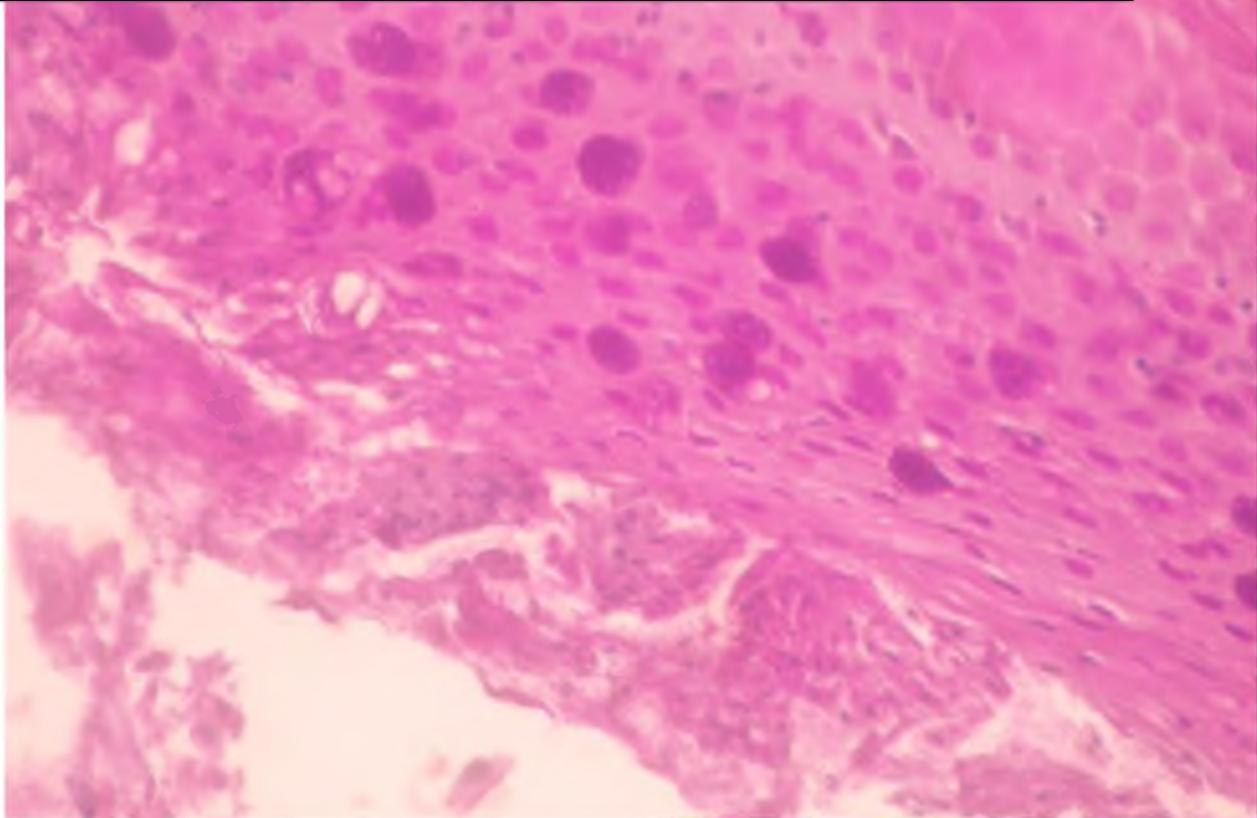


PRÁCTICA OPTATIVA

Tema: Determinación del contenido glucídico en células del tegumento de *Gymnotus carapo*



Directora: Olea Gabriela Beatriz

Co-Directora: Blanco Cohene

Tania

Alumna: Miño Gisela Verónica

INDICE:

• INTRODUCCIÓN	2
• MATERIALES Y MÉTODOS	5
○ TÉCNICAS HISTOLÓGICAS- PROCEDIMIENTOS MEDIATOS O POST-VITALES	5
■ Toma de muestra	5
■ Fijación	5
■ Inclusión	6
■ Corte o Microtomía	9
■ Coloración- Hematoxilina-Eosina	10
■ Montaje	13
○ TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS	13
■ Reacción de PAS (PERYODIC ACID SCHIFF)	14
○ HISTOMORFOMETRÍA	16
• RESULTADOS	18
• DISCUSIÓN	22
• BIBLIOGRAFÍA	24

INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se pretende determinar el contenido glucídico en las células del tegumento de *Gymnotus carapo*, debido a que nuestro conocimiento actual sobre el análisis histoquímico de los glicoconjugados en las células caliciformes en el tegumento del *Gymnotus carapo* es muy limitado.

Este pez es más conocido como “morena”, morena pintada, flecuda, carapo, tigre, pirá-mboi, pez navaja, pez cuchillo, cebra, morenita, morena de río. Perteenece al ORDEN: Gymnotiformes, FAMILIA: Gymnotidae. Tiene una amplia distribución que abarca el Río Paraguay, cuenca del Pilcomayo en Formosa; Río Paraná medio e inferior, Río Uruguay, Río de la Plata. Además se encuentra en Guatemala, Amazonia, la Isla Trinidad, Cuenca del San Francisco, sur del Brasil. Habita en lugares de aguas calmas como esteros, bañados, lagunas, etc. Vive siempre cerca de la vegetación, ya que ahí encuentra refugio de los depredadores, por lo general se lo encuentra a poca profundidad. La especie es pacífica con peces que no puede comer, su pico de actividad es de noche, donde se orienta por campos eléctricos producidos por órganos especiales. Son depredadores nocturnos, agresivos, con especies de comportamiento territoriales, que pueden construir nidos e incluso respirar el aire atmosférico (González Gutiérrez , 2014). Los ejemplares pequeños se alimentan de crustáceos e insectos, y los grandes, de crustáceos mayores y de peces. Los Gymnotiformes son llamados peces eléctricos por su capacidad de generar descargas eléctricas controladas por el sistema nervioso y que generan campos eléctricos en el entorno del animal (Iwaszkiw, Zappietro, Ferriz, & Chiramonte, 2016). Los ribereños en Argentina lo utilizan para carnada en la pesca deportiva. Constituyen el grupo de peces que mayor impacto soportan en el comercio de carnadas vivas para la pesca deportiva en la región noroeste de la Argentina (Iwaszkiw et al., 2016). Esta captura indiscriminada ha reducido las poblaciones en el litoral a niveles que la ponen en riesgo de extinción.

Esta especie es la más utilizada como carnada viva en la zona nordeste de Argentina; es capturada de ambientes naturales y mantenida en malas condiciones por los acopiadores hasta su comercialización. Las malas condiciones en las que son mantenidas ocasiona la muerte de los animales. Este ciclo repetido pone en peligro de sobreexplotación a la especie, esto con el tiempo puede agravarse perjudicando su permanencia en los ambientes naturales. Esta situación, sumado a la falta de estudios morfológicos del tegumento de *Gymnotus carapo* no llevo a elegir este pez para realizar el estudio correspondiente.

El tegumento recubre la totalidad del cuerpo y está formado por la piel y sus derivados. La piel está compuesta por epidermis, dermis e hipodermis. El tegumento es la principal barrera física del cuerpo frente al medio externo, pero es también un órgano que capta información del exterior. Desempeña multitud de funciones, entre ellas, como barrera física aporta protección frente a la luz ultravioleta, de patógenos y toxinas, frente a daños mecánicos, y evita la desecación del cuerpo. Es una estructura sensorial de primer orden puesto que en el tegumento reside el sentido del tacto y la percepción de la temperatura externa. Es un importante regulador térmico en muchos animales, tanto por la eliminación de calor en forma de agua a través de la transpiración, o como protección frente al frío por medio de la grasa. Inicia el proceso para la absorción de la vitamina D necesaria para los huesos. La secreción de sustancias, algunas feromonas, en la superficie del tegumento permite la comunicación entre individuos (Megías pacheco, Molist García , & Pombal, 2019).

