



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**CARACTERIZACIÓN
ULTRAESTRUCTURAL DEL
PARÁSITO *Rondonia rondoni* Y
EVALUACIÓN DE LESIONES A
NIVEL INTESTINAL ASOCIADAS A
LA PRESENCIA EN PACO (*Piaractus
brachypomus*) PROCEDENTES DE LA
LOCALIDAD DE IQUITOS**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN SANIDAD ACUÍCOLA**

CUADROS CUYA, RUBEN MARTIN

LIMA – PERU

2018

ASESOR DE TESIS:

Dr. ENRIQUE SERRANO MARTÍNEZ

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. MICHEL SAUVAIN

Dr. MANUEL TANTALEAN

Dr. LUIS LLANCO

AGRADECIMIENTO

Mi sincero reconocimiento a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por la calidad de la maestría en Sanidad Acuícola y de profesionales que la conforma. Mi especial gratitud para:

Dr. Luis Llanco Albornoz

Dr. Manuel Tantaleán Vidaurre

Agradecer a un gran amigo y a la vez gran profesional, el Dr. Patrick Mathews y al Dr. Omar Martins por sus conocimientos y el gran aporte brindado en la realización de la microscopia electrónica en la Universidad Federal de Sao Paulo.

A mi asesor de tesis, el Dr. Enrique Serrano Martínez, por sus enseñanzas y darme la confianza para desarrollar esta investigación, así como también brindarme las facilidades para su desarrollo fuera del país.

Del mismo modo a una gran persona, Lorena Rivadeneyra S. por su total apoyo durante los años que pasamos juntos en nuestra formación profesional, por su dedicación y tiempo de entrega para que se cumplan los objetivos de esta investigación.

A mis padres, por su apoyo incondicional y por hacerme mejor persona.

Finalmente he de mencionar que, la realización de esta tesis para optar el grado de Maestro en Sanidad Acuícola ha sido posible gracias al apoyo financiero brindado al Programa de Maestría Especializada en Sanidad Acuícola de la Universidad Peruana Cayetano Heredia subvencionado por Cienciactiva del CONCYTEC (Convenio de Gestión N° 230-2015 FONDECYT).

CONTENIDO

I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	4
Características generales del paco (<i>Piaractus brachypomus</i>)	4
Parásitos intestinales en “paco” <i>Piaractus</i> sp.	6
<i>Rondonia rondoni</i> Travassos, 1920.....	9
El tracto intestinal de los peces teleósteos	11
Indicadores de Salud	13
III. HIPOTESIS	15
IV. OBJETIVOS	16
V. MATERIALES Y METODO	17
Lugar de realización del estudio	17
Obtención de muestras	17
Determinación del estado de salud de los peces	18
Análisis parasitológico	18
Análisis histopatológico	21
VI. RESULTADOS	23
Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)	23
Estudio Histopatológico.....	29
Índices parasitarios	36
Estado de Salud de los peces	37
VII. DISCUSION	38
VIII. CONCLUSION Y RECOMENDACIONES	44
IX. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	46
ANEXOS	

TABLA

Tabla 1. Alteraciones histológicas en el tracto intestinal del paco (<i>Piaractus brachypomus</i>) N=35.....	30
Tabla 2. Frecuencia de helmintos gastrointestinales en <i>Piaractus brachypomus</i> colectados en el río Amazonas, Perú.....	36
Tabla 3. Prevalencia, intensidad media y amplitud de <i>Rondonia rondoni</i> para 35 individuos de <i>Piaractus brachypomus</i> colectados en el río Amazonas, Perú.....	36
Tabla 4. Factor de condición de Fulton en <i>Piaractus brachypomus</i> colectados en el río Amazonas, Perú.	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Piaractus brachypomus	4
Figura 2. Microscopia Electrónica de Barrido del nemátodo Rondonia rondoni, colectado en el intestino de Piaractus brachypomus en el río Amazonas, en la localidad de Iquitos, región de Loreto, Perú, en el periodo de julio de 2017.	25
Figura 3. Microscopia Electrónica de Barrido del nemátodo Rondonia rondoni, colectado en el intestino de Piaractus brachypomus en el río Amazonas, en la localidad de Iquitos, región de Loreto, Perú, en el periodo de julio de 2017.	26
Figura 4. Microscopia Electrónica de Barrido del nemátodo Rondonia rondoni, colectado en el intestino de Piaractus brachypomus en el río Amazonas, en la localidad de Iquitos, región de Loreto, Perú, en el periodo de julio de 2017.	27
Figura 5. Microscopia Electrónica de Barrido del nemátodo Rondonia rondoni, colectado en el intestino de Piaractus brachypomus en el río Amazonas, en la localidad de Iquitos, región de Loreto, Perú, en el periodo de julio de 2017.	28
Figura 6. Presencia e infiltración de células inflamatorias mononucleares en la mucosa del intestino (exocitosis). H&E. 400X.	31
Figura 7. Presencia de células inflamatorias en la submucosa y mucosa del epitelio, edema subepitelial y fusión de vellosidades. H&E. 100X.	31
Figura 8. Presencia de células inflamatorias mononucleares en las vellosidades intestinales. H&E. 100X.	32
Figura 9. Fusión de vellosidades intestinales. H&E. 100X.	32
Figura 10. Fusión de vellosidades con presencia de edema subepitelial y congestión en zona basal de las células epiteliales de la mucosa. H&E. 200X. ...	33
Figura 11. Presencia de hemosiderina en el epitelio intestinal. H&E. 400X.	33
Figura 12. Presencia e infiltración de células inflamatorias mononucleares, edema subepitelial y marcada congestión en mucosa. H&E. 400X.	34
Figura 13. Presencia de células inflamatorias en el epitelio intestinal y un granuloma en lámina propia. H&E. 200X.	34
Figura 14. Presencia de células inflamatorias en el epitelio intestinal y necrosis en la mucosa. H&E. 200X.	35

Figura 15. Necrosis de células epiteliales en intestino. H&E. 400X	35
Figura 16. A. Análisis en fresco del tracto intestinal del paco (<i>Piaractus brachypomus</i>). A, B y C. Presencia de <i>Rondonia rondoni</i> a lo largo del intestino.	37

RESUMEN

Existen diversos parásitos de peces de agua dulce que son causantes de importantes parasitosis en peces, llegando a provocar grandes mortalidades traducibles en sustanciales pérdidas económicas para las piscigranjas de todas partes del mundo. El nemátodo *Rondonia rondoni* es comúnmente encontrado en gran abundancia en el tracto intestinal de peces amazónicos, especialmente en el paco *Piaractus brachypomus*. Sin embargo, en la actualidad se desconoce si esta especie de nemátodo produce lesiones que comprometan en el desarrollo y la producción de *Piaractus brachypomus*. Lamentablemente, en nuestro país son pocos los estudios relacionados a la parasitosis en peces amazónicos tanto de cultivo como de medio natural. El objetivo de esta investigación es caracterizar al nemátodo *Rondonia rondoni*, a nivel morfológico y de la ultra estructura superficial de las hembras y machos, utilizando Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), así como la ocurrencia de alteraciones histológicas a nivel intestinal relacionado a su presencia en individuos de paco *P. brachypomus*. Para ello, fueron colectados 35 especímenes en las cuencas del río Amazonas, en la localidad de Iquitos, en el mes de julio de 2017. En el estudio parasitológico se detectaron 30 especímenes parasitados (85.7%). De los especímenes parasitados, en 29 se encontró el nematodo *Rondonia rondoni* (96.66%), 12 presentaron *Daytrema oxycephala* (40%) y 2 presentaron *Procamallanus* sp. (6.66%). En el estudio histopatológico se evidenció, en la mayoría de casos, la presencia de células inflamatorias mononucleares en la mucosa y submucosa (29/35) junto con infiltración hacia el lumen intestinal (27/29), también se observó fusión de vellosidades intestinales (17/35) con pérdida de

microvellosidades (18/35) y edema subepitelial en la mucosa (14/35). En menos casos se observó alteraciones circulatorias como hiperemia en la mucosa (8/35) y hemorragia (1/35), además de trastornos degenerativos como granuloma (2/35), necrosis (2/35) entre otros, como la presencia de hemosiderina en la mucosa (3/35). De esta manera, se confirma que *Rondonia rondoni* ocasiona alteraciones a nivel intestinal en donde se aloja, sin embargo, a pesar de la gran cantidad de parásitos observado por cada individuo, los especímenes no mostraron signo clínicos de enfermedad que afecten su desarrollo en el medio natural en donde fueron capturados.

Palabras clave: *Piaractus brachypomus*, *Rondonia rondoni*, Microscopía Electrónica de Barrido, histopatología, parásitos.

ABSTRACT

There are several parasites of freshwater fish that are the cause of major parasitic diseases in fish, causing most mortalities translatable in substantial economic losses for the fish farm of all parts of the world. The Nematode *Rondonia rondoni* is commonly found in great abundance in the intestinal tract of Amazonian fish, especially in the paco *Piaractus brachypomus*. However, despite the negative impact in the development and production that can affect that species, at present in our country there are few studies related to the parasitism in Amazonian fish both of culture and natural environment. The aim of this research is to characterize the nematode *Rondonia rondoni* at the morphological level and the superficial ultrastructure of females and males using Scanning Electron Microscopy (SEM), as well as the occurrence of intestinal histological alterations related to its presence in individuals of *P. brachypomus*. For this, 35 specimens were collected in the basins of the Amazon River, in the town of Iquitos in the month of July 2017. In the parasitological study were 30 specimens parasitized (85.7%). Of the parasitized specimens, 29 were parasitized with *Rondonia rondoni* (96.66%), 12 had *Dadaytrema oxycephala* (40%) and 2 had *Procamallanus* sp. (6.66%). In the histopathological study, in most of cases the presence of mononuclear inflammatory cells in the mucosa and submucosa (29/35) together with infiltration towards the intestinal lumen (27/29) was evidenced, intestinal villus fusion was also observed (17 / 35) with loss of microvilli (18/35) and subepithelial edema in the mucosa (14/35). In a few cases, circulatory alterations were observed, such as hyperemia in the mucosa (8/35) and hemorrhage (1/35). In addition to, degenerative disorders

such as granuloma (2/35), necrosis (2/35) among other disorders such as the presence of hemosiderin in the mucosa (3/35). In this way, it is confirmed that *R. rondoni* does cause alterations at the intestinal level where it is housed, however, despite the considerable number of parasites observed by each individual, the specimens showed no signs of disease that affect their development in the natural environment where they were captured.

Keywords: *Piaractus brachypomus*, *Rondonia rondoni*, Scanning Electron Microscopy, histopathology, parasites.

I. INTRODUCCION

El desarrollo de la acuicultura nacional viene en constante crecimiento junto con las nuevas tecnologías de crianza que ayudan a mejorar la actividad acuícola. En la amazonia se vienen cultivando algunas especies como sábalo cola roja (*Brycon cephalus*), gamitana (*Colossoma macropomum*), paiche (*Arapaima gigas*) y paco (*Piaractus brachypomus*), especies que son apreciadas en el mercado local (FONDEPES, 2004). Según las estadísticas del Ministerio de la Producción, la cosecha de especies amazónicas proveniente de la acuicultura se incrementó paulatinamente de 700 a más de 1500 TN en los últimos seis años, siendo el paco (*Piaractus brachypomus*) la especie que más producción ha tenido, con 825 TN anual (PRODUCE, 2015).

Asimismo, en los últimos años ha surgido un crecimiento en la demanda de pescado por parte de las poblaciones urbanas, rurales e indígenas de la Amazonía peruana, dado el rápido crecimiento poblacional en la región (García *et al.*, 2009). En este escenario, para satisfacer dicha demanda, existe una mayor exigencia en la producción de peces de cultivo, lo que puede conducir al animal a un estrés continuo, haciéndolo más susceptible a organismos patógenos (Luque *et al.*, 2004; Conte, 2004). Factores como la calidad del agua, alta densidad, una inadecuada alimentación o un mal manejo en general, facilitan la presentación de enfermedades (Bauer, 1961), siendo al igual que otros animales empleados para la producción, susceptibles a sufrir infecciones bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias (Schalch y Moraes, 2005).

Referente a las infecciones parasitarias, la mayoría de peces de poblaciones silvestres y cultivadas, están infectados con parásitos. Sorprendentemente hay pocos informes de los parásitos que causan mortalidad o daño grave a las

poblaciones de peces, sin embargo, esto puede deberse a que en gran parte tales efectos pasan desapercibidos (Lamothe-Argumedo, 1994). Por otro lado, los parásitos pueden causar graves brotes de enfermedades en peces durante su cultivo, además, favorecen la entrada y proliferación de otros organismos patógenos al afectar a su morfología, fisiología y comportamiento, llegando incluso a aumentar la vulnerabilidad de los peces ante los depredadores (Illán, 2012). La presencia de densas poblaciones de peces criados en condiciones ambientales inadecuadas puede favorecer a determinadas especies de parásitos a aumentar su población a un nivel muy alto, no obstante, el número de parásitos necesarios para causar daño a un pez varía considerablemente según la especie, el tamaño del hospedero y su estado de salud (Reno, 1998; Roberts, 2012).

Estudios han reportado, en *Piaractus brachypomus*, la presencia de agentes parasitarios protozoarios, tremátodos, acantocéfalos y nemátodos (Thatcher, 2006; Oliveira & Tavares-Días, 2016). En Brasil, Franceschini *et al* (2013) y Campos *et al* (2009), registraron la presencia de *Dadaytrema oxycephala*, *Spectatus spectatus* y *Rondonia rondoni* en el tracto gastrointestinal de *Piaractus mesopotamicus* cultivados. En el Perú, Dinis (2014) del mismo modo reportó *Rondonia rondoni* en *Piaractus brachypomus* procedentes de cultivo. Otros estudios realizados en *Piaractus* sp. determinaron que el nemátodo hallado con mayor frecuencia es *Rondonia rondoni*, encontrándose a nivel del tracto intestinal (Luque, 2004; Thatcher, 2006; Campos, 2009). Estudios adicionales realizados en Brasil determinaron que existe parasitismo de gran intensidad en peces de agua dulce mantenidos en cultivos, pero tal parece que aún no se ha mostrado si existen alteraciones histopatológicas en los órganos infectados por *Rondonia rondoni*. Sin embargo, los autores mencionan que cabe la posibilidad de que estos parásitos puedan ocasionar alteraciones a nivel intestinal (García *et al.*, 1997; Martins 1998).

Pese a la importancia económica que tiene el *Piaractus brachypomus* entre otras especies nativas en el Perú, debido a su crecimiento a nivel nacional en el sector

acuícola, hasta la fecha es poco lo que se ha estudiado sobre la fauna parasitaria en esta y las investigaciones que existen solo han sido dirigidas principalmente hacia aspectos como el conocimiento del índice parasitario y descripción taxonómica (Dinis, 2014; Alcántara *et al.*, 2015). De igual manera, no hay estudios que hayan determinado a nivel histopatológico si *P. brachypomus* es afectado por la presencia de *Rondonia rondoni*. Debido a ello, el presente estudio evaluará si existen daños a nivel del tracto intestinal ocasionados por la presencia de *Rondonia rondoni* mediante histopatología en el paco (*Piaractus brachypomus*) procedentes de la localidad de Iquitos, departamento de Loreto-Perú. Asimismo, se caracterizará ultraestructuralmente la morfología del nemátodo *Rondonia rondoni* todo esto con el fin de diagnosticar, así como obtener un control oportuno sobre las infestaciones dadas por *R. rondoni* y prevenir ante la típica introducción de peces de ambientes naturales a medios de cultivo evitando la diseminación y futuro brote de enfermedades ocasionadas por parásitos.

II. ANTECEDENTES

Características generales del paco (*Piaractus brachypomus*)

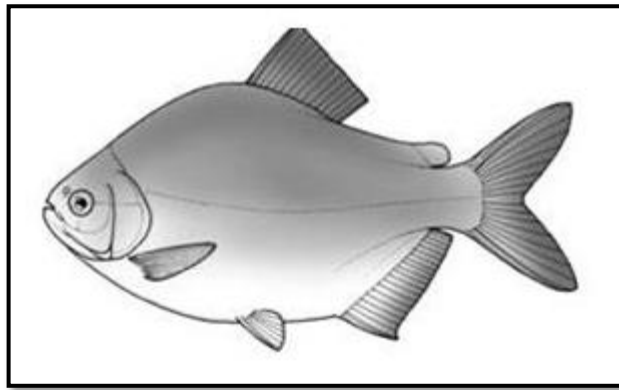


Figura 1. *Piaractus brachypomus*

Fuente: Proyecto río Putumayo - FAO

La especie *Piaractus brachypomus* pertenece al Reino Animalia, Phylum Chordata, Clase Actinopterygii, Orden Characiformes, Familia Serrasalminidae y es del Género *Piaractus* (Cuvier, 1818). Sin embargo, muchos autores sugieren que esta especie pertenece a la familia Characidae (Orti *et al.*, 1997). En Colombia y Venezuela esta especie recibe el nombre genérico de “cachama”, adicionando además un adjetivo según la especie: “cachama negra” para *Colossoma macropomum* y “cachama blanca” para *Piaractus brachypomus*. Por otro lado, en el Brasil es conocido como “pirapitinga” mientras que en el Perú es conocido como “paco”.

Esta especie se distribuye ampliamente por el río Orinoco, cuencas de los ríos Amazonas, y La Plata en América de Sur, así como en los bajos andes de Bolivia y Guyana. (Lauzanne y Loubens, 1985; Aliaga, 2004; Loubens *et al.*, 2001).

En cuanto a la morfología *Piaractus brachypomus* presenta una coloración clara, blanco plateado, a veces azuladas en el dorso y flancos, el abdomen es blanquecino, con ligeras manchas anaranjadas, con relación al tamaño, es más pequeño que la Gamitana llegando a medir 85 cm (Aliaga, 2004). La aleta adiposa es carnosa; los juveniles suelen tener un color más claro con tonalidades rojo intenso en la parte anterior del abdomen y en las aletas anal y caudal. Debido al poco número de branquiespinas que posee (37 en el primer arco branquial), presenta una baja capacidad de filtración. Esta especie llega a alcanzar una longitud de 85 centímetros y un peso máximo de 20 kg (González, 2001).

