

Modificación de los tiempos de tinción de cortes histológicos con hematoxilina-eosina para maximizar la observación de gametos femeninos de *Euthynnus alletteratus* Rafinesque, 1810 (Pisces: Scombridae) del suroeste del Golfo de México.

ROBERTO MARTÍN CRUZ-CASTÁN¹, SERGIO CURIEL-RAMÍREZ², CÉSAR MEINERS¹.

¹Universidad Veracruzana. Instituto de Ciencias Marinas y Pesquerías. Av. Hidalgo # 617 Col. Rio Jamapa C.P. 94290 Boca del Rio, Veracruz. México. cas213@hotmail.com, cmeiners@uv.mx

²Instituto Tecnológico de Boca del Río. Km. 12. Carretera Veracruz-Córdoba. C.P. 94290. scuriel73@hotmail.com

RESUMEN: Se describe una modificación de la técnica de tinción histológica con Hematoxilina-Eosina para gónadas femeninas de *Euthynnus alletteratus*.

PALABRAS CLAVE: histología, tinción, túnidos, ovocitos.

ABSTRACT: This paper describes a modification of the Hematoxylin-Eosin technique for female gonads of *E. alletteratus*.

KEY WORDS: histology, staining, little tunny, oocyte.

INTRODUCCIÓN

Euthynnus alletteratus es el más pequeño de los túnidos y se distribuye ampliamente en el Atlántico tropical y subtropical, incluyendo el mar Caribe y el Golfo de México en el oeste y el mar Mediterráneo y el mar Negro en el este (Collette & Nauen 1983). Esta especie es objeto de explotación por pesquerías costeras, generalmente artesanales, y es cada vez más apreciada como sucedáneo de túnidos mayores en Europa, África y EU (Valeiras *et. al.* 2006). A pesar de su amplia distribución y creciente importancia económica, existe poca información biológica y ecológica para la valoración adecuada y confiable de los stocks y su resiliencia. Uno de los aspectos clave, es el estudio detallado de su biología reproductiva a nivel histológico.

El análisis histológico de los ovarios permite describir el desarrollo de los ovocitos y con ello crear una escala de maduración gonadal para determinar la temporada y el tipo de desove (Hirt *et. al.* 1996). Las técnicas histológicas están diseñadas para preparar el tejido para observación microscópica, ya que rara vez las características morfológicas de las células que lo componen pueden observarse sin necesidad de la tinción. (Molist *et. al.* 2009).

Para teñir un corte de tejido, regularmente se utilizan por lo menos dos colorantes: uno ácido y otro básico. La combinación más empleada es la hematoxilina (colorante básico) y la eosina (colorante ácido). (Anzaldúa *et. al.* 2007). La hematoxilina, tiñe las estructuras ácidas de un color azul púrpuro; el núcleo, los ribosomas y el retículo endoplasmático rugoso tienen gran afinidad por este colorante debido a su alto contenido en ADN y ARN. La eosina, al ser

ácida, tiñe de una tonalidad rosa a las estructuras básicas, tales como la mayoría de las proteínas citoplasmáticas (García *et. al.* 2006). Los tiempos de tinción varían en función de las preferencias cromáticas del analista y las estructuras a estudiar, lo cual le confieren un carácter subjetivo a la tinción, y hace imposible prever los tiempos exactos de cada etapa en la tinción. (Labonord 2012).

Debido a lo antes mencionado, y a que no existe un protocolo específico para la especie, el objetivo de este trabajo fue determinar los tiempos de exposición óptimos de los cortes histológicos a los colorantes (hematoxilina-eosina), con el fin de obtener una definición cromática que permita identificar claramente las estructuras de los gametos femeninos de *E. alletteratus* capturado en el suroeste del Golfo de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron fracciones de gónadas femeninas de *E. alletteratus* provenientes de muestreos a pie de playa en la localidad de Antón Lizardo, Veracruz, México. De un espectro de muestras mensuales disponibles de mayo de 2011 a noviembre del 2012, se utilizaron 20 muestras de mayo del 2011 y 15 muestras de mayo del 2012 para determinar los tiempos de tinción adecuados, se utilizó este mes ya que fue cuando se observaron ovocitos más desarrollados. Debido que a lo largo del tiempo los ovocitos presentan cambios en sus estructuras celulares (Tyler *et. al.* 1996), utilizar el mismo mes permite realizar la tinción con los ovocitos en estado de maduración comparable.