Las sucesivas capas de la piel de los teleósteos están constituidas por la cutícula, la epidermis, la dermis que contiene las escamas y la hipodermis. La cutícula está formada por las secreciones de las células epiteliales y células caliciformes (Elliott, 2011). El tegumento está constituido de un epitelio plano estratificado (Elliott, 2011). La epidermis animal es un tejido expuesto en la superficie del cuerpo, que está en contacto directo con el entorno circundante. Actúa en numerosas funciones relacionadas con la interfaz organismo/medio ambiente, y también participa en los mecanismos de protección contra agentes físicos, químicos y biológicos (Medeiros Damasceno, Castro Monteiro, Duboc, Dolder, & Mancini, 2012). Otro tipo celular presente en este estrato son las células Caliciformes, constituyen un tipo de glándula exocrina unicelular común a la mayoría de los grupos de animales. Es considerada la segunda categoría de células secretoras más importante en la piel del pez (Elliott, 2011). Se originan, generalmente, en las capas medias de la epidermis, pero cuando ésta es muy delgada, puede verse que la base de la célula mucosa se encuentra directamente sobre la membrana basal. A medida que se aproximan a la superficie, aumentan de tamaño y elaboran más secreciones, principalmente glicoproteínas (Sierra *et al.*, 2011). Las células caliciformes inmaduras son redondeadas pero se apllanan lateralmente y por lo general aumentan de tamaño a medida que se mueven hacia la superficie de la epidermis. El número y el tamaño de las células caliciformes pueden variar en las diferentes regiones corporales de un pez. La abundancia de estas células también puede diferir entre los peces machos y hembras de la misma especie. De igual manera puede cambiar estacionalmente y durante procesos como la metamorfosis larval, la maduración sexual o la adaptación al agua de mar (Elliott, 2011). Alteraciones en las condiciones ambientales, como cambios repentinos en la temperatura o exposición a los rayos ultravioleta,

radiación o contaminantes, también pueden afectar el números de células caliciformes en la epidermis. La exposición a sustancias tóxicas u otros factores estresantes puede alterar el tamaño o la morfología de las células caliciformes, y puede dar lugar a cambios en la composición química de la secreción producida. Una variedad de funciones se han atribuido a las secreciones de estas células, incluida la lubricación, funciones protectoras y posiblemente reguladoras (Elliott, 2011).

El presente trabajo tiene por objetivo adquirir conocimientos y entrenamiento en técnicas histológica y de coloración convencional e histoquímica. Se propone como objetivo general evaluar el contenido de hidratos de carbono en el tegumento del *Gymnotus carapo* (peces: Gymnotiformes). Para finalizar se expondrán los resultados obtenidos en el presente trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Técnicas histológicas

PROCEDIMIENTOS MEDIATOS O POST-VITALES

Las *técnicas histológicas post-vitales* son aquellas en las que las células mueren durante el proceso, pero las características morfológicas y moleculares que posean en estado vivo se conservan lo mejor posible, lo que depende del tipo de técnica (Megías *et al.*, 2019). En este trabajo se realizará el estudio y desarrollo de este tipo de técnicas.

Tienen por finalidad preparar células, tejidos y órganos procedentes de seres en los que los procesos vitales se han detenido y es necesario conservar la estructura que tenían en vida. De manera general, para alcanzar este objetivo es necesario realizar los siguientes pasos (Zibelman de Gorodner, 2013):

- Toma de la muestra
- Fijación
- Inclusión
- Microtomía
- Coloración o tinción
- Montaje

Toma de muestra

Para los tejidos animales se puede optar por dos opciones: tomar una porción del tejido u órgano y procesarla (biopsia) o procesar primero el animal completo y luego extraer la muestra que nos interese (necropsia) (Megías *et al.*, 2019).

Fijación

Tiene por finalidad detener la vida de las células e impedir las modificaciones post mortem que puedan sufrir, manteniendo la estructura morfológica de células y tejidos sin que ocurran cambios notables en ellos (Zibelman de Gorodner, 2013). Para ello se emplean agentes químicos denominados *fijadores*. Estos agentes químicos garantizan la integridad de las células y tejidos, inmovilizando (por coagulación o precipitación) las moléculas proteínicas e inhibiendo principalmente las enzimas haciéndolas insolubles.

Los fijadores se pueden clasificar en dos grandes grupos según su acción sobre el tejido: *los coagulantes* y los que *establecen enlaces cruzados*. Los primeros, al extraer agua de los tejidos producen coagulación y desnaturización de las proteínas, sobre todo las de la matriz extracelular, mientras que los segundos establecen enlaces químicos entre moléculas del tejido. Los fijadores que

tienen como base al alcohol son desnaturalizantes, tales como el Boüin o el Carnoy, mientras que el formaldehído o el glutaraldehído establecen enlaces. También se preparan soluciones mixtas de ambos tipos de fijadores.

La mayor parte de los procesos de fijación usan varias sustancias fijadoras, bien mezcladas en la solución acuosa inicial o utilizada sucesivamente en el tiempo. Con ello se aprovechan las ventajas de cada una de ellas y se pueden contrarrestar sus desventajas.

Las muestras obtenidas de tegumento de *Gymnotus carapo* fueron fijadas con solución de Boüin por 12 horas. El líquido fijador de Boüin está compuesto por:

- Solución acuosa saturada de ácido pírico-----750 ml
- Solución de formaldehído (37% a 40%)-----250 ml
- Ácido acético glacial----- 50 ml

Es un buen fijador de uso rutinario. Tiene un buen poder de penetración y de difusión. Pueden fijarse piezas de 1 cm de grosor y 2 cm o 3 cm de longitud. Es empleado con resultados óptimos en la fijación de embriones y fetos pequeños pues ejerce cierto poder descalcificante.

Dependiendo del volumen de la muestra, el tiempo de fijación será de 12, 24 a 48 horas. Se debe eliminar el ácido pírico de las muestras antes de la inclusión porque tiñe de color amarillo intenso los tejidos. Para ello se hace un lavado con una solución de alcohol etílico al 70% a la que se añaden algunas gotas de una solución al 5% de carbonato de litio. El lavado finaliza cuando el alcohol litinado ya no muestra color amarillento.

Cuando los tejidos fijados no necesitan ser procesados inmediatamente, es conveniente almacenar y conservar los tejidos fijados para un uso posterior. Después de eliminar el fijador mediante un “lavado”, se guardan en una solución de alcohol al 70%. Así los tejidos pueden guardarse por un tiempo bastante largo sin que sufran modificaciones morfológicas notorias.

Inclusión

Una vez que son fijados los tejidos adquieren cierta consistencia y dureza, pero no la suficiente como para obtener secciones delgadas que son del orden de algunas milésimas de milímetro (5 a 10 um). La regla general es que cuanto más delgada queramos una sección más consistente debe ser la muestra de la que se obtiene, lo cual se puede hacer de dos formas: por congelación o por inclusión (Megías *et al.*, 2019).

Las muestras fijadas del tegumento de *Gymnotus carapo* se infiltraron con sustancias denominadas “*de inclusión*”, esto permite que los tejidos adquieran tal dureza que al ser sometidos al filo de una navaja produzcan secciones, cortes o láminas sumamente delgadas y transparentes.

Las sustancias de inclusión tienen la propiedad de incorporarse e infiltrarse al interior de las células y tejidos con la finalidad de servirles de soporte.