El *Piaractus brachypomus*, puede tolerar temperaturas que oscilan entre los 23°C a 32°C. Las concentraciones de oxígeno deben mantenerse entre 3 mg/l y 6.5 mg/l, que son valores frecuentes de encontrar en aguas cálidas de zonas tropicales. Asimismo, soporta pH entre 5.5 y 8, con un óptimo de 7.5. En cuanto a dureza del agua, el paco puede adaptarse bien a valores superiores a los 40 mg/l (Díaz y López, 1993).

En cuanto a sus características reproductivas, *Piaractus brachypomus* alcanza su madurez sexual al tercer año de edad, con un peso que varía de entre 2.5 a 3 kg. El dimorfismo sexual se da solamente en épocas de reproducción. El macho es quien suelta y expulsa el esperma, la hembra presenta un abdomen abultado, blando y la papila genital roja. Cada hembra produce aproximadamente 100,000 huevos /kilogramos/peso, el tiempo de incubación de los huevos es de 12 a 24 horas, el cual está influenciado por la temperatura del agua (Parrado, 2012).

Con respecto a sus hábitos alimenticios, estos peces presentan fuertes dientes molariformes, los que le permiten alimentarse de hojas grandes, frutos o semillas que caen de los árboles, pequeños insectos y además son filtradores de zooplancton. Después de la creciente, se alimentan principalmente de hojas, pero ocasionalmente comen peces pequeños como parte de su dieta. El *Piaractus brachypomus* en estado juvenil es omnívoro (Aliaga, 2004; Parrado, 2012).

En la acuicultura continental, es considerada una especie de mayor potencial productivo y comercial en la piscicultura extensiva, semi intensiva e intensiva de aguas cálidas continentales de América tropical, siendo una especie que presenta resistencia al manejo en cautiverio, presenta alta docilidad y rusticidad (Bello, 1992).

En el Perú, el paco se viene cultivando desde la década de los cincuenta con cultivos a primera escala inicialmente, desde ese entonces se ha venido realizando el aprovisionamiento de peces directamente del medio natural entre los meses de noviembre a diciembre para finalmente introducirlos en los estanques de cultivo (Guerra, 1992). Esta especie ha logrado rendimientos que pueden llegar a las 10 toneladas por hectárea/año (IIAP, 2000); siendo en la actualidad 825 toneladas/año según PRODUCE (2015). Su importancia comercial radica en tener un excelente sabor, textura y calidad de la carne, que le brindan una buena aceptación en el mercado (González, 2001).

Parásitos intestinales en “paco” *Piaractus* sp.

La variedad de peces en los cuales puede ser encontrados parásitos es inmensa, respecto al *Piaractus brachypomus*, en la literatura se ha reportado la presencia de 6 parásitos que se encuentran a nivel intestinal, pertenecientes a 3 Phylas:

Tremátoda, *Dadaytrema oxycephala*, *Pseudocladorchis cylindricus*; Nemátoda, *Rondonia rondoni*, *Spectatus spectatus*, *Klossinemella iheringi*; Acantocéphala, *Echinorhynchus jucundum* (Thatcher, 2006).

Estudios realizados por Campos (2009) en “pacú” *Piaractus mesopotamicus*, reportan la presencia de *Dadaytrema oxycephala*, *Spectatus spectatus*, *Echinorhynchus jucundum* y *Rondonia rondoni* a nivel intestinal, donde *D. oxycephala* y *R. rondoni* mostraron mayor prevalencia con 91.78% y 73.97% respectivamente, de un total de 73 individuos muestreados en los ríos Miranda y Aquidauana, en Brasil. Interesantemente, varias veces en este estudio fue observado un gran número de parásitos obstruyeron casi por completo la luz del tracto intestinal de los huéspedes.

Se evaluó la ocurrencia de parásitos en “pacú” *Piaractus mesopotamicus* y el híbrido “patinga” (*P. mesopotamicus* x *P. brachypomus*), en un estudio realizado en el Brasil, donde se analizaron 105 peces en total (44 “pacú” /61 “patinga”). Se identificaron 2 nemátodos: *Rondonia rondoni* y *Contracaecum* sp. (L3). Ambas especies presentes a nivel intestinal, cavidad visceral y mesenterio, respectivamente. Con respecto a las infecciones causadas por dichos nemátodos, los autores mencionan que la intensidad y la abundancia de *R. rondoni* fueron superiores a los observados para el *Contracaecum* sp. Asimismo, mencionan que un alto nivel de infección por *Rondonia rondoni* puede ocasionar obstrucción intestinal en los peces estudiados (Franceschini *et al.*, 2013).

Barreto (2009), reportó la presencia de *Rondonia rondoni* en 142 individuos de “pacú” *Piaractus mesopotamicus* cultivados en un centro de investigación en Brasil, con una prevalencia de 63.38% y una intensidad media de 2589 vermes por pez. Otros autores que también han reportado dicho parásito son García *et al* (1997), quienes demostraron la prevalencia de una única especie de nemátodo *Rondonia*

rondoni, en “pacus” *Piaractus mesopotamicus* colectados de la estación de piscicultura do Cepta, Brasil. De un total de 90 peces, 64 se encontraban infectados, presentando una prevalencia de 71% y una intensidad media de 3304 parásitos por pez. La ocurrencia de este nemátodo aumentó proporcionalmente al tamaño de los peces, tratándose por lo tanto de un parásito que, por su elevada intensidad media, podría traer problemas de obstrucción intestinal al hospedero, según menciona el autor.

En una expedición realizada en los ríos del Pantanal de Mato Grosso en el Brasil, reportaron a nivel intestinal grandes cantidades de 2 nemátodos: *Rondonia rondoni*, y en menor cantidad *Spectatus spectatus*, así como la presencia del tremátodo, *Dadaytrema oxycephala*; en 34 individuos colectados de *Piaractus mesopotamicus*, donde se obtuvo una prevalencia de 94.1%. Dichos autores mencionan que los nemátodos *R. rondoni* y *S. spectatus* generalmente son encontrados en el intestino de *P. mesopotamicus* en gran número, prácticamente obstruyendo la luz del órgano (Santos *et al.*, 2003).

En el Perú, Dinis (2014) analizó 60 alevinos de “paco” *Piaractus brachypomus* colectados de cultivo semi intensivo, donde reportó la presencia de *Rondonia rondoni* con una prevalencia de 6.67% y una abundancia media de 14 individuos por pez.

De acuerdo a Travassos *et al* (1928), el nemátodo de la familia Atractidae, *Rondonia rondoni*, fue descrito en *Piaractus brachypomus* mostrando gran cantidad a nivel intestinal, así como el “pacú” *Piaractus mesopotamicus*, especie muy difundida y estudiada en el Brasil, donde puede causar serios problemas en los peces de cultivo al producir graves daños en el intestino como obstrucción de la luz intestinal afectando el desarrollo de la especie (Martins, 1998; Luque, 2004; Días *et al.*, 2004; Brasil-Sato *et al.*, 2003).

***Rondonia rondoni* Travassos, 1920**

El género *Rondonia* fue descrito de forma breve por Travassos, 1920, y *rondoni* fue indicada como su especie. Según el autor se pensaba que era un nemátodo exclusivo de peces de río brasileños, de ahí el origen de su nombre. En un trabajo posterior, Travassos, 1923, se refiere a la ocurrencia de *Rondonia rondoni* en el pez *Piaractus brachypomus*, pero la especie parece haber sido descrita por primera vez por Travassos, Artigas y Pereira (1928), quienes registran como sus hospederos a *Piaractus brachypomus*, *Myletes torquatus*, *Doras granulosus* y *Myleus* sp. en donde se localiza a nivel del tracto intestinal (Baylis, 1936).

En cuanto a la clasificación de este nemátodo, si nos basamos en su localización es un endoparásito, monoxedo y con forma de vida obligada. Asimismo, *R. rondoni* ha sido reportado en peces de diferentes ríos de Sudamérica, desde el Amazonas en el norte, hasta los ríos Iguazú y Paraná en el sur (Chemes *et al.*, 2015). Cada familia de peces dulceacuícolas tiene un conjunto de parásitos helmintos que les son propios, que se encuentran preferencialmente en peces de ciertas familias y que se dispersan y se distribuyen junto con sus hospederos (Salgado-Maldonado, 2009). Taxonómicamente, pertenece al Reino Animalia, Phylum Nematoda, Clase Secernentea, Orden Oxyuridea, Familia Atractidae y es del Género con la especie *Rondonia rondoni* (Travassos, 1920).

La gran diversidad de nemátodos es paralela a una amplia gama de formas de la cabeza de los parásitos, que facilitan la ingestión de alimentos y pueden ser indicadores útiles de los hábitos de alimentación (Wilson & Kakouli-Duarte, 2009), como es el caso de algunos nemátodos que tienen cápsula bucal pero no disponen de dientes y ejercen una acción digestiva extracorpórea por medio de secreciones faríngeas y luego ingieren el material semidigerido (Quiroz, 2005). El nemátodo *Rondonia rondoni* pertenece a la Clase Secernentea, que se caracteriza por tener

numerosas papilas caudales masculinas, la ausencia de glándulas epidérmicas y una faringe completamente desarrollada (Lee, 2002). Morfológicamente es un nemátodo de color blanco en vida, de cuerpo fusiforme muy alargado con la extremidad anterior truncada y la posterior subulada (Gallego, 1947). La cutícula forma un exoesqueleto flexible que invagina en la abertura de la boca, la vulva, la cloaca y el recto, presenta estriaciones transversales o estrías que toman muchas formas y se encuentran en todos los grupos de nemátodos (Lee, 2002). Presenta una boca rodeada por tres labios bilobulados poseyendo cada uno una papila en el ápice. El esófago está constituido por dos porciones: anterior, que es más larga y fuertemente musculosa; y la porción posterior que es más delgada y termina por un bulbo. El bulbo es piriforme y provisto de una válvula tricúspide (Baylis, 1936).

Las hembras miden de 6.5 a 7 mm de longitud con una anchura máxima de 320 micras y el macho de 6 a 6.5 mm y 300 micras de longitud y anchura, respectivamente. Asimismo, presentan cloaca, útero dirigido de atrás hacia delante, presentando en su interior un mayor número de larvas en todos los estadios evolutivos, desde huevos hasta larvas bien desarrolladas. Presenta un ovario muy corto y cónico. La abertura genital se abre a 0.67 mm de la extremidad posterior y tiene una cola aguzada terminando en punta roma (Baylis, 1936).

Los machos presentan espículas falciformes, desiguales y midiendo 0.11 mm y 0.31 mm de longitud, respectivamente. Extremidad caudal con final en espiral o en hélice y de cola subaguda. Presenta 9 pares de papilas: 6 pos anales, 1 ad anal y 2 pre anales. Cerca de la abertura anal, existen dos formaciones quitinosas, lineales y paralelas, cuyas longitudes pueden presentar ligeras variaciones (Baylis, 1936). Estas estructuras tienen una función aún desconocida y a veces se las denomina excrecencias (Lee, 2002).

El ciclo de vida de *Rondonia rondoni* no se había determinado aún hasta hace unos años atrás, sin embargo, según señala Travassos, 1920 este nemátodo tiene la particularidad de producirse el desarrollo casi completo dentro del organismo materno, del cual salen ya las larvas, aparentemente en el cuarto estadio evolutivo, apuntando la posibilidad de su liberación por rotura del cuerpo materno, siendo una especie de nemátodo vivíparo (Gonçalves, 1963). Por lo tanto, el ciclo de vida de este nemátodo sería un ciclo directo, sin necesidad de huésped intermediario.

El tracto intestinal de los peces teleósteos

El tubo digestivo o intestino, aunque funciona principalmente para adquirir nutrientes y excretar desechos, también contribuye significativamente a la inmunocompetencia de los peces. Ambas funciones, nutricionales e inmunológicas, son importantes en términos del sistema inmune de los peces. Primero, el sistema inmune de un pez seguramente se verá comprometido si no puede digerir y absorber la energía y los nutrientes esenciales (proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales) necesarios para la homeostasis básica, el mantenimiento de células inmunológicamente importantes y la síntesis de varios factores como enzimas e inmunoglobulinas. Por lo tanto, el papel del intestino en la digestión y la absorción de nutrientes es relevante para la salud de los peces (Beck & Peatman, 2015).

Por otro lado, el tracto intestinal puede ser un sitio ideal para albergar las etapas adultas de los parásitos y el sitio en donde se producen los huevos o las etapas larvianas de los parásitos. Para la mayoría, con algunas excepciones, las especies de nemátodos que habitan en el intestino se transportan a la luz intestinal y finalmente se eliminan con las heces en el ambiente externo, donde continúan su ciclo de vida después del desarrollo en huevos embrionados, que posteriormente se ingieren, o en etapas larvales infecciosas, de las cuales la larva de la tercera etapa (L3) es la más común (Perry & Wharton, 2011).

En cuanto a la estructura del intestino, es una cavidad tubular que da inicio en el píloro y termina en el ano. Es relativamente corto en especies con hábitos de alimentación carnívora y más largo en herbívoros (Zamora, 2009). Este órgano de forma sigmoidea carece de asas intestinales, la longitud puede variar desde relativamente corto y recto hasta largo con una disposición en espiral y bucles, además, se puede clasificar en intestino anterior o duodeno, intestino medio o yeyuno y finalmente intestino posterior o íleon (Zamora, 2009). Sin embargo, esta división es exclusivamente topográfica, ya que histológicamente no es posible establecer algunas diferencias claras entre las porciones intestinales (Albrecht *et al.*, 2001; Cinar & Senol, 2004; Zamora, 2009; Grosell, 2011; Mendoza *et al.*, 2013; Faccioli *et al.*, 2014).

El tubo digestivo de los peces teleósteos es de una estructura simple, cuando se compara con otras especies superiores evolutivamente (Genten *et al.*, 2009). Histológicamente, está compuesto por cuatro capas organizadas de manera concéntrica:

Túnica mucosa: Es el revestimiento del lumen del tubo y consta de un epitelio interno, una lámina propia media (tejido conectivo celular) y una muscularis mucosa externa; y por último la muscularis mucosae en la parte más externa (Genten *et al.*, 2009), sin embargo, esta porción no siempre se encuentra en algunos peces, los teleósteos que carecen de ella, poseen un estrato muscular liso subepitelial (Torres-García, 2002). Asimismo, en esta porción, las vellosidades intestinales alcanzan poco desarrollo en los peces (Torres-García, 2002).

Submucosa: Una capa de tejido conectivo con menos células, presenta vasos sanguíneos, plexos nerviosos y tejido linfático. Las glándulas submucosas suelen faltar en algunos peces (Genten *et al.*, 2009).

Túnica muscular: Una capa muscular (liso o estriado) que a menudo se divide en una capa circular interna y una capa externa longitudinal (Genten *et al.*, 2009).

Túnica serosa: La túnica serosa sólo está presente dentro de la cavidad celómica y corresponde a células mesoteliales y tejido conectivo suelto que contiene vasos sanguíneos (Grosell, 2011).

Un estudio realizado en *Piaractus brachypomus* sobre la histología del sistema digestivo, reportó que la porción medio posterior del tubo digestivo alcanza una elongación de tres veces el largo total del cuerpo del pez (Mendonza, 2013). Dicho estudio logró observar claramente las capas concéntricas características del tubo digestivo. La capa de la mucosa junto con la capa submucosa forma los pliegues mucosos longitudinales, los que se encuentran ubicados hacia la luz del intestino. En el revestimiento se van a encontrar las células mucígenas. La capa submucosa está conformada por fibras de tejido conectivo laxo y es la que les da forma a los pliegues intestinales longitudinales. La capa muscular se encuentra desarrollada, sobre todo el músculo liso longitudinal que se encuentra ubicado internamente, mientras que la capa de músculo liso, de orientación circular, se logra observar de forma delgada y en estrecha relación con la capa serosa, además se encuentra rodeada de plexos nerviosos, vasos sanguíneos y de tejido pancreático difuso, inmerso de tejido graso (Mendoza, 2013).

Indicadores de Salud

Es de conocimiento que los parásitos tienen el potencial de reducir directamente el rendimiento de sus huéspedes, en cuanto a su desarrollo, crecimiento y reproducción, a través de sus impactos directos sobre la salud de los peces (Barber,

2006). Dentro los principales indicadores de salud de los peces se encuentra el factor de condición de Fulton (K), que relaciona el peso con la longitud total de los peces (Leyton *et al.*, 2015). Los valores de estos índices pueden reflejar el crecimiento anormal relacionado con el estado nutricional (Tyler & Dunn, 1976), caracterizar necesidades nutricionales y fase de terminación de peces (Andrade *et al.*, 2014), así como analizar como las condiciones medio ambientales de los ecosistemas acuáticos pueden afectar las condiciones de los peces (Schmidt *et al.*, 1999; Cifuentes *et al.*, 2012). Igualmente, estos índices se han utilizado en la acuicultura como un indicador de bienestar general de la población de peces, porque pueden alertar anticipadamente a los piscicultores ante la aparición de enfermedades que podrían presentar altas tasas de mortalidad (Jones *et al.*, 1999).

III. HIPOTESIS

La presencia de nemátodos de *Rondonia rondoni* que infestan a la especie “paco” (*Piaractus brachypomus*) procedentes de la localidad de Iquitos, ocasionarán lesiones a nivel del tracto intestinal.

IV. OBJETIVOS

Objetivos Generales

- Caracterizar ultraestructuralmente a *Rondonia rondoni* en paco (*Piaractus brachypomus*) y evaluar a nivel histológico las principales alteraciones patológicas asociadas a la presencia de *Rondonia rondoni* en el paco.

Objetivos Específicos

- Identificar y caracterizar morfológicamente mediante microscopia electrónica de barrido a *R. rondoni*.
- Evaluar y describir las alteraciones encontradas a nivel del tracto intestinal en el paco.
- Calcular indicadores del parasitismo para *R. rondoni* (Abundancia, intensidad media y prevalencia) en peces paco de la localidad de Iquitos.
- Establecer la condición de salud de los peces por determinación del factor de condición de Fulton (K) en el paco.