La gónada de cada pez fue fijada en Davidson's fijador (Shaw & Battle 1957) por 48 horas, lo que permitió que el tejido se endureciera lo suficiente para permitir las manipulaciones siguientes sin que sufriera deformaciones (Estrada *et. al.* 1982). Después, los tejidos

fueron cambiados a Conservante Davidson's, donde eventualmente pueden pasar largos periodos de tiempo.

Se realizó un corte de 5mm de ancho a cada una de las gónadas, las fracciones de cada gónada se montaron en histocassettes, se deshidrataron en el histoquinete, donde pasaron dos veces por alcohol al 70%, dos veces por alcohol al 96%, 3 veces por alcohol al 100%, 3 veces por xileno y finalmente por parafina, en cada una de estas soluciones la muestra permaneció una hora. Concluida la deshidratación, se procedió a la inclusión, donde la parafina debe penetrar hasta lo más interno de las estructuras celulares del tejido, de modo tal que se obtengan bloques fáciles de manejar, para poder cortar el plano necesario. (Aguilar *et. al.* 1996.).

De los bloques de parafina se obtuvieron secciones de 5 μ m de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las muestras del 2011 se tiñeron a partir del tren de tinción del laboratorio de histología del Instituto Tecnológico de Boca del Río (ITBOCA) utilizado para bivalvos, mientras que para las muestras del 2012 se le modificaron progresivamente los tiempos en las soluciones a este tren de tinción, hasta encontrar la secuencia óptima en términos de la coloración y la mejoría de la definición de las estructuras celulares de los cortes histológicos de gónada de *E. alletteratus*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de probar y modificar empíricamente los tiempos de exposición de los cortes de de las gónadas del 2012 dentro de los diferentes reactivos, finalmente se determinaron nuevos tiempos para ciertas secciones del tren de tinción, los reactivos con nuevos tiempos fueron: la hematoxilina de 8 a 6 minutos, el alcohol acido de 15 a 3 segundos, 3^{er} baño de agua de 3 minutos a 3 segundos, agua destilada

de 10 segundos a 3 segundos, agua amoniacal de 2 minutos a 3 segundos, 4^{to} baño de agua de 2 minutos a 3 segundos y la eosina alcohólica de 1 a 2 minutos. (Cuadro I).

El resultado visual en los cortes observados al microscopio con las modificaciones descritas respecto de la tinción original, pueden observarse en la Figura 1. En ambas muestras se distinguen las estructuras celulares principales: núcleos, folículos, alveolos corticales y gránulos del vitelo, sin embargo, en las muestras con tiempos modificados (Fig. 1B) se distinguen claramente los nucléolos, se incrementa la definición del gránulo del vitelo y alveolos corticales y es posible además diferenciar entre la envuelta vitelina y el folículo.

Es importante notar que algunas estructuras celulares si bien se alcanzan a visualizar en algunos ovocitos de la Figura 1A, no se pueden distinguir con claridad todas y sobre todo en los ovocitos más pequeños o inmaduros, por el contrario en la Figura 1B, se puede reconocer más fácilmente el núcleo. El resultado de la coloración con los tiempos de tinción propuestos, coincide con los resultados generales de tinción de hematoxilina-eosina, en el cual los núcleos deben teñirse de azul morado como lo menciona Estrada *et. al.* (1982). Es importante mencionar que las técnicas de tinción son muy subjetivas y dependen de lo que se quiera resaltar en el tejido. (Labonord 2012).

En resumen, la modificación a los tiempos del tren de tinción aquí propuesta proporciona resultados óptimos para el análisis de tejido gonadal de *E. alletteratus*, ya que es posible identificar, diferenciar y cuantificar totalmente las estructuras celulares de los ovarios de esta especie, incluso en ovocitos inmaduros. Adicionalmente, ya que se trata de una modificación a la técnica más sencilla, los costos son reducidos, se ahorra tiempo y es de

implementación sencilla, lo que favorece la continuidad de los estudios sobre esta especie y probablemente sea extensible a otros Scombridae costeros, con muy pocas modificaciones.