Después de la fijación y el lavado resulta imposible que se infiltren las muestras con parafina, ya que este medio de inclusión es insoluble en agua y alcohol, y las mismas se encuentran embebidas en agua o en alcohol. Por lo tanto, para que los tejidos puedan ser incluidos en parafina se requiere deshidratarlos e infiltrarlos con el solvente de la sustancia de inclusión. Los pasos a seguir para la inclusión de las muestras en parafina son (Zibelman de Gorodner, 2013):

- Deshidratación.
- Impregnación en el solvente o Diafanización.
- Inclusión y formación del bloque de parafina.

Deshidratación. Significa extraer o remover el agua de los tejidos fijados. La deshidratación debe ser completa porque, de lo contrario, el solvente no actúa de forma adecuada y el bloque de inclusión no alcanza la dureza requerida. Para lograr esto, se utilizan líquidos deshidratadores en los cuales se sumergen los tejidos. Los deshidratadores más usados son el alcohol etílico, el alcohol isopropílico, el dioxano y el cloroformo.

En el caso de la inclusión en parafina, las muestras se deshidratan en baños sucesivos en soluciones de concentración crecientes de alcohol etílico (Figura 1).

Diafanización: luego de la deshidratación las muestras se encuentran embebidas en alcohol etílico absoluto, la parafina no es soluble en alcohol, por lo que se transfiere el tejido a un líquido donde sea miscible tanto con el alcohol etílico absoluto como con la parafina; estos líquidos se denominan sustancia intermediaria, como por ejemplo el benceno, xilol, tolueno y el cloroformo,

Estas sustancias son normalmente aclarantes por lo que comprobando la translucidez de la pieza podemos cerciorar la penetración de la sustancia intermediaria en el tejido.

Inclusión y formación del bloque de parafina: La parafina es una sustancia de aspecto ceroso que está formada por mezclas de hidrocarburos saturados. Generalmente son sustancias sólidas a temperatura ambiente y su punto de fusión puede variar entre 40 °C y 70 °C según la composición de la mezcla de hidrocarburos. Según su punto de fusión se puede clasificar en parafinas blandas, semiduras o duras. Es recomendable una dureza mayor para incluir muestras más duras. Las parafinas más usadas tienen un punto de fusión en torno a los 60 °C.

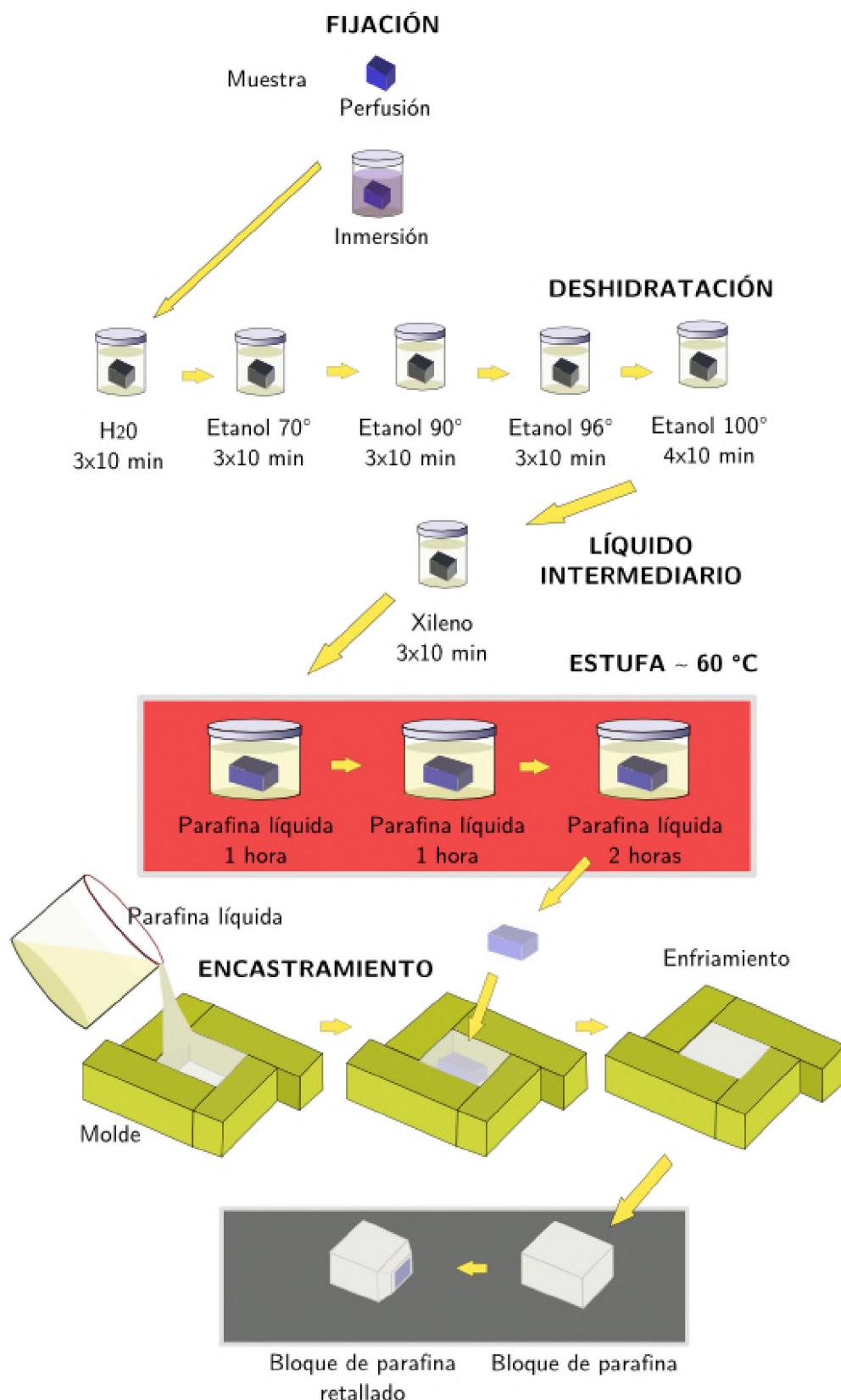


Figura 1: *Esquema de la inclusión en parafina de una muestra de tejido previamente fijada. Los tiempos de incubación en cada sustancia pueden variar en función del tamaño de la muestra, tipo de tejido o, por ejemplo, el líquido intermediario. Sin embargo, los pasos son comunes a cualquier inclusión en parafina* (Megías *et al.*, 2019).

Corte o Microtomía

En esta etapa, los tejidos y la parafina integran un solo bloque que, posee la dureza y la consistencia suficientes para obtener secciones delgadas y transparentes.

Las secciones delgadas o “cortes” se obtienen utilizando instrumentos mecánicos denominan “micrótomos” (Zibelman de Gorodner, 2013) diseñados para que en forma más o menos automática, seccionen el bloque de parafina en cortes delgados y de grosor uniforme.

Para obtener los cortes se deben seguir los siguientes pasos (Figura 2):

- Sujetar firmemente el bloque con el sistema de abrazaderas y la muestra orientada correctamente.
- Alinear el sistema de sujeción de la navaja y el filo de la misma, con la superficie de corte del bloque.
- Desgastar la superficie del bloque de parafina hasta alcanzar el tejido y se tenga la certeza de abarcar toda el área que se desea seccionar.
- Marcar en el dial del microtomo, el número de micrómetros de grosor que deben alcanzar los cortes.
- Accionar la manivela que desplaza la abrazadera con el bloque de parafina para obtener los cortes (aislados o seriados).