V. MATERIALES Y METODO

Lugar de realización del estudio

El estudio parasitológico fue realizado en el Laboratorio de Parasitología Veterinaria y el estudio histopatológico en el Laboratorio de Histología y Patología Animal de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Obtención de muestras

La obtención de muestras se realizó el mes de julio de 2017, se colectaron 35 individuos de “paco” *Piaractus brachypomus*, con un rango de longitud media de 26 cm y un peso promedio de 388 gramos. Los peces provinieron de la cuenca del río Amazonas a 15 km de la ciudad de Iquitos con coordenadas geográficas 03° 41' 59.2'' S y 073° 11' 37.8'' W, con una altitud de 123 m.s.n.m., en el departamento de Loreto. Los peces se capturaron con redes de cortina y redes de trampa (Trampera), rápidamente fueron almacenados vivos en recipientes de plástico con un tercio de agua. Luego de ello, fueron transportados hasta el laboratorio de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, donde se les realizó las siguientes mediciones: longitud estándar (boca hasta el inicio de la aleta caudal, cm.), longitud total (boca hasta final aleta caudal, cm.) y el peso (gr.). El examen general consistió en la revisión externa de cada individuo para observar la existencia de lesiones a nivel de la piel y de las aletas (Anexo 1).

El protocolo de eutanasia se realizó bajo la metodología descrita por AVMA (2011) en su panel de eutanasia y se realizó mediante una incisión en la medula espinal, posteriormente se practicó la necropsia según las técnicas de rutina (Reimschuessel, *et al.*, 1988; Kane *et al.*, 1999) (Anexo 2,3).

Determinación del estado de salud de los peces

La condición de salud en que se encontraban los peces se determinó mediante el factor de condición de Fulton (k), el cual es expresado por la relación:

$$K = \frac{W}{l^3}$$

Donde: W = peso del pez en gramos

l = longitud del pez en centímetros

Este factor está basado en la relación hipotética de longitud/peso, conforme a la ley del cubo, donde hay un crecimiento isométrico de los individuos (Leyton *et al.*, 2015).

Análisis parasitológico

Colecta de parásitos

El procedimiento consistió en realizar un corte a la altura del abdomen para exponer los órganos internos en busca de endoparásitos. Luego se retiró el estómago y el intestino de los peces. Seguidamente se abrieron cuidadosamente ambos órganos siguiendo las recomendaciones de Jerônimo *et al* (2012).

Los endoparásitos helmintos encontrados en el tracto gastrointestinal se fijaron en alcohol al 70% para ser colocados en láminas portaobjetos y posteriormente ser observados en el Microscopio Diferencial de Contraste de Interferencia (DIC), modelo Axioplan 2 Zeiss, donde se tomaron fotografías del interior del parásito usando una computadora equipada con Axivision 4.1 image capture software (Anexo 4). Fueron anotadas las medidas y características morfológicas para posterior análisis y la identificación taxonómica.

Identificación de parásitos

Para la identificación de los parásitos helmintos se tomaron en cuenta las características taxonómicas según: Gibson *et al*, (2002); Jones *et al*, (2005); Rego *et al*, (1999); Anderson *et al*, (2009), Cavalcante, *et al*. (2016), libros sobre parásitos en peces amazónicos (Thatcher, 2006), artículos científicos con descripciones originales (Baylis, 1936; Gallego, 1947) y las recomendaciones mencionadas por Eiras *et al*, (2006) (Anexo 5).

Índices parasitarios

Los índices parasitarios de prevalencia (P), intensidad media (IM) y abundancia media (AM), fueron calculados para evaluar el nivel de infestación de parásitos según Bush *et al* (1997).

- a) Prevalencia: El número de hospederos infectados por parásitos dividido por el número de peces analizados

$$P = \frac{\text{Número de peces infectados}}{\text{Número de peces analizados}} \times 100$$

- b) Intensidad media: Número total de parásitos de una especie determinada dividido por el número de peces infectados.

$$IM = \frac{\text{Número total de peces}}{\text{Número de peces infectados}} \times 100$$

- c) Abundancia media: Número total de parásitos dividido por el número total de peces infectados o no infectados.

$$AM = \frac{\text{Número total de parásitos}}{\text{Número de peces analizados}} \times 100$$

Extracción y cuantificación de parásitos de *Rondonia rondoni*

El intestino utilizado para el análisis de los parásitos fue suspendido en solución salina (NaCl al 0.9%), en un período de tiempo no superior a 24 horas. Para el análisis cuantitativo de los nemátodos, todo el contenido intestinal fue retirado cuidadosamente en un recipiente en el cual se lavó con solución salina (NaCl al 0.9%) y pasado a través de un matraz con diferentes mallas de mayor a menor abertura para retirar la mayor cantidad de materia orgánica del contenido intestinal y facilitar el conteo de los nemátodos (Campos *et al.*, 2007). Como la gran mayoría de los intestinos colectados tenía gran cantidad de parásitos, se separaron todos los parásitos en un recipiente y se contó 100 individuos en una placa Petri aparte que fue pesada en una balanza digital. El conteo fue hecho con el peso obtenido de los

100 y el peso total de los parásitos a partir del cual se obtuvo un total estimado de parásitos por medio de una regla de tres simples para cada individuo (Barreto, 2009) (Anexo 1).

Análisis histopatológico

El examen Histológico se realizó tomando muestras de intestino anterior y posterior, estos fueron fijados en envases estériles con formaldehído al 10% para su conservación. Las muestras se procesaron según las técnicas de rutina mediante el protocolo histológico convencional para tejidos fijados, donde fueron deshidratados en una serie de concentraciones de alcohol etílico, posteriormente se incluyeron en parafina, fueron clarificados y seccionados a 5 µm de grosor. Finalmente se colorearon con hematoxilina – eosina y se examinaron en un microscopio óptico convencional para el análisis correspondiente (Anexo 1,6).

Clasificación de las lesiones histopatológicas

La evaluación de las alteraciones histopatológicas compatibles con parasitosis y los otros tipos de lesiones histopatológicas observadas fueron clasificados para cada órgano como: trastornos degenerativos, inflamatorios, de crecimiento, circulatorios, entre otros, así como la severidad que fue clasificada mediante grados, propuestos por Reimschuessel *et al* (1992).

Grado I: Escasa presencia de lesión, hasta 25% de toda la muestra.

Grado II: Leve presencia de la lesión, del 25% hasta 50% de toda la muestra.

Grado III: Moderada presencia de la lesión, del 50% hasta el 75% de toda la muestra

Grado IV: Severa presencia de la lesión, del 75% hasta el 100% de toda la muestra.

Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

Los parásitos identificados como *Rondonia rondoni* que se encontraban íntegros y en condiciones para la descripción de sus características morfológicas, fueron separados y fijados para realizar la técnica de Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) revisando la descripción de las características ultraestructurales de la superficie de los nemátodos, de acuerdo con la metodología descrita por Eisenback (1985). Los nemátodos fueron fijados en glutaraldehído al 2.5% con buffer cacodilato de sodio 0,1 M con pH: 7.2. La preparación del material para realizar la técnica se llevó a cabo deshidratando en series de etanol creciente hasta llegar al 100% y secados en punto crítico de CO², montados en stubs y finalmente metalizados en oro/paladio. La observación se realizó en la Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura. El modelo de Microscopio Electrónico de Barrido fue “Joel JMS 35” operado a 15 kV. utilizando los detectores de electrones secundarios. Las micrografías fueron realizadas con un software específico para el sistema (Anexo 1,7).

VI. RESULTADOS

Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

El análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB) permitió observar con más detalle algunas de las características de la superficie de los nemátodos de *Rondonia rondoni* que, aunque ya habían sido descritas por varios autores (Travassos, 1920; Baylis 1936; Gallego, 1947; Costa 1963; Moravec, 1992) el presente estudio muestra que algunas características morfológicas importantes eran descritas inadecuadamente o fueron pasado por alto. Presenta una cabeza redondeada, con cavidad bucal de forma triangular, rodeada por seis crestas que irradian desde el margen de la boca. En la extremidad cefálica fue posible evidenciar detalles minuciosos de los tres labios bilobulados y con presencia de cuatro papilas, una en cada porción apical de cada uno de los labios. Asimismo, *R. rondoni* presenta dos anfidios alargados laterales según mencionan los autores (Baylis 1936; Gallego, 1947), sin embargo, estas estructuras no pudieron ser observadas en la microscopia electrónica de barrido. Por último, se evidencia que *R. rondoni* no presenta dientes y su cavidad bucal es pequeña (Fig. 2).

A lo largo del nemátodo, se logra distinguir que la superficie de la cutícula presenta estrías transversales. Además, en los machos, fue posible observar la presencia de dos formaciones pares provistas de diminutas espinas ubicadas de forma paralela y lineales, que nacen por encima de la abertura cloacal y se extienden hacia adelante en una distancia de 1 mm aproximadamente (Fig. 3).

En cuanto a los órganos reproductores, el macho se caracterizó por poseer una cola con terminación espiralada. Asimismo, se observó la presencia de 9 pares de papilas anales, clasificadas según (Baylis, 1936) en 2 pares pre anales, 1 par ad anal y 6

pares post anales, todas ellas ubicadas en la región ventral y no siempre de forma continua. Además, se observó una espícula alargada y pequeña (Fig. 4D). En cuanto a la hembra, se observó la presencia de una cloaca que se caracteriza por la unión de la vulva con el ano. Asimismo, la cola es esbelta y termina en forma de punta (Fig. 5).

Finalmente, el análisis evidenció que estos nemátodos pertenecen al género *Rondonia* Travassos, 1919 y los mismos fueron identificados como *Rondonia rondoni* Travassos, 1920.

Phylum Nematoda Rudolphi, 1808

Clase Secernentea Von Linstow, 1905

Orden Spirurida Chitwood, 1933

Familia Atractidae Railliet, 1917

Genero *Rondonia* Travassos, 1919

Rondonia rondoni Travassos, 1920

Mediciones principales basadas en 15 muestras:

Los especímenes maduros se alargaron y se midieron: hembras tenían una longitud corporal de 6.8 ± 0.5 mm y 314.5 ± 14.6 micras de ancho. Los machos tenían una longitud corporal de 5 ± 0.3 mm y 300.9 ± 4.8 micras de ancho (Anexo 8).

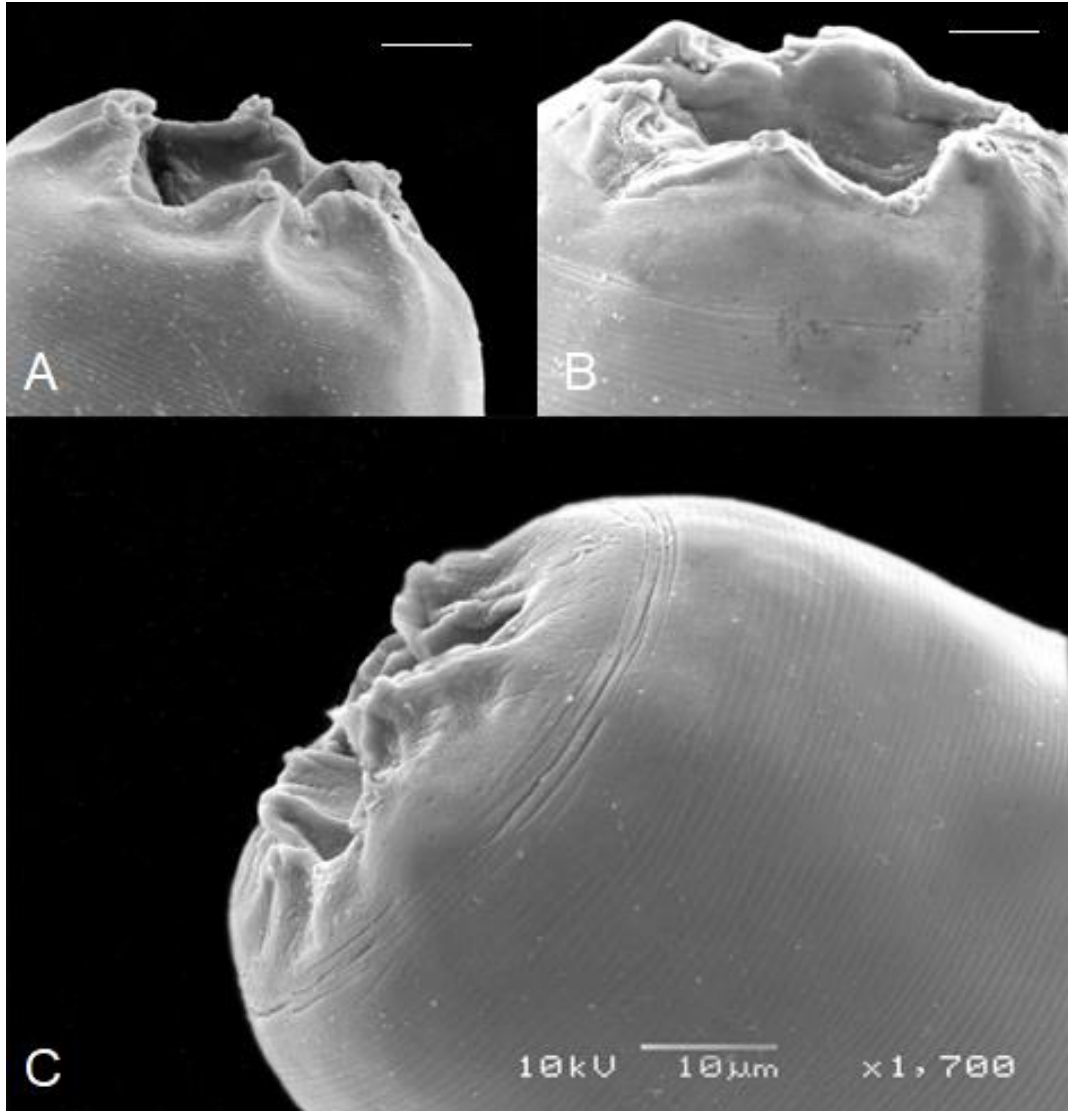


Figura 2. Microscopia Electrónica de Barrido del nemátodo *Rondonia rondoni*, colectado en el intestino de *Piaractus brachypomus* en el río Amazonas, en la localidad de Iquitos, región de Loreto, Perú, en el periodo de julio de 2017.

Figura 2 A: Visión lateral de la extremidad anterior del macho, con detalle de las cuatro papilas ubicadas en ápice de cada labio de la cavidad bucal (Barra = 10 µm).

Figura 2 B: Visión lateral de la extremidad anterior de la hembra, con una estructura similar a la del macho (Barra = 10 µm).

Figura 2 C: Visión lateral de la extremidad anterior donde se aprecian los tres labios bilobulados (Barra = 10 μ m).

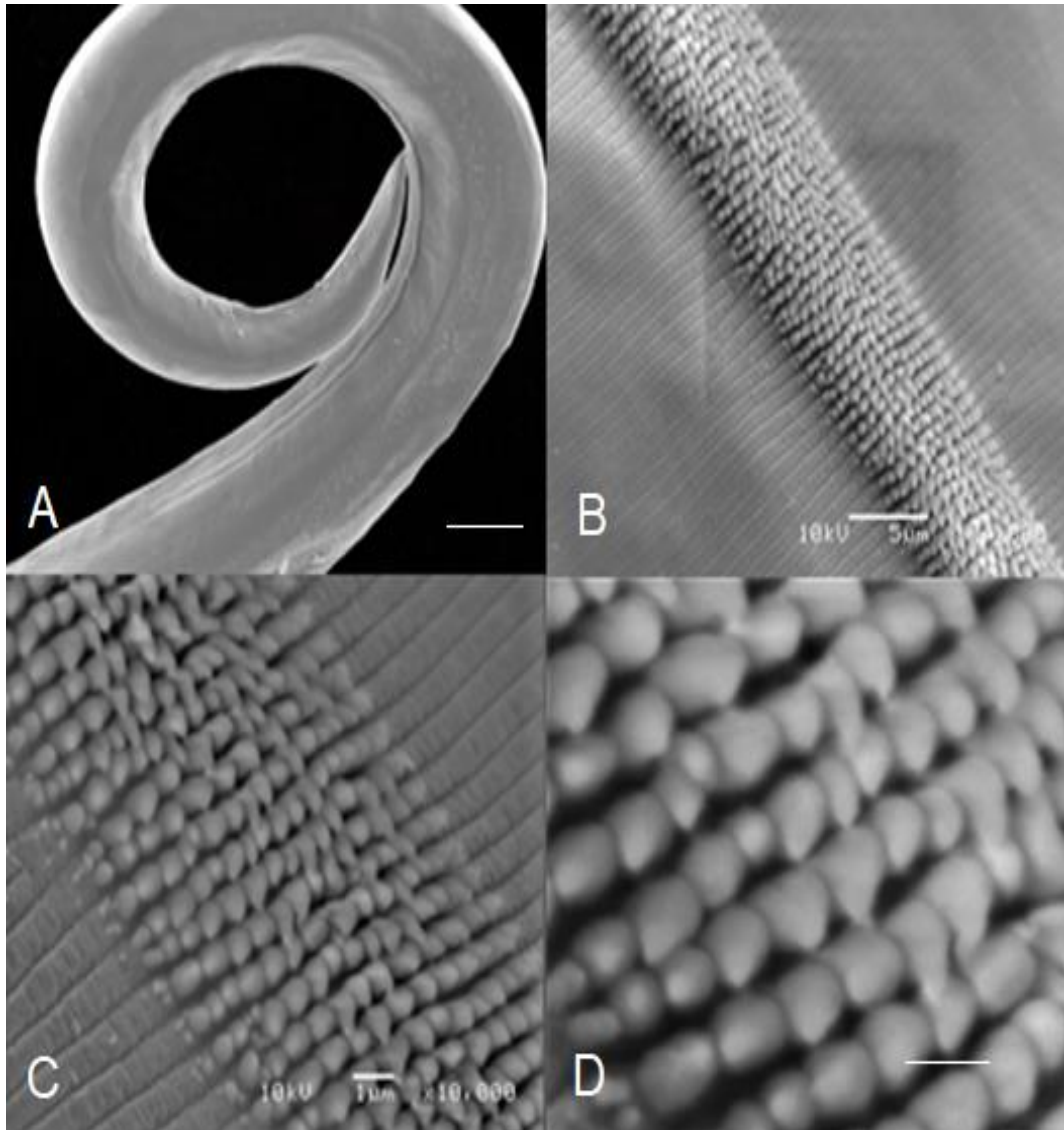


Figura 3. Microscopia Electrónica de Barrido del nemátodo *Rondonia rondoni*, colectado en el intestino de *Piaractus brachypomus* en el río Amazonas, en la localidad de Iquitos, región de Loreto, Perú, en el periodo de julio de 2017.