REFERENCIAS

- Aguilar, M., B. Coutiño-Bello & P. Salinas-Rosales. 1996.** Manual general de técnicas histológicas y citoquímicas. Facultad de ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Anzaldúa, S., R. Ocádiz-Tapia & J. Hernández-Espinoza. 2007.** Manual de laboratorio de biología tisular. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Collette, B.B. & C.E. Nauen. 1983.** FAO species catalogue. Vol. 2. Scombrids of the world. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date. FAO, Rome, 137 pp.
- Estrada, E., L. Peralta-Zamora & P. Rivas-Manzano. 1982.** Manual de técnicas histológicas. 1ra ed. AGT EDITOR, S.A. México, D.F. 139 pp.
- García, M.J., E. Belso-Sánchez, M. Pérez, D. Gómez, D. Muñoz, L. Silva, M. Castilla, A. Ruibérriz, J. Ania, O. Ochoa, J. Cara, E. Puertas & A. Vilches. 2006.** Técnico especialista en anatomía patológica del servicio gallego de salud. 1ra ed. MAD, Sevilla, España. 336 pp.
- Hirt de Kunkel, L. & S. Flores. 1996.** Estructura histológica de los ovarios de *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) Pimelodidae, Siluriformes. B. Inst. Pesca, Sao Paulo, (23): 203-212.
- Labonord SAS. 2012.** Instrucciones de uso Hematoxilina de Harris.

Molist, P., M. Á. Pombal-Diego & M. Megías-Pacheco. 2009. Atlas de histología vegetal y animal. Técnicas histológicas. Departamento de biología funcional y ciencias de la salud, Facultad de biología, Universidad de Vigo.

Shaw, B. L. & H. I. Battle. 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). Can. J. Zool. 35: 325-347.

Tyler, C.R. & J. P. Sumpter. 1996. Oocyte growth and development in teleosts. Rev. Fish Biol. and Fish. (6), 287-318.

Valeiras, J. & E. Abad. 2006. Bacoreta. Manual del ICCAT. Pp 243-250.