Obtenidos los cortes se manipulan cuidadosamente con unas pinzas o pinceles finos, se estiran para que nuestro tejido quede perfectamente extendido antes de su fijación definitiva en la superficie de un portaobjetos. Las secciones se colocan en un recipiente sobre agua caliente a unos 35 °C a 40 °C llamados “baños de flotación”(Figura 2), el calor las hace extenderse sin llegar a su punto de fusión.

La superficie de los portaobjetos donde se colocan las tiras de cortes han de estar desgrasadas, bien limpias y previamente recubiertas con soluciones de gelatina, de albúmina u otras sustancias para que el tejido quede adherido durante el procesamiento posterior, de esta manera actúan como adhesivo entre el cristal y el tejido.

Con la ayuda de una aguja histológica se empujan los cortes que flotan en el líquido hasta colocarlos en el portaobjeto (Figura 2). Una vez que el agua se ha evaporado y están extendidas las

tiras de cortes de parafina sobre los portaobjetos, se procede a un secado exhaustivo en una estufa a una temperatura de entre 35 °C y 40 °C durante toda la noche. Una vez secos, los portaobjetos con las secciones están listos para su posterior procesamiento.

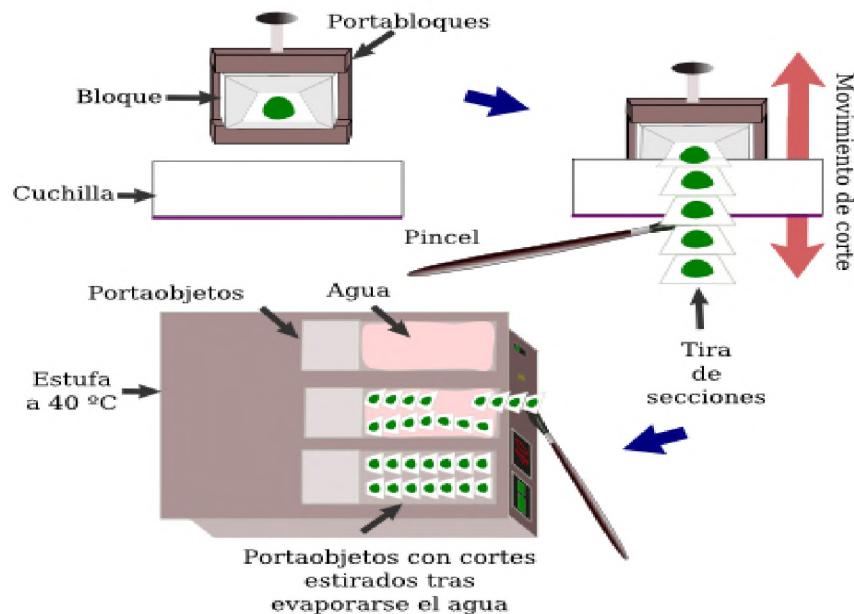


Figura 2: *Etapas del corte* (Megías *et al.*, 2019).

Coloración o tinción

El procedimiento de coloración o tinción consiste en que una estructura celular o tisular adquiere específicamente un color bajo la acción de una sustancia colorante.

Esto es requerido debido a que la mayoría de los tejidos, sobre todo los de los animales, son incoloros y por ello se necesita teñirlos para observar sus características morfológicas con el microscopio óptico (Megías *et al.*, 2019). Esto se logra con el uso los colorantes, sustancias coloreadas que pueden comunicar su color a otros cuerpos, sea el mismo color que ellas tienen (colorantes ortocromáticos), o bien teñir de un color distinto (colorantes metacromáticos, ejemplo: Azul de Toluidina, tiñe de rojo determinados grupos químicos de las células y azul todo lo demás) (Zibelman de Gorodner, 2013).

HEMATOXILINA-EOSINA

La coloración de hematoxilina-eosina es una de las tinciones más comúnmente usada en histología sobre cortes de parafina. Se usa un colorante básico (hematoxilina) que tiñe los núcleos de color azul, azul morado, violeta, pardo oscuro o negro, dependiendo de los agentes oxidantes y

mordientes que se utilizaron; el otro colorante es ácido (eosina), este tiñe el citoplasma y material extracelular de color rosado. Antes de proceder a la tinción, si partimos de cortes de parafina, tenemos que llevar a cabo unos tratamientos previos sobre las secciones (Figura 3).

Procedimiento:

1. Desparafinado: elimina el medio de inclusión, la parafina.
2. Hidratación los cortes en baños decrecientes de alcohol.
3. Coloración con la solución de hematoxilina. En este paso es conveniente respetar el tiempo de coloración que recomienda cada tipo de solución de hematoxilina. Dependiendo de la fórmula de preparación el tiempo puede variar de 3 a 20 minutos.
4. Diferenciación: lavado con agua corriente (las sales del agua permiten obtener una coloración más violácea)
5. Lavado: lavado en agua destilada.
6. Coloración con una solución alcohólica o acuosa de eosina.
7. Deshidratación en baños crecientes de alcohol etílico (es necesaria porque el medio de montaje no suele ser hidrosoluble).
8. Diafanización o aclaración empleando xilol.

En estas condiciones los tejidos están preparados para realizar en ellos el montaje.