Figura 3 A: Visión lateral de la extremidad media del macho, se observa la presencia de estructuras cuticulares longitudinales que recorren ambos lados del nematodo, así como una cola agudamente puntiaguda (Barra = 10 μ m).

Figura 3 B, C y D: Visión lateral de la extremidad media del macho, se observa las estrías transversales circundando la cutícula (Fig. B y C). Asimismo, se logra observar con mayor aumento dichas bandas provistas por pequeñas espinas yuxtapuestas (B: Barra = 5 μm . C: Barra = 1 μm . D: Barra = 0.2 μm).

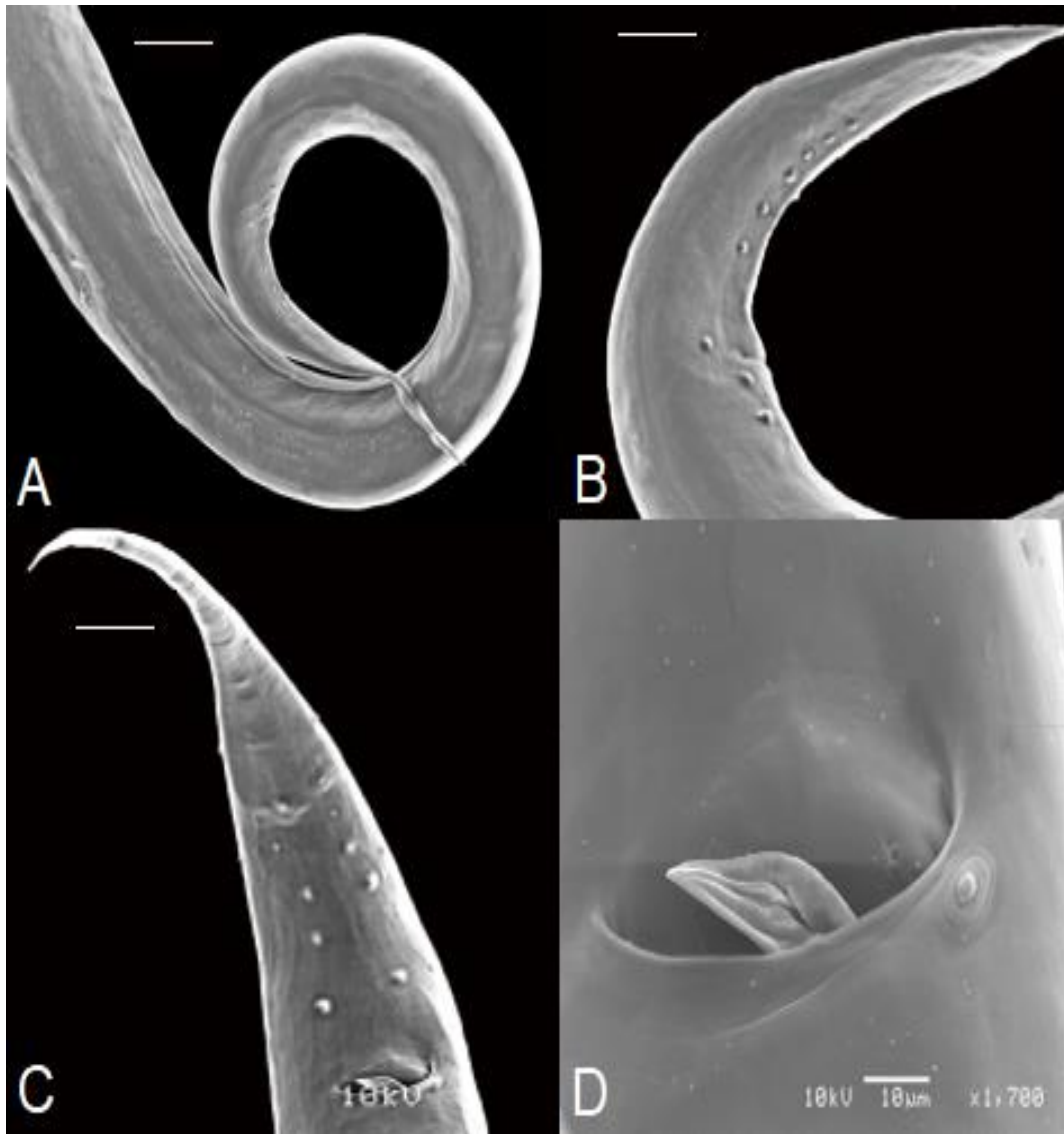


Figura 4. Microscopia Electrónica de Barrido del nemátodo *Rondonia rondoni*, colectado en el intestino de *Piaractus brachypomus* en el río Amazonas, en la localidad de Iquitos, región de Loreto, Perú, en el periodo de julio de 2017.

Figura 4 A: Visión lateral de la extremidad posterior del macho, caracterizado por terminar en forma espiralada. (Barra = 100 μm).

Figura 4 B y C: Visión lateral de la extremidad posterior del macho, donde se aprecian las papilas caudales del macho y su disposición. (B: Barra = 100 μm . C: Barra = 100 μm).

Figura 4 D: Visión lateral de la extremidad posterior del macho, Se observa el extremo distal de una espícula y una papila pre cloacal. (Barra = 10 μm).

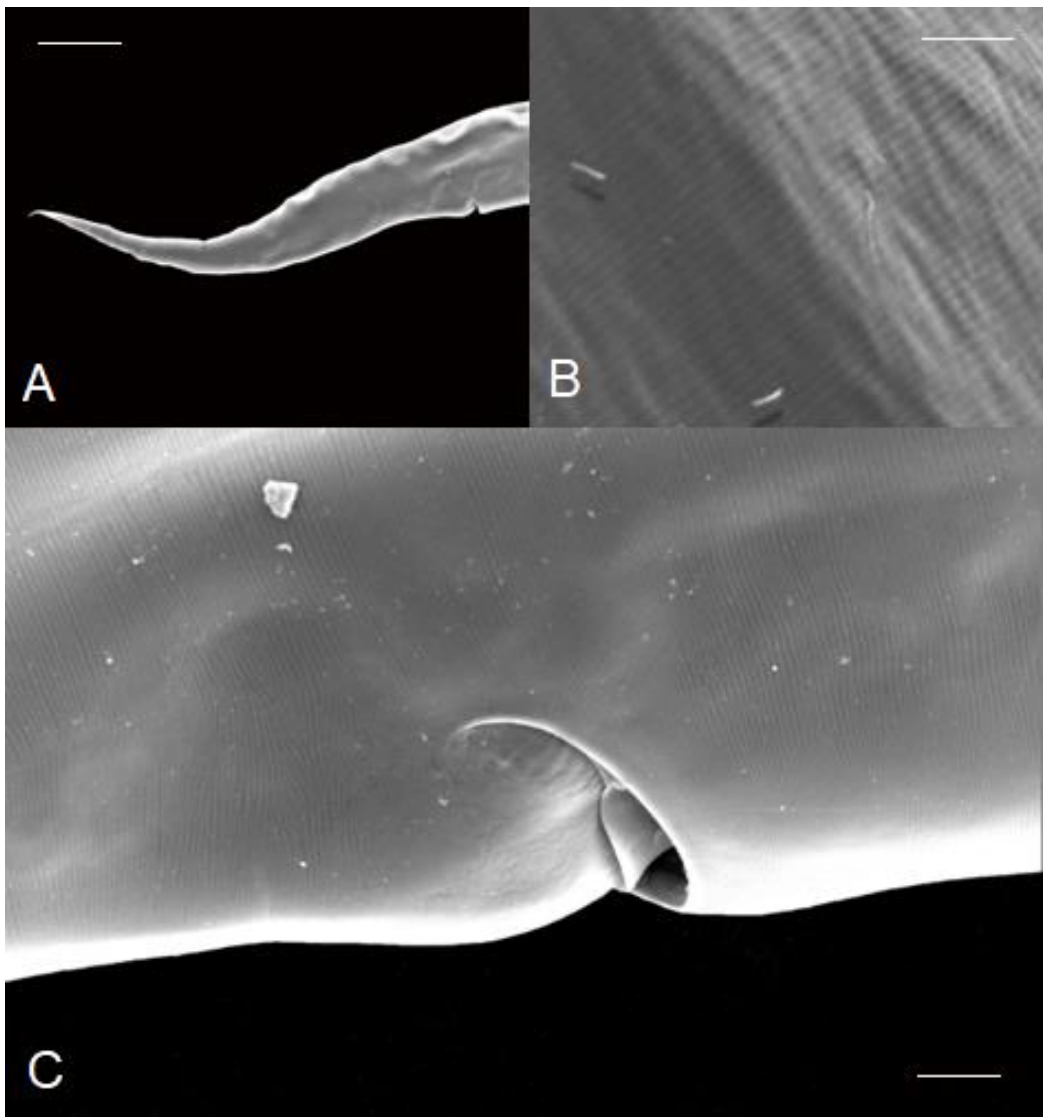


Figura 5. Microscopia Electrónica de Barrido del nemátodo *Rondonia rondoni*, colectado en el intestino de *Piaractus brachypomus* en el río Amazonas, en la localidad de Iquitos, región de Loreto, Perú, en el periodo de julio de 2017.

Figura 5 A: Visión lateral de la extremidad posterior de la hembra, caracterizado por terminar en forma puntiaguda recta (Barra = 100 μm).

Figura 5 B: Visión lateral de la extremidad media de la hembra, presenta estriaciones transversales en toda la cutícula. (B: Barra = 10 μm).

Figura 5 C: Visión lateral de la extremidad posterior de la hembra, caracterizado por presentar una cloaca. (Barra = 10 μm).

Estudio Histopatológico

Las alteraciones encontradas en el tracto intestinal se muestran en la tabla 1, las imágenes de los órganos que no presentaron parásitos se muestran en el anexo 9 y en las figuras del 6 al 15 se muestran las alteraciones descritas anteriormente. En relación con las lesiones, se evidenció en la mayoría de los casos, la presencia de células inflamatorias mononucleares en la mucosa y submucosa (29/35) junto con infiltración hacia el lumen intestinal (27/29), también se observó fusión de vellosidades intestinales (17/35) con pérdida de microvellosidades (18/35) y edema subepitelial en la mucosa (14/35). En pocos casos se observó alteraciones circulatorias como hiperemia en la mucosa (8/35) y hemorragia (1/35), además de trastornos degenerativos como granuloma (2/35), necrosis (2/35) entre otros, como la presencia de hemosiderina en la mucosa (3/35).

Tabla 1. Alteraciones histológicas en el tracto intestinal del paco (*Piaractus brachypomus*) N=35.

TIPO DE TRASTORNO	LESIONES EN EL INTESTINO	N	%
INFLAMATORIOS	Granuloma	2	5.71
	Infiltración de células inflamatorias mononucleares	27	77.14
	Presencia de linfocitos en la lámina propia	29	82.86
DEGENERATIVOS	Necrosis	2	5.71
	Edema subepitelial	14	40.00
DEL CRECIMIENTO	Pérdida de microvellosidades	18	51.43
	Fusión de vellosidades	17	48.57
CIRCULATORIO	Hiperemia	8	22.86
	Hemorragia	1	2.86
OTROS	Pigmentos de hemosiderina	3	8.57

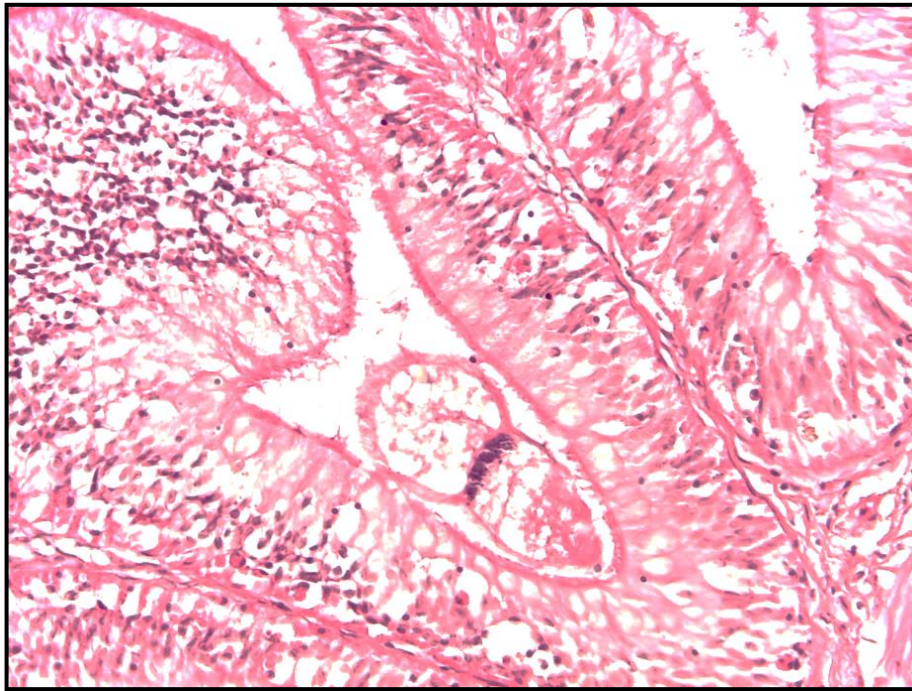


Figura 6. Presencia e infiltración de células inflamatorias mononucleares en la mucosa del intestino (exocitosis). H&E. 400X.

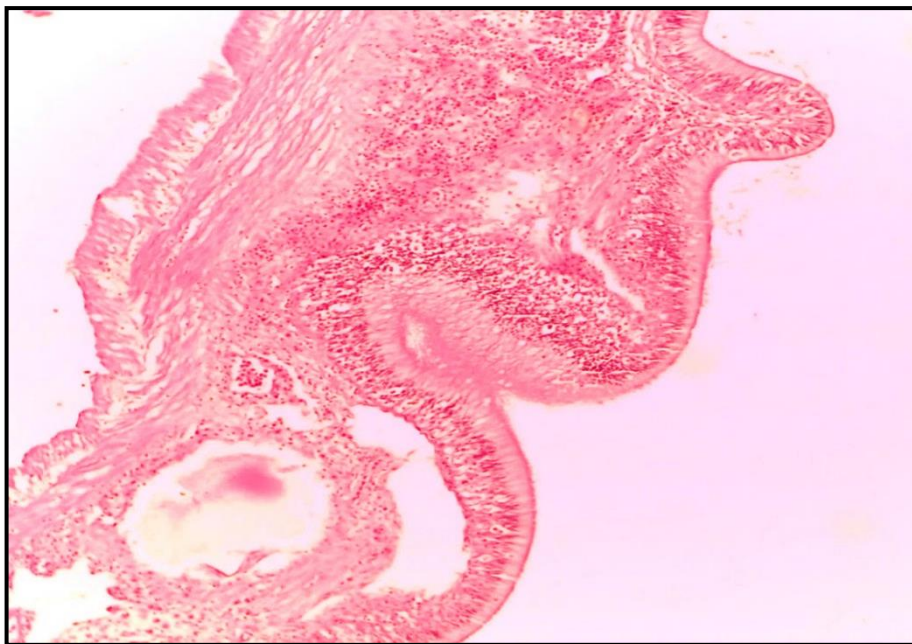


Figura 7. Presencia de células inflamatorias en la submucosa y mucosa del epitelio, edema subepitelial y fusión de vellosidades. H&E. 100X.

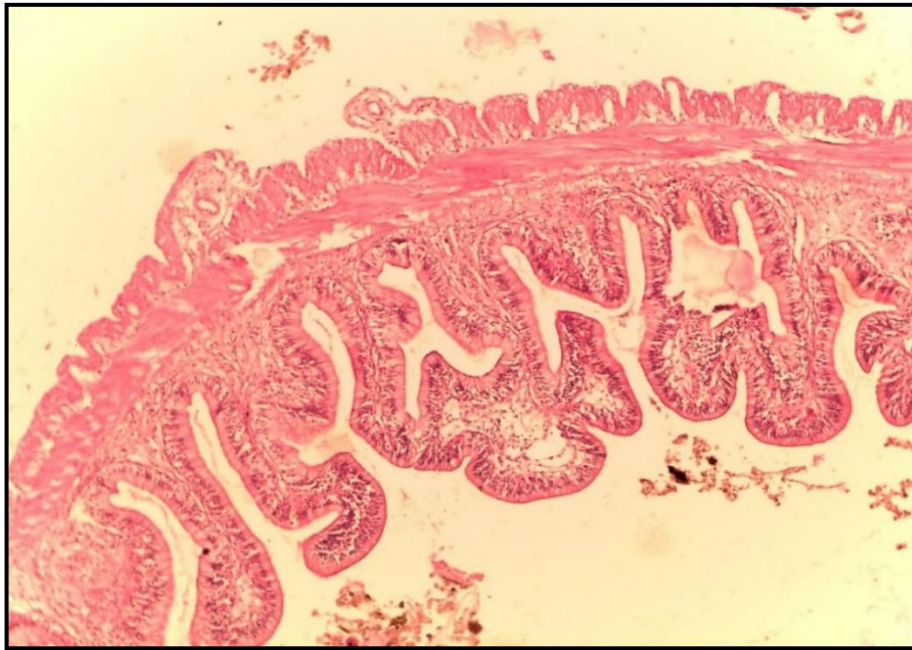


Figura 8. Presencia de células inflamatorias mononucleares en las vellosidades intestinales. H&E. 100X.



Figura 9. Fusión de vellosidades intestinales. H&E. 100X.

