupos testigo, el tubo digestivo fue la estructura teñida más notoria (Fig. 4).

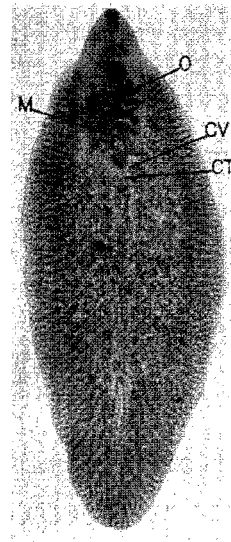


Figura 1. Ejemplar adulto de *Fasciola hepatica* sin glicocálix teñido con Hematoxilina de Delafield. Se aprecian claramente los conductos eferente y deferente de los testículos (CT), el ootipo (O), las glándulas de Mehlis (M) y los conductos vitelógenos (CV). (5X).

TINCION DE *Fasciola hepatica* SIN GLICOCALIX



Figura 2. Ejemplar adulto de *Fasciola hepatica* sin glicocálix teñido con Carmín. Se observan vestigios del intestino (flecha) en el cono cefálico. (10X).

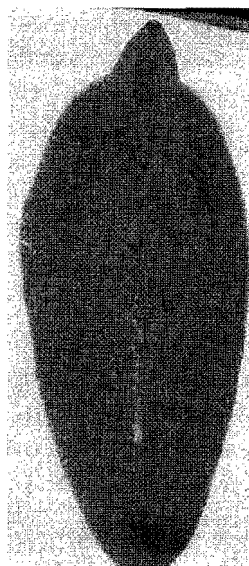


Figura 4. Ejemplar adulto de *Fasciola hepatica* con glicocálix teñido con Carmín. El intestino oculta otras estructuras anatómicas (compare con figuras 1, 2 y 3). (5X).

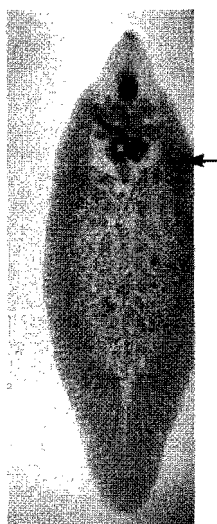


Figura 3. Ejemplar adulto de *Fasciola hepatica* sin glicocálix teñido con Hemalum de Mayer. Las glándulas vitelógenas (flecha) se encuentran teñidas de amarillo y contrastan con otras estructuras teñidas de azul. (5X).

Se ha indicado que la cubierta extramembranal de los parásitos está formada básicamente por glicoproteínas y glicolípidos (glicoconjugados) denominados en su conjunto glicocálix (7). En *Fasciola hepatica*, el glicocálix por lo general se encuentra recubriendo al tegumento (8, 9). En éste sentido, la falta de tinción del intestino en las fasciolas sin glicocálix al utilizar cualquiera de las tres técnicas de tinción indicadas, además de poner de manifiesto varios detalles de las estructuras internas del parásito, sugiere que el intestino de *Fasciola hepatica* está constituido en gran parte por glicocálix. También es factible que el tratamiento utilizado haya eliminado selectivamente tanto al glicocálix como a otros constituyentes tisulares del intestino.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que para la observación adecuada de estructuras anatómicas diferentes al intestino en *Fasciola hepatica* adulta, se requiere la eliminación del glicocálix, antes de fijar y teñir al parásito.

STAINING OF *Fasciola hepatica* WITHOUT GLYCOCALIX, AN ALTERNATIVE FOR THE OBSERVATION OF PARASITE'S INTERNAL STRUCTURES

SUMMARY

Sánchez M R M, Alva E S I, Bautista G C R. *Téc. Pecu. Méx.* Vol 36 No 2 1998. pp.159-162. The common fixing and staining techniques for *Fasciola hepatica* adult specimens, using Hematoxilin and Carmine, inconveniently stain the intestine which impedes the observation of other anatomic structures. In the present study three different staining methods (Hemalum of Meyer, Hematoxilin of Delafield and Carmine) were used in *F. hepatica* adult specimens with and without glyco-calix. In the parasites without glyco-calix, the intestine did not stain which allowed the observation of other anatomic structures.

KEY WORDS: *Fasciola hepatica*, Glyco-calix, Staining.

REFERENCIAS

1. Salazar S P, Haro A I. *Manual de técnicas para el diagnóstico morfológico de las parasitosis.* 1a.Ed. México: Francisco Méndez Cervantes, editor, 1980.
2. Golvan Y J, Drouhet E. *Técnicas en Parasitología y Micología.* 1a. Ed. España: Editorial Jims Barcelona, 1977:90-94.
3. Marchesi V T, Andrews E.P. Glycoproteins: Isolation from cell membranes with Lithium Diiodosalicylate. *Science.* 1971; 174:1247.
4. Marchesi V T, Tillack T W, Jackson R L, Segrest J P, Scott R E. Chemical characterization and surface orientation of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1972; 69:1445.
5. Alva Estrada S I, Martínez Jaramillo, M G, Sánchez Manzano R M, Sosa Romero A. Estudio comparativo del glicocálix de diferentes parásitos. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 1989; 31:31.
6. Demke D D. Staining and mounting helminths. *Stain technology.* 1952; 27(3):135.
7. Ito S. Structure and function of the glyco-calix. *Fed. Proc.* 1969; 28(1):12.
8. Threadgold L T. *Fasciola hepatica*: Ultrastructure and histochemistry of the glyco-calix of the tegument. *Exp. Parasitol.* 1976; 39:119.
9. Threadgold L T. *Fasciola hepatica*: Interaction of the tegument with poly-L-Lisine and enzymes. *Exp. Parasitol.* 1985; 59:222.