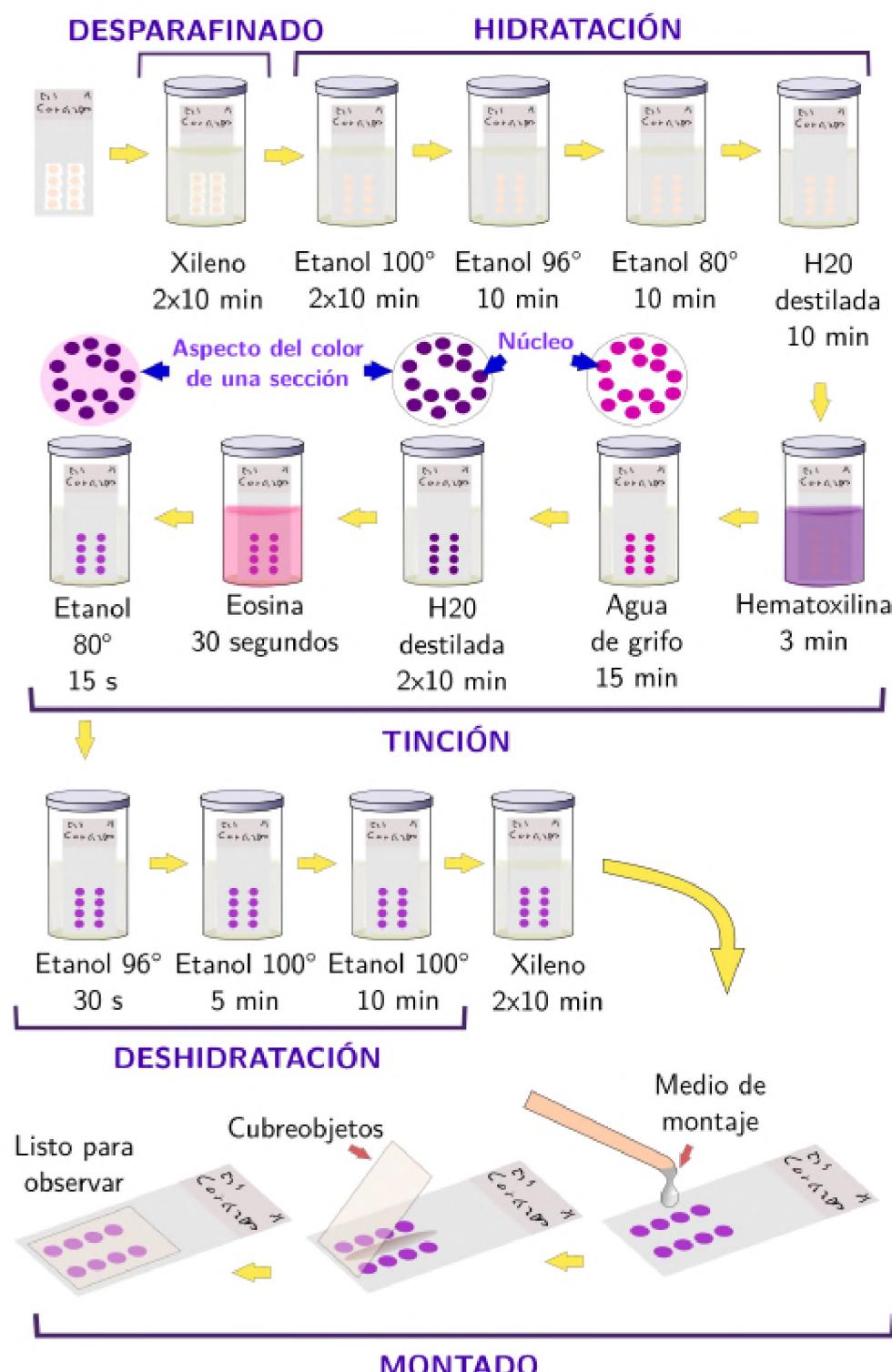


Figura 3: Pasos que se siguen durante una tinción general de hematoxilina-eosina. Los tiempos son aproximativos porque dependen del grosor de los cortes y de la concentración de los colorantes (Megías et al., 2019).

Montaje

Las preparaciones con cortes adheridos y teñidos pueden sufrir decoloraciones, daños u otras alteraciones si no se protegen de modo adecuado (Sepúlveda Saavedra, 2012), es por ello que una vez finalizado el proceso de tinción los preparados deben protegerse de modo adecuado para poder usarlos infinidad de veces. Para lograr este propósito se recurre a un último procedimiento llamado montaje donde usamos resinas sintéticas, cubreobjetos, pipetas de plástico y pinzas (Figura 3).

Procedimiento:

1. Colocar encima del corte coloreado y diafanizado una gota de una sustancia adherente, diluida, generalmente en xilol (resina natural como el bálsamo de Canadá o resinas sintéticas, cuyos índices de refracción son similares a los del vidrio).
2. Colocar encima un cubreobjetos, cuidando que no queden burbujas de aire entre la resina.
3. Se deja que el xilol se evapore, y la resina adquiera solidez suficiente; para ello las láminas se colocan en una estufa (45 °C 50 °C) durante 24 a 48 horas, luego de esto están listas para ser observadas con el microscopio óptico.

TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

Con frecuencia, las reacciones histoquímicas se aplican sobre tejidos fijados, lo que asegura la conservación del compuesto a identificar y una buena preservación morfológica (Sepúlveda Saavedra, 2012).

Por lo general, la histoquímica se divide en histoquímica convencional, histoquímica enzimática, inmunohistoquímica e inmunocitoquímica (Sepúlveda Saavedra, 2012).

En el presente trabajo se desarrollarán las técnicas histoquímicas convencionales. Estas técnicas se basan en el depósito de colorantes específicos, como el resultado de las propiedades físicas o químicas intrínsecas de los componentes del tejido. Esto permite localizar compuestos químicos tisulares o celulares ya conocidos, en zonas específicas. Los compuestos tanto inorgánicos como orgánicos se pueden identificar por medio de reacciones químicas simples o de doble sustitución, que producen sustancias coloreadas insolubles (Sepúlveda Saavedra, 2012).

Existen técnicas histoquímicas para detectar glúcidos, proteínas y nucleótidos. La técnica histoquímica más empleada es la reacción de PAS (Peryodic Acid Schiff).

El trabajo realizado tiene como objetivo general evaluar el contenido de hidratos de carbono en el tegumento del *Gymnotus carapo*. Para ello se empleó la reacción de PAS.

REACCIÓN DE PAS (PERYODIC ACID SCHIFF)

La tinción de PAS (del inglés *Periodic Acid-Schiff*, ácido peryódico–reactivo de Schiff) es una de las tinciones más comúnmente utilizada en histología y se utiliza para evidenciar la presencia de grupos aldehídicos formados por la acción oxidante del ácido peryódico sobre los hidratos de carbono y su evidencia ulterior por medio del reactivo de Schiff.

Tiñe de rojo o rojo púrpura a las estructuras que han liberado los aldehídicos (Zibelman de Gorodner, 2013). Será positiva para las siguientes estructuras: Membrana basal, células caliciformes, células que contengan glucógeno como por ejemplo los Hepatocitos y las células musculares. Existen otras sustancias que no son hidratos de carbono pero que son PAS positivas como los lípidos no saturados, fibras colágena y reticular (Zibelman de Gorodner, 2013).

El fundamento de la reacción consiste en oxidar los tejidos mediante el ácido peryódico para incrementar el número de grupos carbonilos (aldehídicos o cetonas) presentes en ellos. Posteriormente, se trata la muestra con el reactivo de Schiff que reacciona con dos grupos aldehídicos contiguos dando lugar a una coloración rojo-púrpura característica.

La histoquímica de la reacción PAS se fundamenta en que el ácido peryódico rompe la unión de los carbonos adyacentes (los grupos oxidrilos OH) de los anillos de las hexosas de los carbohidratos y las hexosaminas de los glicosaminoglicanos y forma grupos aldehídicos mediante la oxidación de los grupos glicólicos 1-2 de los polisacáridos, los cuales reaccionan con el reactivo de Schiff o ácido bis-N aminosulfónico (fucsina básica que contiene parafucsina o cloruro de triaminotrifenilmetano que se trata con ácido sulfuroso para desaparecer el doble enlace existente en el centro de la molécula de tal forma que resulta una sustancia incolora, el ácido sulfovioleta), un colorante incoloro pero que se torna rojo al contacto con los grupos aldehídicos que puedan estar presentes en los tejidos (luego de aparecer de nuevo el doble enlace que se comporta como el grupo cromóforo) para generar un color púrpura intenso bastante particular.

Una gran ventaja de la tinción histoquímica PAS es su capacidad de discriminación de tipos de glucidos con pequeñas modificaciones de la técnica.

Procedimiento (Figura 4):

1. Desparafinado: elimina el medio de inclusión, la parafina.
2. Hidratación de los cortes en baños decrecientes de alcohol.
3. Lavado con agua corriente.
4. Sumergir en solución de ácido peryódico (a temperatura ambiente).
5. Lavados suaves con agua destilada.
6. Sumergir en reactivo de Schiff (a temperatura ambiente).
7. Lavado con agua destilada.
8. Efectuar coloración de fondo con hematoxilina activada.
9. Lavado rápidamente con agua corriente.
10. Lavado con agua destilada.
11. Deshidratación empleando xilol.

En estas condiciones los tejidos están preparados para realizar en ellos el montaje.