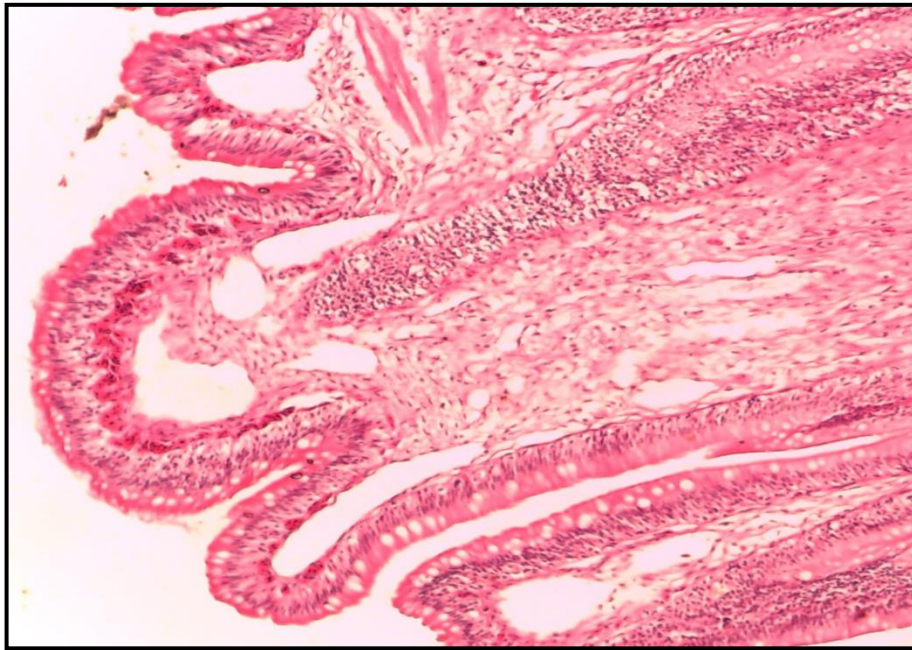


Figura 10. Fusión de vellosidades con presencia de edema subepitelial y congestión en zona basal de las células epiteliales de la mucosa. H&E. 200X.



Figura 11. Presencia de hemosiderina en el epitelio intestinal. H&E. 400X

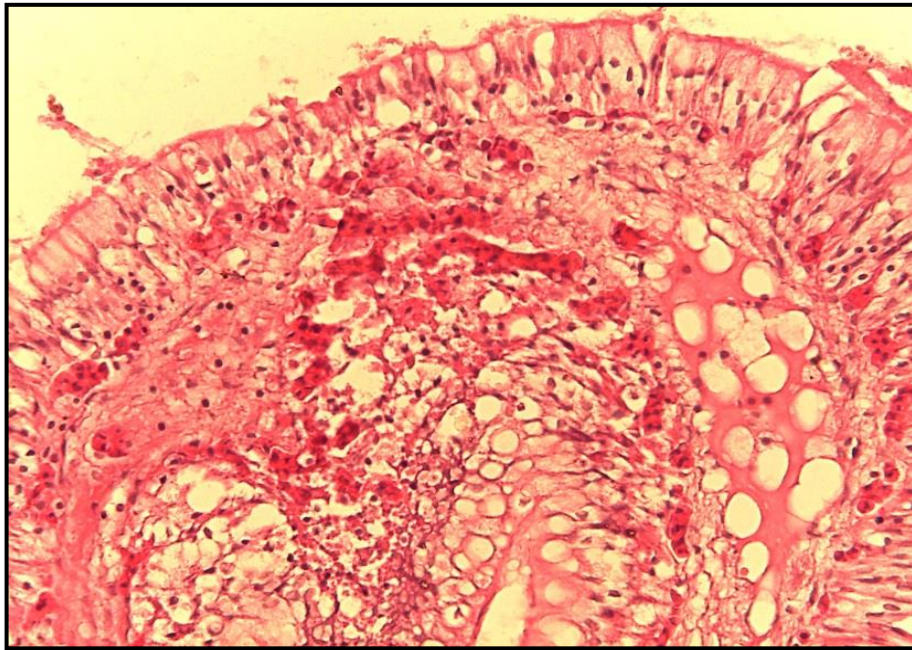


Figura 12. Presencia e infiltración de células inflamatorias mononucleares, edema subepitelial y marcada congestión en mucosa. H&E. 400X.

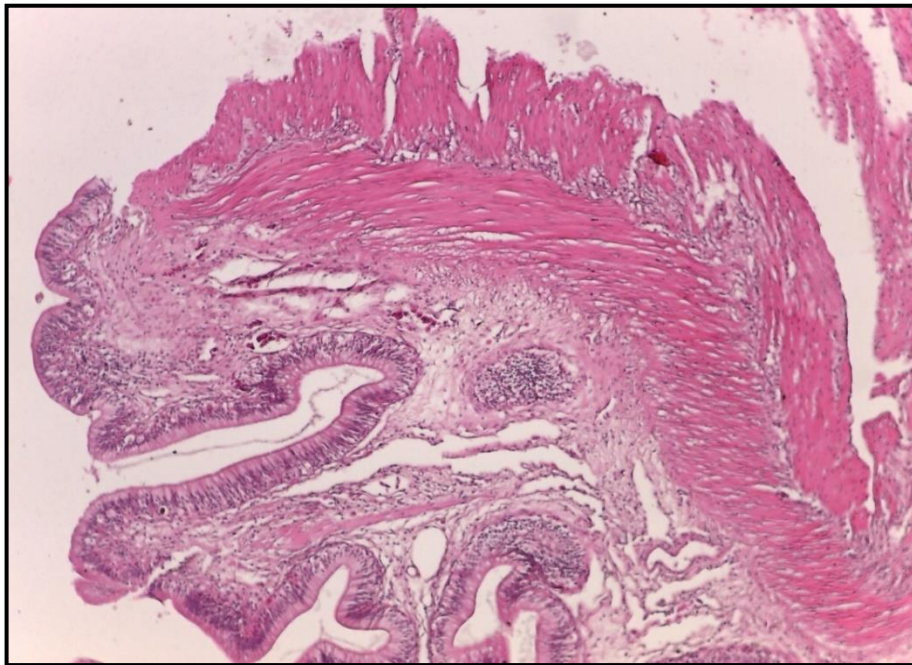


Figura 13. Presencia de células inflamatorias en el epitelio intestinal y un granuloma en lámina propia. H&E. 200X.

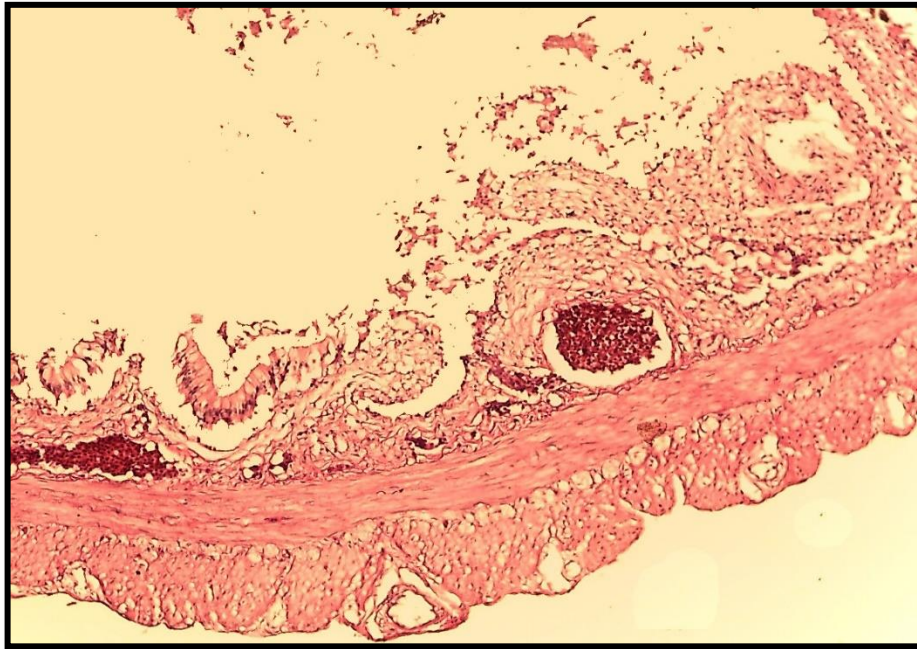


Figura 14. Presencia de células inflamatorias en el epitelio intestinal y necrosis en la mucosa. H&E. 200X.

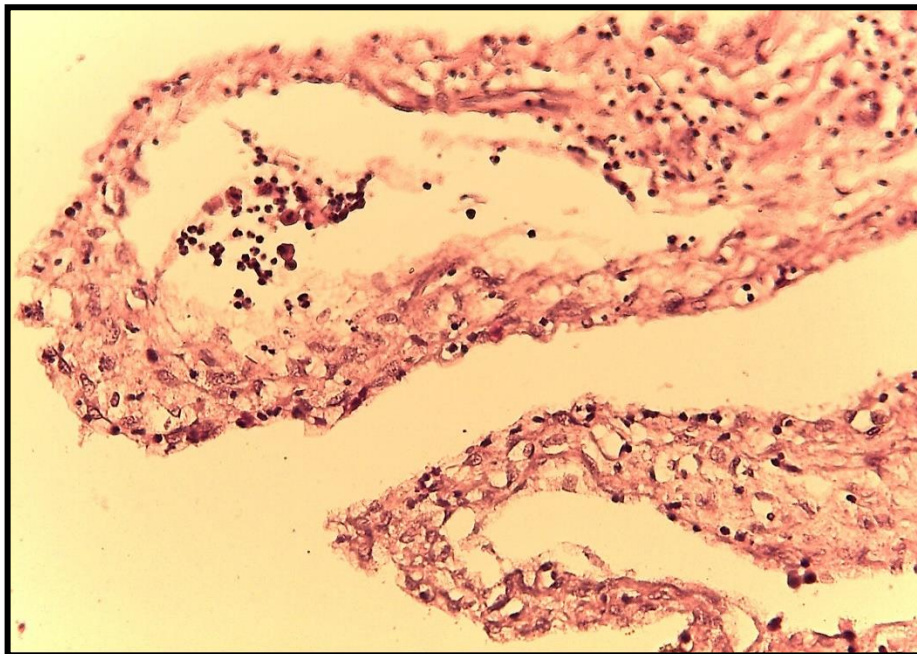


Figura 15. Necrosis de células epiteliales en intestino. H&E. 400X

Índices parasitarios

De los 35 peces paco (*Piaractus brachypomus*) analizados, fueron 30 los que se encontraban parasitados (85.7 %). Asimismo, del total de peces parasitados, 29 se encontraban infestado con *Rondonia rondoni* 96.66%, 12 se encontraban infestados con *Dadaytrema oxycephala* 40.00 % y 2 con *Procamallanus* sp. 6.66 % (anexo 10).

Tabla 2. Frecuencia de helmintos gastrointestinales en *Piaractus brachypomus* colectados en el río Amazonas, Perú.

Parásitos	N°	%
Nemátodos		
<i>Rondonia rondoni</i>	29	96.66%
<i>Procamallanus</i> sp.	2	6.66%
Tremátodos		
<i>Dadaytrema oxycephala</i>	12	40.00%

Para los 35 peces analizados de *Piaractus brachypomus*, fueron 29 los que se encontraron parasitados por *Rondonia rondoni* observándose un elevado porcentaje de parasitismo (82.9%), siendo, por medio de la colecta de parásitos directamente del tracto intestinal, obtenida una amplitud de 85 a 6403 parásitos por pez.

Tabla 3. Prevalencia, intensidad media y amplitud de *Rondonia rondoni* para 35 individuos de *Piaractus brachypomus* colectados en el río Amazonas, Perú.

Especie de parásito	Prevalencia	Intensidad media	Amplitud
<i>Rondonia rondoni</i>	82.90%	4467.5	85 - 6403

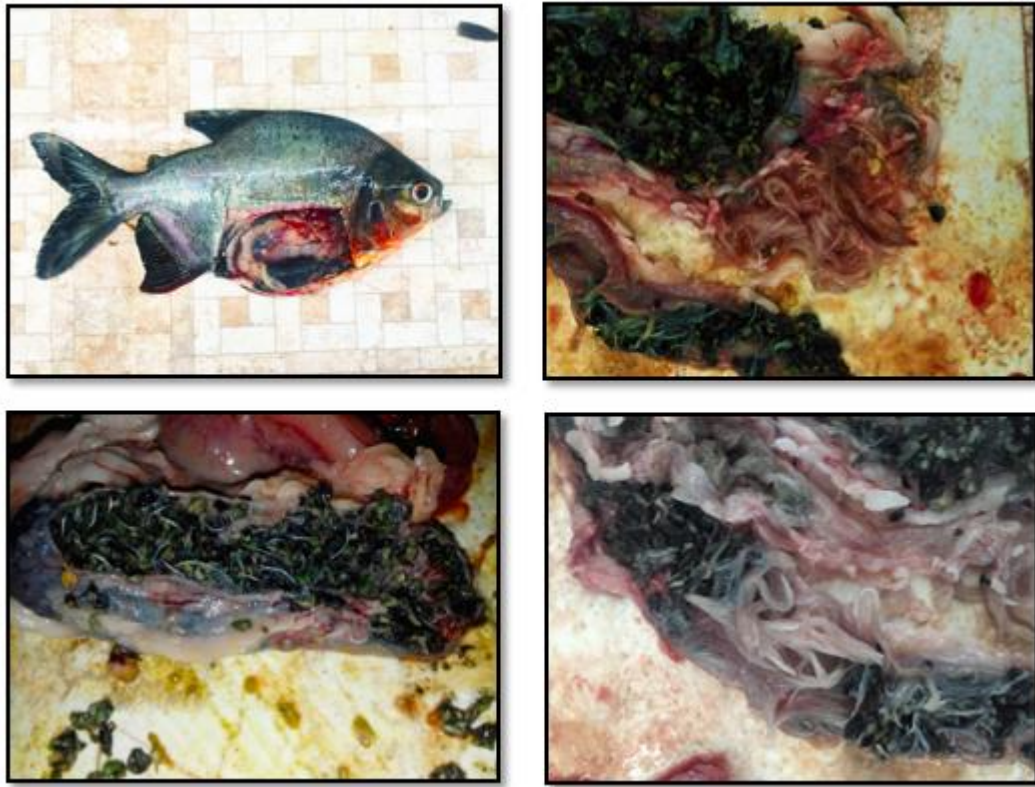


Figura 16. A. Análisis en fresco del tracto intestinal del paco (*Piaractus brachypomus*). A, B y C. Presencia de *Rondonia rondoni* a lo largo del intestino.

Estado de Salud de los peces

En lo que se refiere a la salud de los peces, se midió a través de la fórmula de factor de condición de Fulton (K) en donde no se observa diferencias significativas en los 35 peces analizados de *Piaractus brachypomus* con una amplitud de (K) de 1.49 hasta los 2.20.

Tabla 4. Factor de condición de Fulton en *Piaractus brachypomus* colectados en el río Amazonas, Perú.

Especie	Peso medio	Longitud medio	(K)	Amplitud (K)
<i>Piaractus brachypomus</i>	387.6	26.4	2.1	1.49 - 2.20

VII. DISCUSION

El presente estudio pretende caracterizar a la especie *Rondonia rondoni* para diagnosticar y comprender la relación que lleva con su hospedero, asimismo analizar si produce alteraciones histológicas a nivel del tracto intestinal en donde se aloja en la especie *Piaractus brachypomus*, quien vive en las cuencas del río Amazonas y es capturado por acuicultores para luego ser llevados a estanques para su crianza. Este estudio nos da un panorama sobre si produce algún daño que repercuta en la salud de los peces que son infestados por dicho parásito y que a futuro pueda afectar su cultivo, generando un impacto negativo en la acuicultura amazónica.

En relación con la morfológica de *Rondonia Rondoni*, datos obtenidos con el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), descritos en el presente estudio, coinciden con los detalles morfológicos expuestos en la literatura por Baylis (1936), Gallego (1947) y Gonçalves (1963). Así también resaltamos, de lo observado en la microscopia, que *Rondonia rondoni* tiene una cavidad bucal pequeña y con ausencia de dientes, lo que nos indica que esta especie de nemátodo podría llevar una digestión extracorpórea, alimentándose de material semidigerido con la acción de enzimas histolíticas producidas por las glándulas esofágicas dorsales y subventrales asociadas con el sistema excretor (Quiroz, 2005), de esta manera, se explica porque *R. rondoni* es un nemátodo que no se adhiere a la cavidad intestinal. Asimismo, se observó que el parásito presenta estriaciones en la cutícula lo que es habitual en parásitos de la familia Atractidae (Gallego, 1947). En consecuencia, cuando los parásitos se desplazan entre las vellosidades intestinales, los bordes de la cutícula pueden lesionar a la mucosa intestinal (Quiroz, 2005), siendo quizás, una causa que explicaría la presencia de algunas lesiones observadas en este estudio. Asimismo, otra causa que explicaría la presencia de lesiones en el intestino sería la presencia de unas pequeñas estructuras espinosas que forman parte de la cutícula

de los machos, las que también podrían causar daño en la mucosa intestinal por ser de conformación quitinosa, según mencionan los autores (Baylis, 1936; Gallego, 1947, Moravec, 1992).

En el estudio histopatológico se presentaron en la mucosa intestinal trastornos como la presencia de células inflamatorias mononucleares en la mucosa y submucosa (29/35) junto con infiltración hacia el lumen intestinal (27/29), también se observó fusión de vellosidades intestinales (17/35) con pérdida de microvellosidades (18/35). Tales trastornos en el tracto intestinal se asemejan a los que hace referencia Perry & Wharton (2011) quienes mencionan que en la mayoría de los sistemas gastrointestinales con presencia de parásitos, se ha observado una consistente resistencia que desencadena múltiples respuestas efectoras potenciales, que incluyen eosinofilia, mastocitosis intestinales, hiperplasia de células caliciformes intestinales, producción de mucina y alteraciones en el epitelio intestinal, como el aumento del recambio celular epitelial intestinal, etc, lo que podría conducir a una mala absorción intestinal, acompañado de déficit nutricional, comprometiendo así el desarrollo y el sistema inmune de los peces (Beck & Peatman, 2015). Es muy claro a partir de numerosos estudios de campo y experimentales que los nemátodos que habitan en el sistema gastrointestinal son reconocidos por estimular la respuesta inmune del huésped. También es muy claro, particularmente en los sistemas de modelos experimentales, que la inmunidad puede ser eficaz en la protección del huésped, lo que resulta en la expulsión de parásitos del intestino (Perry & Wharton, 2011). De hecho, la observación de alteraciones a nivel de la mucosa intestinal en el *Piaractus brachypomus* podría evidenciar una señal de que existe lesiones patológicas asociadas a la presencia de *Rondonia rondoni* en el intestino como respuesta del huésped a la expulsión del parásito del tracto intestinal. Sin embargo, aún se desconoce los mecanismos de evasión del sistema inmune que tienen los nemátodos para contrarrestar la eficacia del sistema de defensa del huésped (Perry y Wharton, 2011).