Recibido: 10 Agosto, 2013
Revisado: 16 Abril, 2014
Aceptado: 22 Abril, 2014

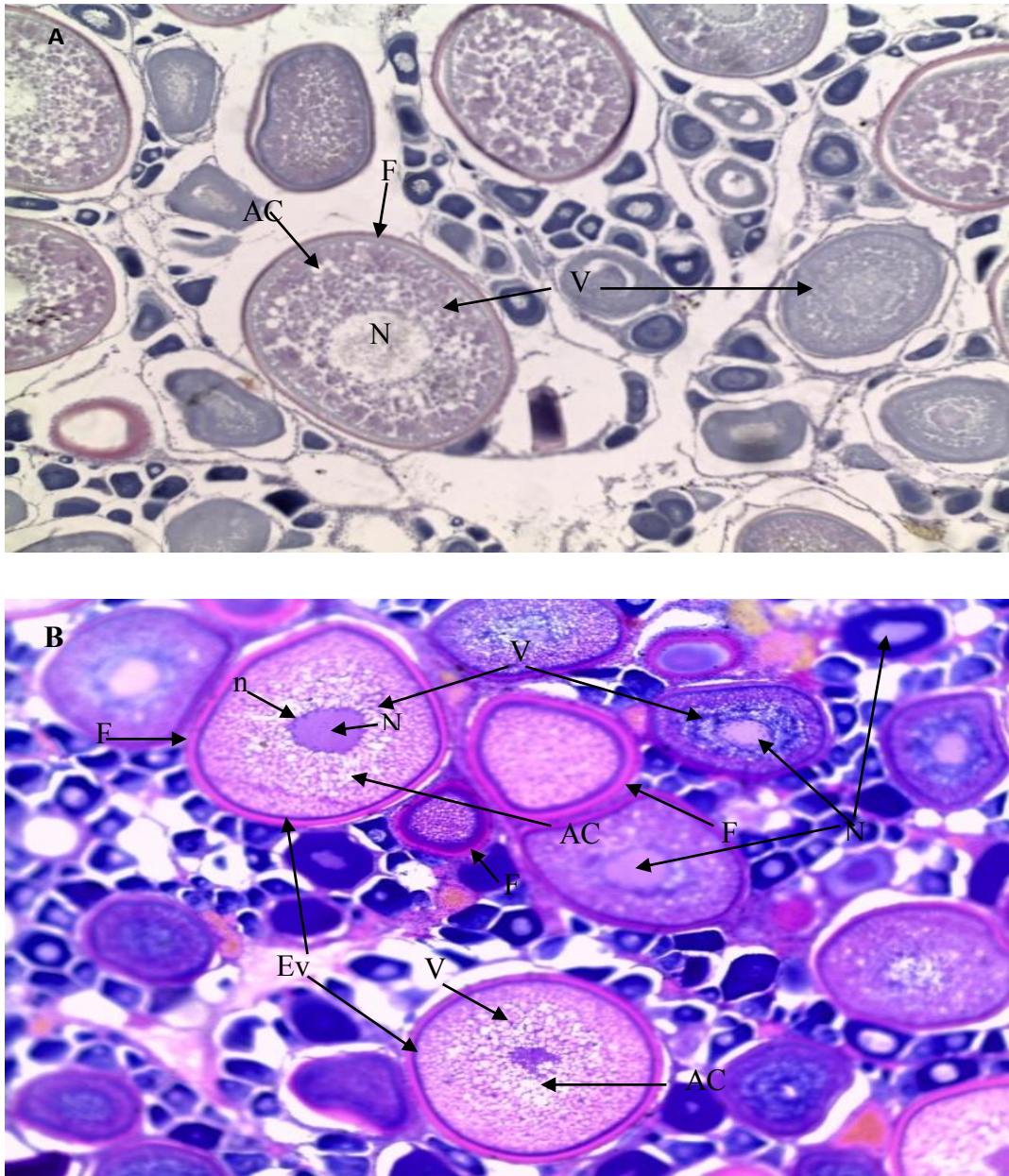


Figura 1. Comparación de las estructuras celulares de ovocitos utilizando diferentes tiempos de tinción (10x). A) Técnica de tinción original. B) modificación en tiempos. (N: Núcleos, n: nucléolos, F: folículo, AC: alveolos corticales, V: Gránulo de vitelo, Ev: Envuelta vitelina).

Cuadro 1. Determinación de los tiempos del tren de tinción para la observación de las estructuras de los gametos femeninos de *Euthynnus alletteratus*.

Tren de tinción	Tiempos originales del tren	Tiempos modificados
Xilol	3 minutos	3 minutos
Xilol	3 minutos	3 minutos
Xilol	3 minutos	3 minutos
OH 100	1 minuto	1 minuto
OH 100	1 minuto	1 minuto
OH 96	1 minuto	1 minuto
OH 10	1 minuto	1 minuto
H ₂ O	3 segundos	3 segundos
Hematoxilina*	8 minutos	6 minutos
H ₂ O	3 minutos	3 minutos
OH ácido*	15 segundos	3 segundos
H₂O*	3 minutos	3 segundos
H₂O Destilada*	10 segundos	3 segundos
NH₄OH*	2 minutos	3 segundos
H₂O*	2 minutos	3 segundos
H ₂ O Destilada	3 segundos	3 segundos
OH 96	1 minuto	1 minuto
Eosina alcohólica*	1 minuto	2 minutos
OH 96	1 minuto	1 minuto
OH 96	1 minuto	1 minuto
OH 100	1 minuto	1 minuto
OH 100	1 minuto	1 minuto
OH 100-Xilol	5 minutos	5 minutos
Xilol	5 minutos	5 minutos
Xilol	5 minutos	5 minutos
Montaje con resina	No aplica	No aplica.

*Reactivos con modificación en tiempos.