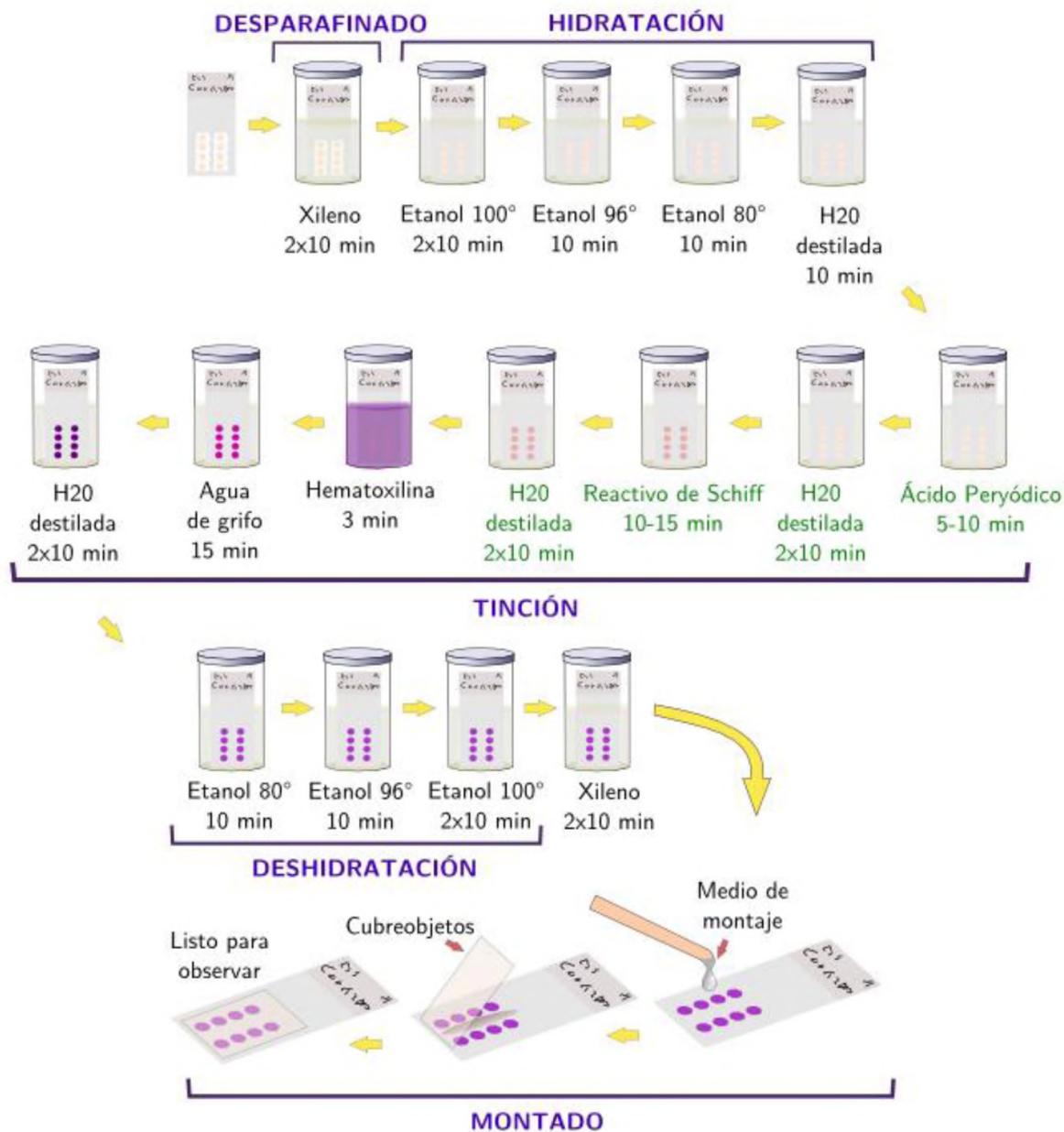


Figura 4: Pasos que se siguen durante una tinción general de PAS. Los tiempos son aproximativos porque dependen del grosor de los cortes y de la concentración de los colorantes (Megías et al., 2019).

Histomorfometría

Determinación de la altura de la epidermis y dermis y diámetro de las células mucosas

Procedimiento:

- Seleccionar los preparados colorados con hematoxilina eosina de las distintas regiones.

- Observar con el microscopio óptico Olympus BX41 con cámara acoplada.
- Realizar la captura de imágenes de las distintas regiones para su posterior estudio.
- Hacer el estudio con el software imagen Pro-Plus A de las imágenes obtenidas.
- seleccionar la región a analizar (epidermis, dermis o células caliciformes) y realizar la medición correspondiente (grosor de la epidermis y la dermis, diámetro de las células caliciformes).
- Realizar el análisis de los datos obtenidos: calcular los promedios correspondientes a cada región.

Recuento de células PAS+

Procedimiento:

- Seleccionar los preparados colorados con ácido peryódico–reactivo de Schiff de las distintas regiones.
- Observar con el microscopio óptico Olympus BX41 con cámara acoplada.
- Establecer parámetros para el conteo de células: células ovaladas o circulares, con un contorno bien definido.
- Realizar la captura de imágenes de las distintas regiones para su posterior estudio.
- Contar el número de células PAS + en 10 campos con un aumento de 1000x en las distintas regiones analizadas.
- Calcular los promedios correspondientes a cada región.

RESULTADOS

Análisis microscópico

A finalizar las técnicas histológicas se procedió al análisis microscópico de las distintas muestras.

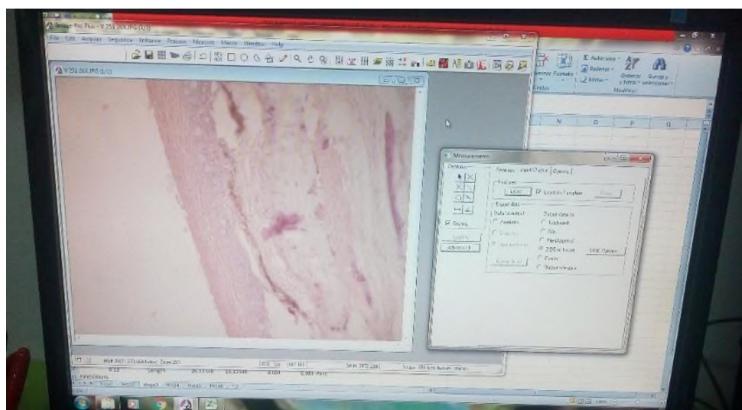
A los cortes histológicos coloreados con hematoxilina eosina se realizaron los estudios de las variables cuantitativas (altura de la epidermis, altura de la dermis y diámetro de las células caliciformes).

A las muestras procesadas con PAS se les realizó el recuento del número de células PAS+.

Determinación de la altura de la epidermis y dermis y diámetro de las células mucosas

Se seleccionaron nueve preparados coloreados con hematoxilina eosina, dos de la región dorsal, cuatro de la región ventral y tres de la región lateral.

Se realizó la observación con el microscopio óptico Olympus BX41 con cámara acoplada, posteriormente se realizó la captura de imágenes de las distintas regiones para su posterior estudio y análisis estadístico con el software imagen Pro-Plus A



Los datos morfométricos obtenidos muestran que la capa epidérmica de *Gymnotus carapo* presentan en promedio un mayor grosor en todas las regiones que la capa dérmica. Se evidencia la presencia de diferencias en el grosor del tegumento en las distintas regiones.

En cuanto al diámetro de las células mucosas no se evidencia una variación según la región del tegumento donde se presentan.