Por otro lado, del total de muestras observadas, las capas que se vieron más involucradas por el proceso inflamatorio fueron la mucosa y la submucosa del intestino. La razón puede estar relacionada a que *Rondonia rondoni* a través de sus movimientos en el lumen intestinal, puede dañar las capas más superficiales del órgano intestinal gracias a que tienen espinas en la cutícula que están conformadas por quitina y la presencia de estriaciones en la cutícula con elevaciones irregulares, las que han podido ocasionar hiperemia (22.86%) y hemorragia (2.86%) a nivel intestinal tal como fue observado en algunos individuos del presente estudio. Específicamente, *Rondonia rondoni* fue hallado únicamente en el tracto intestinal, ocasionando en la mayoría de los casos la obstrucción del lumen intestinal. De igual manera, estudios en peces amazónicos tales como *Piaractus mesopotamicus* y *Piaractus brachypomus* procedentes del medio natural reportaron como lugar de infección el tracto intestinal llegando incluso a ocasionar obstrucción de la luz intestinal (Franceschini *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2003; Campos, 2009). De esta manera, además de poder ocasionar algún daño en el órgano en donde se alojan, también puede afectar en la digestión de los alimentos en los peces.

En consecuencia, Berland (1989) reportó que otra respuesta que tiene el huésped ante la presencia de parásitos en el tejido está caracterizada por la proliferación de fibroblastos, los que generan una capsula de tejido conectivo fibroso y vascular que envuelve al parásito. Esto podría corresponder a la presencia de dos granulomas (5.71%) observados en el presente estudio a nivel de la mucosa intestinal, sin embargo, un detalle que es cuestionable sería la ausencia de un parásito en el interior de la capsula, ya que *Rondonia rondoni* al no tener dientes en su cavidad bucal, no se adhiere a la pared intestinal por lo que solo se mantiene en el lumen intestinal, lo que podría llevarnos a la deducción de que se trataría de algún agente de origen bacteriano. La presencia de necrosis se observó en dos individuos con bajo porcentaje (5.71%) y es tal vez el resultado de una cronicidad en la infestación o que podría estar asociado al ingreso de otros agentes patógenos. Todas estas lesiones observadas se encuentran asociadas a la presencia de *Rondonia Rondoni*, sin embargo, es posible que algunas de las lesiones observadas sean generadas por

otros agentes patógenos como la presencia de parásitos del tipo protozoo que pueden estar alojados a nivel del sistema gastrointestinal y que precisan de otros métodos de identificación, o bien agentes de origen bacteriano en la cutícula de los parásitos, las cuales en este estudio no fueron determinadas.

Del total de 30 especímenes parasitados, 29 presentaron *Rondonia rondoni* (82.9%). Estudios realizados por Campos (2009), en *Piaractus mesopotamicus*, distribuido en los ríos Miranda y Aquidahuana en Brasil, reportaron en el tracto intestinal el nemátodo *Rondonia rondoni* con altas prevalencias (73.97%) tal como se reporta en el presente trabajo. Asimismo, *Rondonia rondoni* fue hallado en grandes cantidades a nivel del tracto intestinal tal como lo menciona Barreto (2009), quien reportó la presencia de *Rondonia rondoni* en 142 individuos de “pacú” *Piaractus mesopotamicus* cultivados en un centro de investigación en Brasil, con una intensidad media de 2589 vermes por pez. Por lo tanto, dichos resultados se asemejan al presente estudio por la alta densidad como la alta prevalencia y dado que el ciclo de vida de esta especie se realiza con mucha rapidez, es de ciclo directo, es vivíparo y además tienen una capacidad de autoinfección (Thatcher, 2006; Travassos, 1920), podría explicar la alta densidad y prevalencia de parásitos en el tracto intestinal y su amplia distribución en el área de estudio.

Asimismo, la alta frecuencia de helmintos gastrointestinales está relacionada al hábitat natural en donde vive *Piaractus brachypomus*, ya que existe gran variedad de peces y riqueza de invertebrados que sirven de hospederos intermediarios y hace que se extiendan con facilidad parásitos con ciclos de vida directo e indirecto, por tal razón, habrá más cantidad de parásitos en peces silvestres con respecto a peces de cultivo (Illán, 2012). Sin embargo, *Rondonia rondoni* siendo un nemátodo de ciclo directo, no necesita la presencia de invertebrados intermediarios por lo que también podría ser abundante tanto en medio natural como en sistemas de cultivo extensivo e intensivo. Por otro parte, otro factor que puede influir en la presencia de grandes cantidades de parásitos puede ser debido al estrés causado por

condiciones ambientales tales como aguas poco profundas, alta densidad de peces en un área y con un bajo flujo de agua (Bauer, 1961), que suponen las condiciones más idóneas para el desarrollo y transmisión de parásitos, propagándose rápidamente.

Estudios previos demuestran que los nemátodos por lo general son un grupo diverso y que por su grado de especificidad hospedatoria se considera generalista, en comparación con otros grupos de parásitos como los monogeneos que son los más especialistas de todos los helmintos (Salgado-Maldonado, 2009). En ese sentido, considerando dichos estudios, *Rondonia rondoni* no tiene especificidad para parasitar a un solo huésped y también logra parasitar a otras especies de carácidos amazónicos tales como *Pterodoras granulosus*, *Pimelodus clarias*, *Myleus torquatus*, *Piaractus mesopotamicus*, así como *Piaractus brachypomus*, según lo reportado por Thatcher (2006), lo que sugiere una amplia distribución geográfica del parásito.

Adicionalmente, los peces muestreados presentaron otros helmintos como *Dadaytrema oxycephala*, perteneciente a la Clase Trematoda (28.60%) y *Procamallanus* sp., perteneciente a la Clase Secernentea (5.70%), pero pese a tratarse del mismo hospedero no se hallaron con una prevalencia similar, incluso ambos se ubicaron a nivel del tracto intestinal, pero con predilección por los ciegos pilóricos en donde se les halló en mayor cantidad. Thatcher (2006), señala que dichos parásitos son comunes en *Piaractus brachypomus* a nivel del tracto gastrointestinal. Otra diferencia encontrada en la fauna parasitaria del *Piaractus brachypomus* durante el tiempo de estudio fue la ausencia de otros parásitos como el nemátodo *Spectatus spectatus* o el Acantocéfalo *Metechinorhynchus jucundus* reportados por otros autores (Oliveira & Tavares, 2016; Thatcher, 2006). La ausencia se podría explicar principalmente por el periodo en el que se desarrolló el estudio y la diferencia en la localización de los peces.

En cuanto al estado de salud de los peces, Andrade *et al* (2014) han reportado un promedio de Índice de Fulton de 2.10 en rangos de peso 317.67 a 874.07 como indicativo de buena salud, ya que los peces seleccionados para el estudio fueron criados y alimentados a diario. Esos datos se asemejan al resultado del presente estudio e indican para el hábitat en donde vive *P. brachypomus*, condiciones de oferta alimenticia variada y suficiente para mantener en buen estado nutricional a los peces estudiados y en ese sentido, se puede considerar que los *Piaractus brachypomus* capturados en el río Amazonas sorprendentemente gozaban de buen estado de salud (promedio de índice de Fulton de 2.10) a pesar de encontrarse con grandes cantidades de *Rondonia rondoni*, Schimidt *et al* (1999) además considera que un pez con buen estado de salud posee un índice de condición corporal igual o superior a 1. Estos resultados están de acuerdo con otros autores que no informaron cambios patológicos en los peces infectados por *R. rondoni* (Martins, 1998; Luque, 2004; Barreto, 2009; Campos *et al.*, 2009).

Desde el punto de vista patológico, Illán (2012) menciona que existen parásitos que cuando están presentes en grandes cantidades son la causa directa de la muerte de los peces, llegando a afectar a su metabolismo o resistiendo a algunos parámetros de calidad del agua a través del daño que realizan en los órganos internos. Sin embargo, a pesar de que se logró encontrar grandes cantidades de *Rondonia rondoni*, llegando a alcanzar hasta 6403 nemátodos por pez, en nuestro estudio los peces infestados con dicho nemátodo no presentaron signos clínicos de enfermedad ni baja condición corporal, a pesar de que típicamente se produce una pérdida de la producción cuando la carga del parásito se encuentra aumentada (Wilson & Kakouli-Duarte, 2009). Esto podría deberse al hecho de que las extensiones de las lesiones encontradas en el tejido intestinal fueron leves a moderadas y no fueron suficientes para causar las manifestaciones de una enfermedad o se mantuvo un equilibrio en la relación hospedero/parásito.

VIII. CONCLUSION Y RECOMENDACIONES

El estudio parasitológico e histopatológico realizado en paco (*Piaractus brachypomus*) concluye lo siguiente:

- La especie *Piaractus brachypomus* además de presentar *Rondonia rondoni* pueden ser afectados por más de un género de helmintos, identificándose según su morfología a *Procamallanus* sp. y *Dadaytrema oxycephala*.
- A nivel ultraestructural, se observó que *R. rondoni* presentaba en la cutícula, estrías transversales con elevaciones pronunciadas y espinas que pueden ocasionar lesiones en la mucosa a través del movimiento en el interior del intestino.
- También se observó que *R. rondoni* según la morfología de su cavidad bucal, realiza una digestión extracorpórea a través de sus fluidos faríngeos los que podría causar daños a nivel de la mucosa intestinal.
- Se evidenciaron lesiones a nivel del intestino, entre las que destacan la presencia de células inflamatorias mononucleares en la mucosa y submucosa junto con infiltración hacia el lumen intestinal, también se observó fusión de vellosidades intestinales con pérdida de microvellosidades y edema subepitelial en la mucosa. Tales lesiones sugieren que pueden estar asociadas a la presencia de *Rondonia rondoni*.
- Sin embargo, se obtuvo un Factor (K) promedio de 2.1% lo que indica que los peces se encontraban en buen estado de salud. Por lo que se considera que la relación hospedero/parasito se trató de mantenerse en equilibrio.

- La investigación presentada demuestra que *R. rondoni* no causa mortalidad, sin embargo, se recomienda:
- Realizar un método para prevenir las infestaciones de parásitos en los estanques por parte del acuicultor.
- Asimismo, se recomienda realizar el estudio en otra época del año donde es necesario establecer el patrón de infección de estos nemátodos ante los cambios estacionales que representan un factor que puede influir en el éxito de un parásito para infectar a su hospedero.
- Finalmente, se recomienda realizar un estudio inmunológico para determinar cómo estos nemátodos logran eludir el sistema inmune de su huésped y así poder sobrevivir en el interior del intestino de los peces.

IX. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Albrecht MP, Ferreira MF, Caramaschi EP. 2001. Anatomical features and histology of the digestive tract of two related neotropical omnivorous fishes (Characiformes; Anostomidae). *J. Fish Biol.* (58) 419–430.
2. Alcántara-Bocanegra F, Verdi-Olivares L, Murrieta-Morey G, Rodríguez-Chu L, Chu-Koo F, Del Águila-Pizarro M. 2015. Parasites from fingerlings of gamitana (*Colossoma macropomum*) and paco (*Piaractus brachypomus*) cultivated in the C.I. Quistococha, Loreto, Peru. *Cienc. Amaz.* 5(1): 42-49.
3. Aliaga C. 2004. Variabilidad genética de *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachypomus* en la región del Alto Madera (Amazonía Boliviana) para el análisis del polimorfismo de la longitud de secuencias intrónicas (EPIC-PCR) [Tesis]. La Paz: Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Puras y Naturales.
4. Anderson RC, Chabaud AG, Willmott S. 2009. Keys to the nematode parasites of vertebrates. Wallingford: CABI International.
5. Andrade FT, Abreu MT, Lopes JB, Figueiredo AV, Araripe BA, Ferreira HC. 2014. Ichthyometry and electrical bioimpedance analysis to estimate the body composition of tambatinga. *Ac. Amaz.* 44(2): 279 – 286.
6. AVMA Guidelines on euthanasia. American Veterinary Medical Association; 2011.
7. Barber I. 2007. Parasites, behaviour and welfare in fish. *Appl Anim. Behav. Scie.* (104): 251–264.
8. Barreto E. 2009. Relação entre helmintos gastrointestinais ambiente e alimentação de pacos (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1987) em tanques de piscicultura. Tesis de Maestría en Parasitología por la Universidad Estadual de Campinas. Sao Paulo. Brasil.

9. Bauer ON. 1961. Relationships between host fishes and their parasites. En: Dogiel VA, Petrushevski GK, Polyanski YuI (eds). Parasitology of Fishes. Oliver and Boyd Ltd., London.
10. Baylis HA. 1936. LXIII. —The Nematode genus *Rondonia* Travassos. Annals and Magazine of Natural History: Series 10, 17:102, 606-610.
11. Beck BH, Peatman E. 2015. Mucosal Health in aquaculture. Elsevier USA.
12. Bello A, Gil R. 1992. Evaluación y aprovechamiento de la cachama (*Colossoma macropomum*) cultivada como fuente de alimento. Documento de campo No. 2. Proyecto Aquila II. Gcp/rla/102 ita. FAO, México. [internet]. [Acceso 5 junio 2016]. Disponible en <http://www.fao.org/3/contents/508693df-b677-580a-9aab6680583414/AB494S00.htm>
13. Berland B. 1989. Identification of larval nematodes from fish. In: Moller, H. editor: Nematode problems in North Atlantic fish. Report from a workshop in Kiel. 3-4 April 1989. Int Counc Explor Sea C. M. Norway.6:16-22.
14. Brasil-Sato M, Dos Santo M. 2003. Helmintos de *Myleus micans* (Lütken, 1875) (Characiformes: Serrasalminae) do rio São Francisco, Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 12(3): 131-134.
15. Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al* revisited. J. Parasitol. 83(4): 575-583.
16. Cavalcante HO, Silva MT, Santos GN, Chagas-Mautinho VA, Santos CP. 2016. *Orientattractis moraveci* n. sp. and *Rondonia rondoni* Travassos, 1920 (Nematoda: Atractidae) parasites of *Pimelodus blochii* (Osteichthyes, Pimelodidae) from the Acre and Xapuri Rivers, Western Amazon, Brasil. Rev. Parasitol. (2):226-236.
17. Campos CM, Moraes FR, Pereira GT. 2007. Método estimativo para amostragem quantitativa de *Rondonia rondoni* (Nematoda: Atractidae) parasito de peixes. Rev. Bras. Parasitol. 16 (3): 174-176.

18. Campos CM, Takemoto RM, Fonseca VE, Moraes FR. 2009. Ecology of the parasitic endohelminth community of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Characiformes) from Aquidauana and Miranda Rivers, Pantanal, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Braz J Biol.* 69 (1): 87-91.
19. Gonçalves, SC. 1963. *Rondonia rondoni* Travassos, 1920 (Nematoda, Atractidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 61(1): 75-88.
20. Chemes SB, Gervasoni SH, Virasoro C. 2015. Aportes a la distribución Geográfica de *Rondonia rondoni* Travassos, 1920 (Ascaridida, atractidae), parásito de *Pterodoras granulosus* (Siluriformes, doradidae), en el sistema Paraná Medio (Santa Fe, Argentina). *Natur Neotrop.* 2 (46): 28-32.
21. Chemes SB, Gervasoni SH, Virasoro C. 2015. Aportes a la distribución geográfica de *Rondonia rondoni* Travassos, 1920 (Ascaridida, Atractidae), parásito de *Pterodoras granulosus* (Siluriformes, Doradidae), en el sistema Paraná Medio (Santa Fe, Argentina). *Rev. Natur. Neotrop.* 46 (2): 27-32.
22. Cifuentes R, González J, Montoya G, Jara A, Ortíz N, Piedra P, Habit E. 2012. Weight-length relationships and condition factor of native fish from San Pedro River (Valdivia River basin, Chile). *Gayana Especial.* 101-110.
23. Cinar K, Senol N. 2006. Histological and Histochemical Characterization of the Mucosa of the Digestive Tract in Flower Fish (*Pseudophoxinus antalyae*). *Anat. Histol. Embryol.* (35)147–151.
24. Conte FS. 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science* (86) 205–223.
25. Costa, SC. 1963. *Rondonia rondoni* Travassos, 1920 (Nematoda: Atractidae). *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* (61) 75–88.
26. Costamagna RS. 1996. Processing *Trichomonas vaginalis* for Scanning Electron Microscopy. *Microsc Res Techn.* 35:357-358.

27. Daniel W. 1996. Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud. 3a ed. México: Limusa. 875p.
28. Dias PG, Furuya WM, Pavanelli GC, Machado MH, Takemoto RM. 2004. Carga parasitária de *Rondonia rondoni*, Travassos, 1920 (Nematoda, Atractidae) e fator de condição do armado, *Pterodoras granulosus*, Valenciennes, 1833 (Pisces, Doradidae). Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá, 26(2): 151-156.
29. Díaz F, López R. 1993. El cultivo de la “cachama blanca” (*Piaractus brachypomus*) y de la “cachama negra” (*Colossoma macropomum*). Fundamentos de Acuicultura Continental. Ministerio de Agricultura, Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INPA). Bogotá, Colombia. 207-219.
30. Dinis N. 2014. Índices parasitarios en larvas, post larvas y alevinos de *Piaractus brachypomus* “paco” en relación a los factores ambientales, en el centro de investigaciones Quistococha del Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana, Iquitos – Perú. Tesis de Magister en Ciencias. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. 52 p.
31. Eiras JC, Takemoto RM, Pavanelli GC. 2006. Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes. 2nd ed. Maringá. Eduem. 171p.
32. Eisenback JD. 1985. Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. In: Barker, KR, Carter CC, Sasser JN. (Eds). An advanced treatise on Meloidogyne. USA, Department of Plant Pathology, North Carolina State University. (2): 75-105.
33. Faccioli CK, Chedid RA, Do Amaral AC, Franceschini BV, Vicentini CA. 2014. Morphology and histochemistry of the digestive tract in carnivorous fresh water *Hemisorubim platyrhynchos* (Siluriformes: Pimelodidae). J. Micron. (64): 10-19p.
34. FONDEPES. 2004. Manual de Cultivo de Gamitana. Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero (FONDEPES). Lima.

35. Franceschini L, Zago AC, Canello SH, Garcia F, Mompean RD, Da Silva RJ. 2013. Parasitic infections of *Piaractus mesopotamicus* and hybrid (*P. mesopotamicus* x *Piaractus brachypomus*) cultured in Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal, 22(3) 407-414.
36. Gallego J. 1947. Revisión de la Familia Atractidae Travassos, 1920, con descripción de dos nuevas especies. Rev. Iber. Parasitol. (1) 1-90.
37. Garcia A, Tello S, Vargas G. 2009. Patterns of commercial fish landings in the Loreto region (Peruvian Amazon) between 1984 and 2006. Fish Physiol Biochem (2009) 35:53–67.
38. Garcia JK, Brandao DA, Ceccarelli PS. 1997. Identificação e prevalência de nematódeos do Pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), da estação de piscicultura do Cepta, Pirassununga, SP, Brazil. Cienc Rural. 27 (2): 291-295.
39. Genten F, Terwinghe E, Danguy A. 2009. Atlas of fish histology. Science Publishers. USA.
40. Gibson DI, Jones A, Bray RA. 2002. Keys to the Trematoda. CABI Publishing. Volumen I. London: Wallingford, UK and The Natural History Museum. 521 p.
41. Gôngora PD, Massamitu WF, Pavanelli GC, Machado MH, Takemoto RM. 2006. Carga parasitária de *Rondonia rondoni*, Travassos, 1920 (Nematoda, Atractidae) e fator de condição do armado, *Pterodoras granulosus*, Valenciennes, 1833 (Pisces, Doradidae). Acta Biol. 26 (2): 151-156.
42. González R. 2001. El Cultivo de la Cachama. Fundamentos de la Acuicultura Continental. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INPA). Colombia. 1ª ed., 329p.
43. Grosell M, Farrell AP, Brauner CJ. 2011. The multifunctional gut of fish. Elsevier. 1ª ed. UK.

44. Guerra H, Alcántara-Bocanegra F, Sanchez H, Avalos S. 1992. Hibridación de paco, *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818) por gamitana, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) en Iquitos – Perú. Fol Amaz. 4(1): 107-114.
45. Hinostroza E, Serrano E. 2013. Efecto anestésico del metasulfonato de tricaína en paiches (*Arapaima gigas*) juveniles. Rev Inv Perú. 24(4):451-458.
46. IIAP. 2000. Cultivo y procesamiento de peces nativos: Una propuesta productiva para la Amazonia Peruana. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana. Iquitos.
47. Illán G. 2012. Descripción y caracterización epidemiológica de la parasitofauna de peces ciprínidos de la cuenca alta y media del río Duero. Tesis de Doctorado del Departamento de Patología Animal de la Universidad de Zaragoza, España.
48. Jerônimo GT, Martins ML, Ishikawa MM, Ventura AS, Tavares DM. 2011. Métodos para coleta de parasitos de peixes. Folhetos Embrapa Amapá. [Internet]. [Acceso 4 junio 2016]. Disponible en: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/905949/metodos-para-coleta-de-parasitos-de-peixes>
49. Jeronimo GT, Tavares-Dias M, Martins ML, Ishikawa MM. 2012. Coleta de parasitos em peixes de cultivo. Embrapa. Brasil.
50. Jones A, Bray RA, Gibson DI. 2005. Keys to the Trematoda. CABI Publishing. Volumen II. London: Wallingford, UK and The Natural History Museum. 768 p.
51. Jones RE, Petrell RJ, Pauly D. 1999. Using modified length–weight relationships to assess the condition of fish. Aquacul. Engineering (20) 261–276.
52. Kane AS, Baya A, Reimschuessel R, St Pé KM, Pokish CA, Driscoll CP. 1999. Field Sampling and Necropsy Examination of Fish. Virginia J. of Scie. 50(4): 345-363.

53. Lamothe AR. 1994. Importancia de la helmintología en el desarrollo de la acuicultura. Inst Biol Univ Nac Auton Mex. 65(1): 195-200.
54. Lauzanne L., Loubens G. 1985. Peces del rio Mamoré. Editions de I'ORSTOM. Colection travaux et documents. N°192. France. 116p.
55. Lee LD. 2002. The biology of nematodes. School of Biology University of Leeds. UK. Published in the USA by Taylor & Francis.
56. Leyton SA, Muñoz E, Gordillo MS, Sánchez CG, Muñoz LA, Soto DA. 2015. Estimation of Fulton's Condition Factor (K) and the length weight relationship of three fish species present in a sector subjected to environmental stress factors in high Cauca river basin. Rev. Asoc. Col. Cienc. (27): 24-31.
57. Loubens G, Panfili J. 2001. Biologie de *Piaractus brachypomus* (Teleostei: Serrasalminidae) dans le bassin du Mamoré (Amazonie bolivienne). Ichthyol. Explor. Freshwat. 12(1):51- 64.
58. Luque J. 2004. Biología, epidemiología e control de parásitos de peixes. Rev Bras Parasitol Vet. 13(1): 161-164.
59. Marchant HJ. 1973. Processing small delicate biological specimens for scanning electron microscopy. J. Microsc. 97:369-371.
60. Martins M. 1998. Doenças infecciosas e parasitárias de peixes. Jaboticabal, FUNEP, 2ª ed., 65p.
61. Mendoza MA, Corredor JC, Romero CS. 2013. Estudio histológico del sistema digestivo en diferentes estadios de desarrollo de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Rev. Med. Vet. (25): 21-38.
62. Mesa GM, Botero AM. 2006. Evaluación Morfológica de 3 poblaciones de diferentes edades de cachama blanca "*Piaractus brachypomus*". Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Medellín y Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Antioquia Medellín – Colombia. Actual Biol 28, (84):67-73.

63. Moravec F., Kohn A., Fernandez BM. 1992. Nematode parasites of fishes of the Paraná river, Brazil. part. I. Trichuroidea, Oxyroidea and Cosmocercoidea. *Rev. Fol. Parasitol.* (39) 327-353.
64. Oliveira MS, Tavares-Dias M. 2016. Communities of parasite metazoans in *Piaractus brachypomus* (Pisces, Serrasalminidae) in the lower Amazon River (Brazil). *Braz. J. Vet. Parasitol. Jaboticabal.* 25(2): 151-157.
65. Orti G. 1997. Radiation of characiform fishes: evidence from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Systematics of Fishes.*
66. Parra JE, Brandao DA, Ceccarelli PS. 1997. Identificação e prevalência de nematódeos do pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), da estação de piscicultura do Cepta, Pirassununga, sp, Brasil. *Cienc. Rural.* 27(2):291-295.
67. Parrado YA. 2012. Historia de la Acuicultura en Colombia. *Revista AquaTIC* (37):60-77.
68. Perry RN, Wharton DA. 2011. *Molecular and Physiological Basis of Nematode Survival.* Cambridge: CAB International.
69. PRODUCE. 2015. Anuario Estadístico Pesquero y Acuicola 2015. Ministerio de la Producción. Lima. [Internet]. [Acceso 5 enero 2018]. Disponible en: <http://www.produce.gob.pe/>
70. Quiroz H. 2005. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos.* México. Ed. Limusa.
71. Rego AA., Chubb JC., Pavanelli GC. 1999. Cestodes in South American fresh water teleost fishes: Keys to genera and brief descriptions of species. *Rev Bras Zool.* 16 (2): 299 – 367.
72. Reimschuessel R, Bennett OR, Lipsky MM. 1992. Communications: A Classification System for Histological Lesions. *J. of Aqua. Anim. Health.* 4(2): 135-143.

73. Reimschuessel R, May EB, Bennett OR, Lipsky MM. 1988. Necropsy Examination of fish. *Trop. Fish Med.* 18(2): 427-433.
74. Reno PW. 1998. Factors involved in the disseminations of disease in fish populations. *J Aqua Anim Healht.* 10:160-171.
75. Roberts RJ. 2012. *Fish Pathology*. 4ta Ed. Wiley-Blackwell. UK. 292 p.
76. Salgado-Maldonado, G. 2009. Manual de Prácticas de Parasitología con énfasis en helmintos parásitos de peces de agua Dulce y otros animales silvestres de México. Proyecto PE 209106. [Internet]. [Acceso 5 enero 2018]. Disponible en: www.ibiologia.unam.mx
77. Santos SM, Ceccarelli PS, Rego R. 2003. Helmintos em peixes do Pantanal sul-mato-grossense: primeira expedição do Programa Pantanal. *Boletim Técnico do CEPTA, Pirassununga.* (16)15-26.
78. Schalch SHC, Moraes FR. 2005. Distribuição sazonal de parasitos branquiais em diferentes espécies de peixes em pesque-pague no município de Guariba-SP, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 14 (4): 141-146.
79. Schmidt H, Bernet D, Wahli T, Meier W, Burkhardt-Holm P. 1999. Active biomonitoring with brown trout and rainbow trout in diluted sewage plant effluents. *J. of Fish Biol.* 54: 585–596p.
80. Thatcher V. 2006. *Amazon fish parasites*. 2da Ed. Pensoft. Moscow. Rusia. 508 p.
81. Torres-Garcia MP, Sosa T. 2002. Aparato digestivo. *Atlas de Histopatología de Vertebrados*. Universidad Nacional Autónoma de México.
82. Tradingcunsult. 2008. Estrategias de desarrollo de la acuicultura en la región de Loreto. Peru: Ministerio de Comercio Exterior y Turismo (Mincetur). 71p.
83. Travassos L, Artigas, P, Pereira C. 1928. Fauna helmintológica dos peixes de agua doce do Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico.* (1):5-68.

84. Wilson MJ, Kakouli-Duarte T. 2009. Nematodes as Environmental Indicators. Wallingford: CAB International.
85. Zamora S, Rubio VC. 2009. La digestión de los peces. La nutrición y alimentación en piscicultura. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Madrid.

ANEXOS



Captura de peces provenientes del medio natural



Toma de datos biométricos



Colecta de parásitos en el tracto intestinal de *Piaractus brachypomus*



Extracción y cuantificación de parásitos



Estudio histopatológico



Microscopia Electrónica de Barrido

Anexo 1. Actividades realizadas durante el desarrollo de la tesis

LISTA DE MATERIALES

- Necropsia
 - Guantes estériles
 - Tijeras
 - Mango de bisturí
 - Bisturí
 - Pinzas
 - Bolsas descartables
 - Frascos estériles
 - Formaldehído al 10%

- Histopatología
 - Hematoxilina
 - Eosina
 - Alcohol diferentes concentraciones
 - Xilol
 - Láminas porta y cubre objetos
 - Cassetes
 - Parafina
 - Microtomo

Anexo 2. Materiales usados para la necropsia de los peces y análisis Histopatológico.

PROTOCOLO DE NECROPSIA

Datos del propietario:

Dirección:

Fecha:

Nombre común:

Nombre científico:

N° espécimen:

Sexo:

Peso:

Edad:

Longitud:

Tipo de muerte:

Tipo de muestra:

Natural

Animal vivo

Tejido preservado

Eutanasia

Animal
muerto

Tejido sin preservar

Fijador:

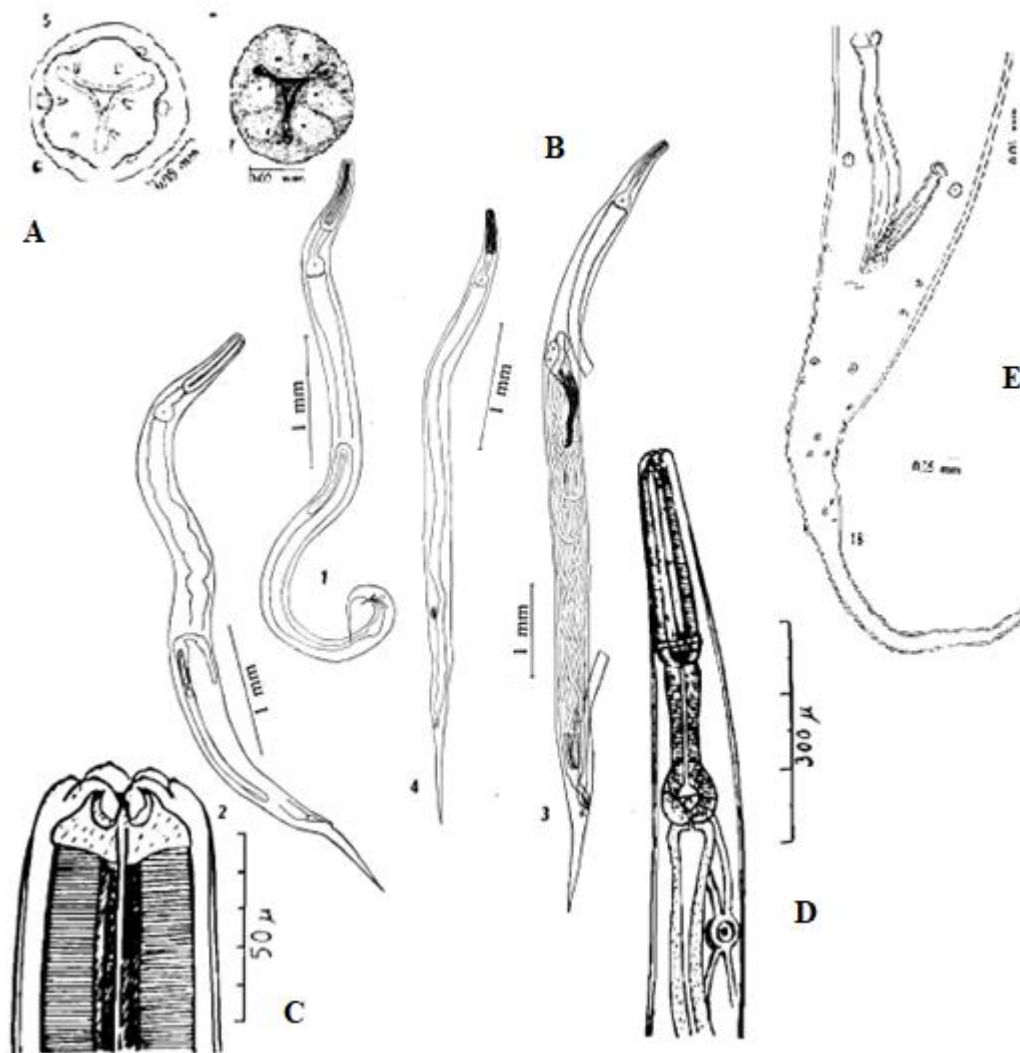
Tejidos fijados:

Piel	Branquias	Pseudobranquias	Opérculo	Aletas
Boca	Ojos	Músculo	Cerebro	Vejiga natatoria
Riñón	Hígado	Vesícula biliar	Bazo	Corazón
Gónadas	Estómago	Tracto intestinal	Otro	
HISTORIA CLÍNICA				
1) ¿Cuándo se detectó?				
2) Signos clínicos				
3) Sistema de cultivo				
4) Tratamientos				
5) Calidad del agua				
6) Alimentación				
6) Análisis de apoyo				
Parasitología:	Bacteriología:	Hematología:	Virología:	Histopatología:
Otro:				

Anexo 3. Protocolo de Necropsia



Anexo 4. Identificación microscópica de *Rondonia rondoni*, muestra de *Piaractus brachypomus*. Se observa un esófago conformado por un cuerpo esofágico fuertemente muscular , itsmo y bulbo valvulado.



Rondonia rondoni Travassos, 1920. A - Extremo anterior, se muestran sus tres labios bilobulados; B - Estructura interna de un macho y una hembra; C - Cápsula bucal, no presenta dientes; D - Se muestran las estructuras del esófago de *Rondonia rondoni* compuesto por cuerpo, itso y bulbo esofágico; E - La cola de un macho mostrando su espícula y las papilas anales.

Anexo 5. Claves taxonómicas para identificación de *Rondonia rondoni* según Travassos (1920).



PROTOCOLO PARA EL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Introducción

El Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, se encarga de realizar las técnicas de histopatología, correspondiente al estudio de los tejidos (etapa analítica) con el fin de ejecutar proyectos de investigación relacionados de la Parasitología Veterinaria.

El presente documento indica sobre los pasos y las características de un proceso de muestreo de tejidos para histopatología, que permita un correcto análisis de la muestra remitida al Laboratorio de Parasitología Veterinaria.

Procedimiento de obtención de muestras para biopsias

1. Las muestras de tejido para análisis histológico se depositarán y mantendrán en frascos de diferentes tamaños que cumplan con los siguientes requisitos:

- Transparentes.
- Tapa rosca, boca ancha.
- La muestra deberá colocarse en el frasco con una cantidad formalina tamponada al 10% de 10 veces el tamaño de la muestra, esta debe cubrir la muestra por todas sus caras.
- Es necesario destacar que el envase debe contener la formalina antes de depositar la muestra de tejido, ya que esto evitará que el tejido quede adherido a las paredes del envase, sin tomar contacto con la formalina.

El personal que manipula muestras de tejido deberá usar implementos de barrera como (guantes y mascarillas) para prevenir accidentes con sangre, fluidos corporales y derrames de formalina.

2. Identificación de la muestra: se realiza en el cuerpo del frasco NO EN LA TAPA.

- Nombre común y/o nombre científico
- Fecha
- Tejido
- Procedencia

3. Traslado de la muestra

Todas las muestras deben ir acompañadas de su respectiva orden de solicitud de estudio histopatológico con los datos antes mencionados.

Los frascos deben ser embalados con protección anti derrame.

4. Criterios de rechazo de muestra

- Mala rotulación de la muestra
- Muestras no fijadas y/o en proceso de autólisis
- Fijador no adecuado y/o en proporciones insuficientes

Procedimiento para la recolección y fijación

1. Recolección de los tejidos

1.1 La obtención de la muestra debe ser en lo posible inmediatamente después de la muerte, para ello se usará bisturí o cuchillos limpios y afilados, ya que ellos permiten cortes netos.

1.2. Evitar la desecación de los tejidos, debido a que la pérdida de agua puede modificar el aspecto histológico de ellos. En terreno, se recomienda proteger los órganos o muestras de la rápida desecación utilizando suero fisiológico o agua destilada.

1.3. Posterior a la obtención, los trozos de tejido, no deben aplastarse, ni doblarse, ya que estos defectos de manipulación, dificultarán su laminación en el laboratorio.