REGIÓN	EPIDERMIS	DERMIS	CÉLULAS
Dorsal	63,41 μm	40,77 μm	15,01 μm
Lateral	122,99 μm	21,18 μm	15,04 μm
Ventral	98,00 μm	18,30 μm	15,10 μm

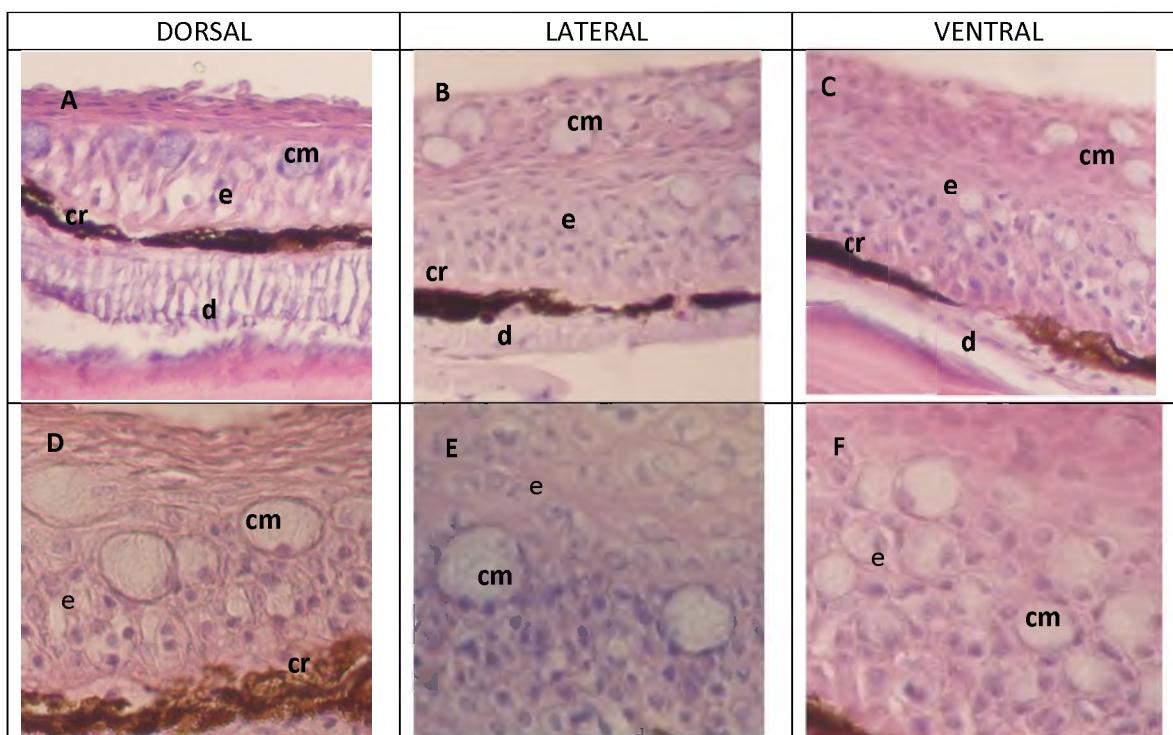
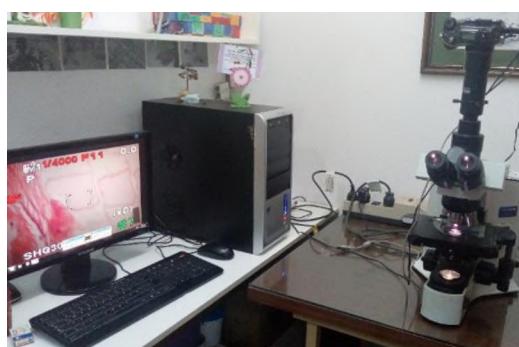


Figura 5: A- Corte transversal del tegumento de la región dorsal de *Gymnotus carapo*. B- Corte transversal del tegumento de la región lateral de *Gymnotus carapo*. C- Corte transversal del tegumento de la región ventral de *Gymnotus carapo*. D- Detalle de la epidermis de la región dorsal y de las glándulas mucosas. E- Detalle de la epidermis de la región lateral y de las glándulas mucosas. F- Detalle de la epidermis de la región ventral y de las glándulas mucosas. **Coloración empleada:** B, C, D, E, F y G: Hematoxilina-Eosina. **Referencias:** e: epidermis, d: dermis, cr: cromatóforos, cm: célula mucosa. **Magnificación:** A, B, C: 200X. D, E, F: 400X.

RECUENTO DE CÉLULAS PAS+

Se seleccionaron preparados coloreados con ácido peryódico–reactivo de Schiff y se realizó la observación con el microscopio óptico Olympus BX41 con cámara acoplada, posteriormente se realizó la captura de imágenes de las distintas regiones para su posterior estudio. Se realizó el conteo de células PAS + en 10 campos con un aumento de 1000x en las distintas regiones analizadas.



Las células mucosas se caracterizan por tener un cuerpo esférico de gran tamaño, con citoplasma basófilo y un contorno delgado de color violeta, donde no fue posible distinguir el núcleo celular. Se pudo observar que en las tres regiones analizadas las células mucosas se presentan en mayor número en la región ventral, con un aumento gradual desde la región lateral. El citoplasma de las células mucosas es bastante pobre en orgánulos y rico en secreciones PAS +, el cual se observa de color violeta intenso y de apariencia de apariencia granular con un contorno celular bien definido.

REGIÓN DORSAL	REGIÓN LATERAL	REGIÓN VENTRAL
Promedio de células PAS +: 60 Células	Promedio de células PAS +: 100 Células	Promedio de células PAS +: 140 Células

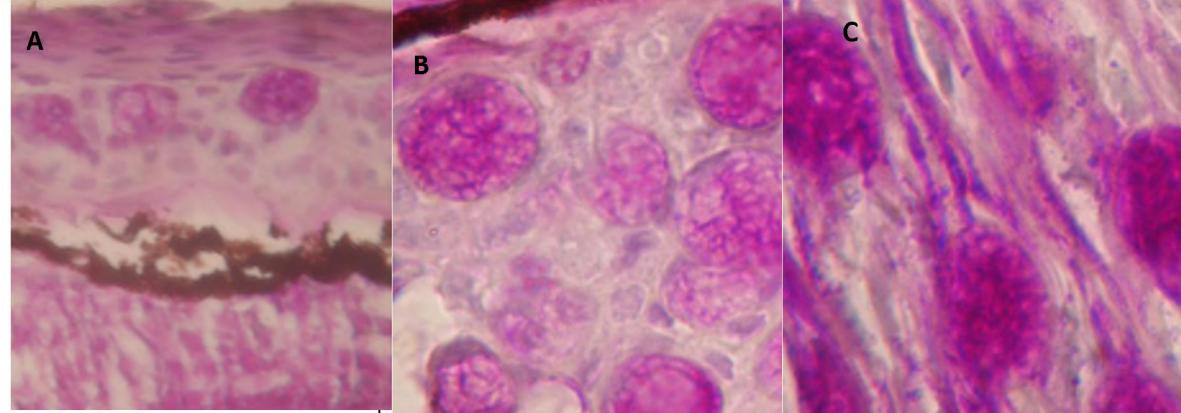


FIGURA 6: A- Corte transversal del tegumento de la región dorsal de *Gymnotus carapo*. B- Corte transversal del tegumento de la región lateral de *Gymnotus carapo*. C- Corte transversal del tegumento de la región ventral de *Gymnotus carapo*. **Coloración empleada:** A, B, C: PAS. **Magnificación:** A: 400X; B, C: 1000X.

Se analizó la intensidad de reacción de la tinción histoquímica PAS del tegumento de *Gymnotus carapo* asignándole la siguiente escala: Débil, moderado, fuerte, muy fuerte.

Este estudio mostró que la región ventral contiene mayor número de células PAS + de intensidad muy fuerte, en la región lateral se ve un aumento en el número de células PAS + de intensidad fuerte, en la región dorsal se observa una disminución del número de células PAS + de intensidad muy fuerte y un aumento del número de células PAS + de intensidad moderada.

	REGIÓN DORSAL	REGIÓN LATERAL	REGIÓN VENTRAL
INTENSIDAD DE LA REACCIÓN	MODERADO A FUERTE	FUERTE	FUERTE A MUY FUERTE

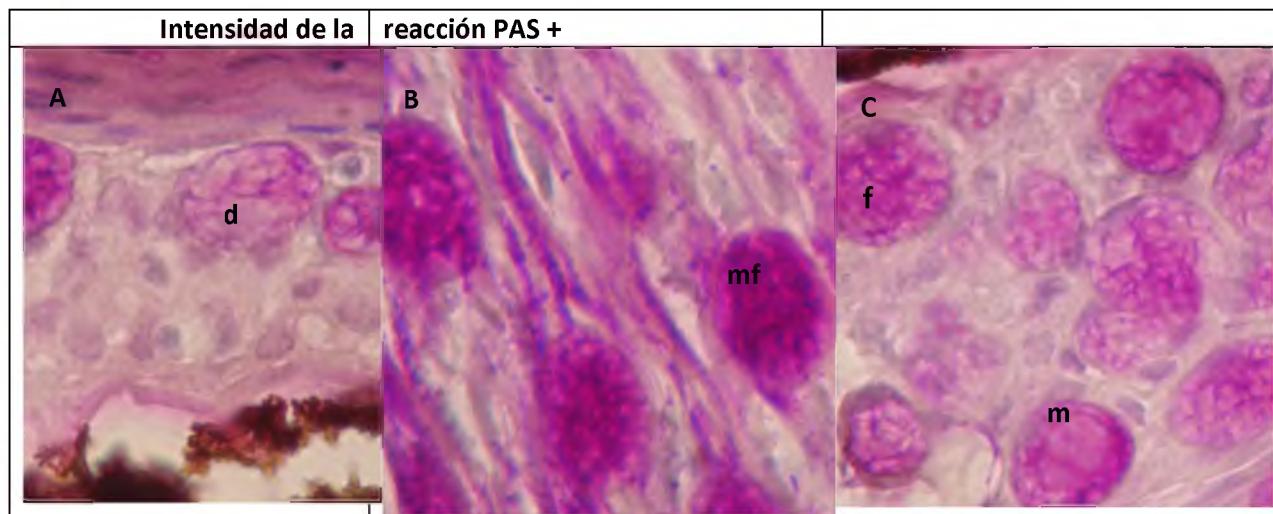


FIGURA 7: A-B-C Corte transversal del tegumento de *Gymnotus carapo*. **Coloración empleada:** A, B, C: PAS. **Referencias:** d: débil, m: moderado, f: fuerte, mf: muy fuerte. **Magnificación:** A, B, C 1000X.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se lograron alcanzar los objetivos propuestos en el plan de actividades. Por medio de la realización de técnicas histológicas básicas; coloración de hematoxilina eosina y tinción con PAS, las cuales fueron analizadas por microscopia óptica.

Los resultados morfométricos obtenidos muestran que el grosor del tegumento varía en las distintas regiones. La capa epidérmica de *Gymnotus carapo* presentan en promedio un mayor grosor en todas las regiones que la capa dérmica. Estos resultados se diferencian de los datos morfométricos obtenidos del pez *Eremophilus mutisii* donde la capa dérmica presenta en promedio mayor grosor que la capa epidérmica (Bonilla Lizarazo, Quintero Virguez, Gómez Ramírez, Rodríguez Caicedo, & Hurtado Giraldo, 2008).

En el caso del estudio de las células caliciformes, en cuanto a la distribución en las diferentes regiones, se pudo observar que en las tres regiones analizadas las células mucosas se presentan en mayor número en la región ventral, con un aumento gradual desde la región lateral. En cuanto a la intensidad de la reacción PAS+, este estudio mostró que la región ventral contiene mayor número de células PAS + de intensidad muy fuerte, en la región lateral se ve un aumento en el número de células PAS + de intensidad fuerte, en la región dorsal se observa una disminución del número de células PAS + de intensidad muy fuerte y un aumento del número de células PAS + de intensidad moderada.

La técnica de PAS permitió reconocer que el material de secreción de las células mucosas es de tipo glicoprotéico, observándose de color violeta intenso y de apariencia granular con contenido celular bien definido. Estos resultados son similares a los hallados en el análisis histoquímico de glicoconjungados en la piel de *Arius tenuispinis*, donde utilizando técnicas de tinción con glicoconjungados convencionales (tinción con PAS), se pudo confirmar que las células mucosas contienen una cantidad considerable de glicoconjungados en todas las ubicaciones de la piel (Al-Banaw et al, 2010). Las glicoproteínas encontradas en las células caliciformes se tiñen claramente de magenta cuando se someten a tinción de PAS (Al-Banaw, Kenngott, Al-Hassan, Mehana, & Sinowatz, 2010). Es muy probable que entre los componentes de estas secreciones se encuentren elementos antipatógenos y antimicrobianos que pueden prevenir la colonización de agentes extraños para evitar infecciones.

En trabajos posteriores se podrá realizar la tinción Alcian blue que dependiendo del pH permitirá teñir diferentes tipos de polisacáridos, a pH 1.0 para polisacáridos sulfatados, pH 2.5 ácidos siálicos y urónicos. Esta tinción se puede combinar con PAS y Hematoxilina Eosina para

distinguir a los mucopolisacáridos ácidos (teñidos con Azul alcian) del resto de los mucopolisacáridos.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Banaw, A., Kenngott, R., Al-Hassan, J., Mehana, N., & Sinowitz, F. (2010). Histochemical Analysis of Glycoconjugates in the Skin of a Catfish (*Arius Tenuispinis*, Day). *Anatomia Histología Embryología*, 42-50.
- Bonilla Lizarazo, R. J., Quintero Virguez, M., Gómez Ramírez, E., Rodríguez Caicedo, D., & Hurtado Giraldo, H. (2008). Histología y morfometría de piel del pez *Eremophilus mutisii* (Trychomecteridae, Siluriformes). *Biología Tropical*, 885-893.
- Elliott, D. (2011). Functional Morphology of the Integumentary System in Fishes. *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, 476-488.
- González Gutiérrez , R. (2014). Los peces eléctricos (orden Gymnotiformes) de Panamá. *Puente Biológico*, 51-77.
- Iwaszkiw, J. M., Zappietro, E. G., Ferriz, R. A., & Chiramonte, G. E. (2016). Aportes a la biología de *Gymnotus omarorum* (Teleostei) de la Laguna Blanca, Parque Nacional Río Pilcomayo, Formosa: estado de condición, desarrollo gonadal y temporada reproductiva. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 201-202.
- Medeiros Damasceno, E., Castro Monteiro, J., Duboc, L. F., Dolder, H., & Mancini, K. (2012). Morphology of the Epidermis of the Neotropical Catfish *Pimelodella lateristriga* (Lichtenstein, 1823) with Emphasis in Club Cells. *Plos One*, 1-7.
- Megías pacheco, M., Molist García , P., & Pombal, M. Á. (22 de 05 de 2019). *Atlas de histología vegetal y animal* . Obtenido de Atlas de histología vegetal y animal : http://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/guiada_o_a_inicio.php
- Sepúlveda Saavedra, J. (2012). Texto Atlas de Histología. Biología celular y tisular. En J. Sepúlveda Saavedra. San Nicolás de los Garza, Mexico: McGraw-Hill.
- Sierra , E., Espinosa de los Monteros, A., Real , F., Herráez, P., Castro , P., & Fernández, A. (2011). Histología y patología de los peces. Parte 1: Biología y necropsia de los peces. *Revista canaria de las ciencias veterinarias*, 44-51.
- Zibelman de Gorodner, O. (2013). Histología: métodos e instrumentos de estudio de la histología. Parte I: técnica histológica. *Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina. Argentina, Corrientes.*, 1-13.