1.4. Los trozos deberán tener un grosor o espesor ideal de 0,5 cm y de una amplitud suficiente para identificar su origen. Espesores mayores impiden una buena fijación del interior del tejido, ya que la mayoría de los fijadores poseen un lento poder de penetración por esa razón los tejidos con cápsula, intestino, o cualquier otro conducto, deben abrirse para facilitar la acción del fijador.

1.5. Los trozos deben incluir una porción macroscópicamente normal, la que servirá para identificar el órgano, y una porción patológica. Por ejemplo, en el caso de una lesión granulomatosa, el centro del granuloma corresponde a una necrosis no estructurada, que impide reconocer el órgano, y por lo demás, tampoco se puede obtener información patológica importante, ya que en este caso, deberá examinarse más detalladamente la zona límite del granuloma, donde se observará por una parte tejido normal y por otra la reacción inflamatoria.

2. Fijación de la muestra

2.1. Las muestras se colocarán lo antes posible en un líquido fijador, utilizándose más comúnmente con este fin una solución de formalina al 10% tamponada, con la que se rellena un envase con la capacidad suficiente para almacenar un volumen 5 a 10 veces superior al trozo de tejido fijado.

2.2. Se recomienda colocar primero el fijador en el frasco y luego los tejidos, para evitar que estos se adhieran a las paredes del envase, impidiendo con ello el contacto de parte de la muestra con el fijador.

2.3. La solución de formalina al 10 % tamponada, se prepara combinando 1 parte de formalina comercial (formalina pura al 37%), con 9 partes de agua. En terreno se puede tamponar, agregando un trozo de tiza (carbonato de calcio), con la que se

evita la formación de hematina ácida (pigmento negro), especialmente en aquellos tejidos con gran cantidad de sangre.

2.4. Además de la formalina, se puede utilizar otros fijadores con fines específicos, pero en estos casos se debe rotular al etiquetar y empaquetar las muestras, ya que los tejidos fijados por métodos con ácidos u otros elementos empleados, se pueden alterar por tiempos de fijación superiores a 48 horas.

3. Envasado de la muestra

3.1. Para la recolección de muestras se deben usar frascos de boca ancha, de modo que permita tanto la introducción de las muestras cuando estas estén frescas, así como, su posterior extracción en el laboratorio, cuando esté fijada. Por esta razón, los envases de boca angosta son inadecuados, ya que al fijarse los tejidos, estos se tornan sólidos y no pueden extraerse desde el frasco.

3.2. Todas las muestras de un caso se pueden fijar en el mismo envase, no siendo necesario identificar cada tejido por separado, aunque sean trozos pequeños, incluso de ser necesario por problemas de transporte, en el mismo envase, se pueden enviar muestras de diferentes casos, teniendo sí la precaución de envolver cada lote separadamente en gasa con su respectiva identificación.

3.4. Rotular los frascos, acompañarlos del respectivo protocolo del laboratorio donde va dirigido y enviarlos posteriormente al laboratorio.

Procedimiento de la técnica histológica de las muestras

1. Después de la fijación, el tejido debe ser convenientemente lavado con agua o bien con otras sustancias que eliminen restos de fijadores especiales.

2. La muestra se deshidrata colocándose en alcoholes de concentración creciente para eliminar el agua que contenga ya que la parafina no es miscible con agua. Se utiliza etanol al 70%, 80%, 96% y 100%.

3. La muestra se aclara con solventes que producen transparencia en los tejidos, además de solubilizar la parafina. Entre ellos se encuentra: xilol, toluol, acetona, benceno. El que se utiliza en el laboratorio es el Xilol.

4. Inclusión en parafina, se pone en estufa de cultivo a unos grados por encima de su punto de fusión (parafina blanda 44 a 48 C° y parafina dura de 56 a 58 C°). Se sumerge la muestra, se lleva a estufa unos minutos para que la parafina penetre en los tejidos. Luego se enfría bruscamente colocando el recipiente en hielo.

5. Luego para la preparación del taco se corta un trozo de parafina que contiene la muestra en forma de pirámide truncada, de tal manera que la misma quede sobre la base menor. Se pega la base mayoría un taquito de madera que servirá para sostenerlo en el micrótopo.

6. El corte se realiza mediante el uso del micrótopo. El micrótopo de congelación permite cortar el tejido después de fijarlo por frío, congela con dióxido de carbono

y lo endurece para luego pueda ser cortado. Los cortes pueden tener un espesor de 4 a 100 μm o más, según los tejidos que se deseen estudiar.

7. Efectuados los cortes se colocan en agua tibia para que se extiendan y luego se recogen con un pincel y se los extienden en el portaobjetos y se dejan secar para su posterior coloración.

8. Para la desparafinización se debe extraer toda la parafina del tejido y aclararlo nuevamente. Se utiliza Xilol.

9. La hidratación del tejido se debe realizar ya que la mayoría de los colorantes son de base acuosa. Para ello se coloca el portaobjeto en soluciones de etanol de concentraciones decrecientes. Etanol al 100%, 96%, 80%, 70% y agua destilada.

10. Los cortes de los tejidos adheridos a los portaobjetos están listos para ser coloreados. Se utilizará hematoxilina – eosina.

11. Para preparar los preparados por tiempo prolongado se deshidratan. Para ello se sumerge el preparado en soluciones de etanol de graduación crecientes al 70%, 80%, 96% y 100%.

12. Para la aclaración se utiliza xilol o benzol, esto sirve para diluir la resina adhesiva utilizada para pegar el cubre objeto.

13. Montaje: se cubre el corte con el cubre objeto que se adhiere con resina y permite su uso prolongado. De esta manera está listo para su posterior lectura en el microscopio.

Anexo 6. Protocolo de Histopatología



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
Laboratorio de Parasitología Veterinaria

PROTOCOLO PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

Introducción

El Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, se encarga de realizar los análisis de histopatología, correspondiente al estudio de los tejidos (etapa analítica) con el fin de ejecutar proyectos de investigación relacionados de la Parasitología Veterinaria.

El presente documento indica sobre los pasos para la realización de microscopia electrónica de barrido, estos protocolos son orientativos y dependiendo del tipo de muestra o técnica microscópica a emplear, puede ser necesario realizar modificaciones.

Un MEB por sus siglas de Microscopía Electrónica de Barrido, suministra información morfológica, topográfica y composicional de las muestras, gracias a la interacción de los electrones con la superficie de la muestra y a los fenómenos que allí se producen, a continuación, se mencionan los más importantes:

- La propia muestra emite electrones secundarios para obtener imágenes tridimensionales de alta resolución SEI (Secondary Electron Image), la energía de estos electrones es muy baja, inferior a 50 eV, por lo que los electrones secundarios provienen de los primeros 15 nm de la superficie.
- Algunos electrones primarios son reflejados o retrodispersados permitiendo la obtención de imágenes planas de composición y topografía de la superficie BEI (Backscattered Electron Image).
- La muestra absorbe electrones en función del espesor y la composición; esto produce el contraste en la imagen.
- Emisión de rayos X: cuando los electrones de niveles internos son expulsados por la interacción de los electrones primarios, habrá transiciones entre los niveles de energía con emisión de rayos X, esta energía y longitud de onda están relacionadas con la composición elemental del espécimen, permitiendo realizar análisis químicos mediante espectroscopía por dispersión de energía y de longitud de onda (EDS y WDS).

- Emisión de electrones Auger: cuando un electrón es expulsado de un átomo, otro electrón más externo puede saltar hacia el interior para llenar esta vacancia resultando en un exceso de energía. Esta energía extra puede ser liberada emitiendo un nuevo electrón de la capa más externa (electrón Auger). Son utilizados para obtener información sobre la composición de pequeñísimas partes de la superficie de la muestra.

Preparación de muestras para Microscopia Electrónica de Barrido

Materiales:

- 2.5% glutaraldehído.
- Series graduales de alcohol desde 30% hasta absoluto.
- Acetona.
- Viales de vidrio para manejar las muestras.
- Desecador de punto crítico.

Notas: Debido a que las muestras biológicas poseen un gran contenido de agua que se evapora durante el secado al aire o cuando se colocan en el Microscopio de Barrido a alto vacío; es necesario prever las disrupciones que se producen en el tejido. La mayoría de estas disrupciones son causadas por la tensión superficial del agua en el interior y en los alrededores de las células. En el secado por punto crítico se coloca la muestra en un ambiente donde el fluido celular pasa a fase gaseosa en un punto, en el que la tensión superficial es cero. El agua de la muestra se reemplaza gradualmente, primero por alcohol, luego por acetona y finalmente por el fluido de transición, que puede ser CO₂. El aparato de secado por punto crítico consiste en esencia en una cámara fuertemente sellada en la cual se colocan la muestra y el fluido de transición (CO₂), 1 o 2 hs. La cámara se recalienta, haciendo circular agua, para llevar a la temperatura crítica del líquido transicional. (Este es el punto en que la fase líquida y la fase vapor tiene la misma densidad). La fase del vapor fluido de transición se extrae por medio de la válvula de ventilación del equipo, muy despacio. Luego se puede extraer la muestra de la cámara, montarla en los porta muestras y metalizarlas.

Los métodos de preparación de las muestras biológicas están condicionados por dos circunstancias:

- La necesidad de preservar los tejidos y las estructuras celulares (esencialmente común a todo tipo de microscopía).
- La necesidad de que la muestra sea atravesada por el haz de electrones para formar imágenes (característica del MEB).

Las etapas de la preparación de las muestras para ser observadas por métodos convencionales son las siguientes.

1. Fijar con 10% glutaraldehído en tampón Cacodilato 0.1 M a un pH de 7.4 y 1 hora a T° ambiente.
2. Lavar 3 veces por 10 minutos con Tampón Cacodilato + Sacarosa isosmolar con el fijador.
3. Postfijar con 1% OsO₄ en Cacodilato, 1 h en oscuridad a 4 °C.
4. Lavar 3 veces con Cacodilato por 10 minutos.
5. Deshidrate pasando por serie de alcohol desde 25% 50%, 80%, 95% y acetona 100% por 10-15 minutos, cada uno (depende de las dimensiones de la muestra).
6. Coloque la muestra a 100% de acetona y luego en la cámara del desecador por punto crítico.
7. Colocar las muestras sobre soportes de microscopio electrónico de barrido utilizando cemento conductor.
8. Recubrimiento metálico con oro en atmósfera de Argon.
9. Visualizar y fotografiar en un microscopio electrónico de barrido.

Montaje de especímenes para su observación por Microscopio Electrónico de Barrido

Ubicar la muestra de manera de poder observar la superficie de interés sin que haya problemas de carga.

Materiales:

- Material seco (al aire o punto crítico).
- Porta-muestras.
- Cinta adhesiva doble faz.
- Pintura de plata
- Pinza.

- Hoja de afeitar.

Notas: El montaje de las muestras es un paso muy importante para la observación en el MEB de las mismas. Primero, porque debe quedar bien adherida para que luego de metalizarla sea buena conductora, y segundo, debido a que las dimensiones del espécimen varían de acuerdo a lo que quiere observarse y el tamaño de la cámara del espécimen que tiene el microscopio. Deberá seleccionarse el área de interés con mucho cuidado.

Procedimiento:

1. Rotule los porta muestras pegando en su cara inferior una etiqueta pequeña sin que sobresalga.
2. Si elige montar su muestra con cinta doble faz, corte la misma más pequeña que la cara superior del porta muestra.
3. Observe bien su muestra, deberá estar limpia y el tamaño no excederá el de la porta muestras (altura: 1 o 1,5 cm).
4. Si elige pegarlo con algún adhesivo (depende del tipo de muestra), coloque la cantidad necesaria y apoye la muestra.
5. Lleve a metalizar.

Seguridad para el desarrollo de la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido

El laboratorio de microscopía electrónica constituye un lugar donde se debe de tomar normas de precaución importantes, siendo fundamental la adopción de medidas preventivas para garantizar la seguridad de los operadores. Existen precauciones universales que se aplican a cualquier tipo de laboratorio y otras específicas en base a la clase de estudio que se realiza. Además de los peligros propios que conlleva el trabajo en un laboratorio de procesamiento de muestras biológicas y/o químicas, los protocolos más comúnmente empleados para microscopía electrónica engloban cuidados especiales. A continuación, se enumerarán los más destacados, en base a la información hallada y a la práctica obtenida.

1. Los reactivos empleados en los diferentes pasos de preparación de muestras para microscopía electrónica (fijación, lavado, deshidratación, inclusión, contraste) poseen distintos grados de peligrosidad. La mayoría de estas sustancias puede ingresar al organismo al ser inhaladas, ingeridas y/o absorbidas por piel. Como regla general e independientemente del tiempo de exposición o del tipo de actividad que se realice con el producto, se deben manipular bajo campana y usando los elementos de protección personal adecuados.
2. Se recomienda leer las instrucciones de la etiqueta impresa en el producto y las hojas de seguridad antes de usarlo, prestando especial atención en conocer el

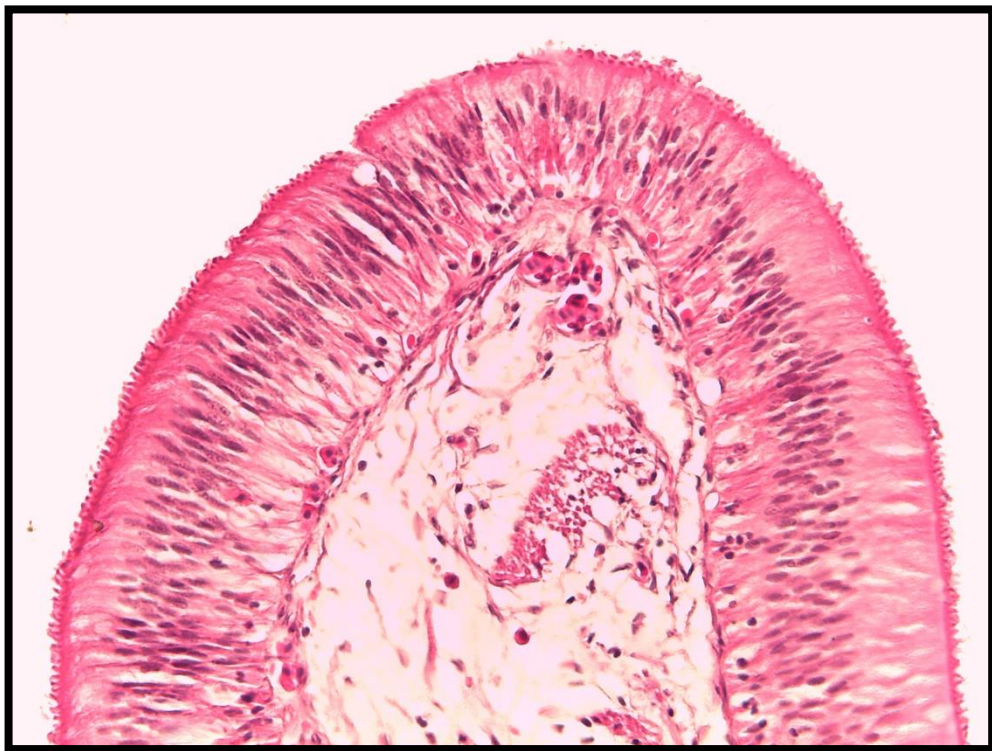
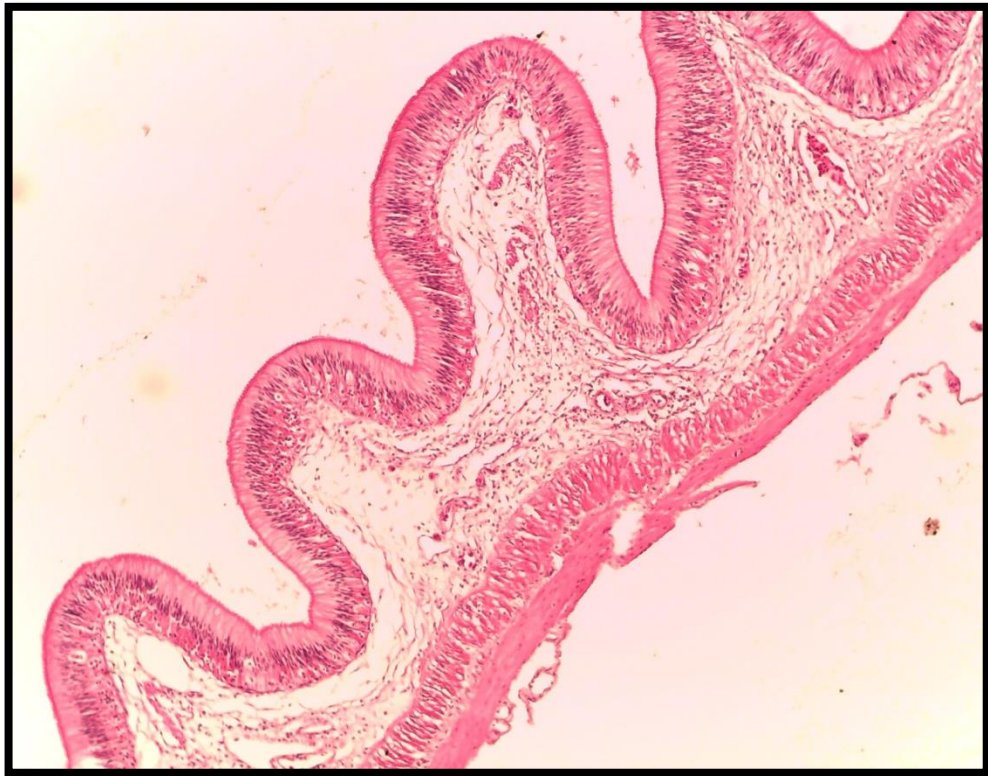
manejo seguro de cada sustancia y sus peligros potenciales. Se debe usar las menores cantidades posibles y en caso de trasvasarlos, rotular los recipientes inmediatamente.

3. En el caso que existiese un derrame o salpicaduras se debe actuar con rapidez para lograr la neutralización, absorción y eliminación del producto. Los elementos de protección empleados serán en función de la peligrosidad del producto y se debe tener la precaución de quitarse las ropas contaminadas. Es conveniente alejar todas las fuentes de calor, especialmente si el producto derramado es inflamable. El laboratorio debe disponer de duchas y lavaojos accesibles y cada trabajador debe conocer en dónde se encuentra el equipo para la atención de emergencias.

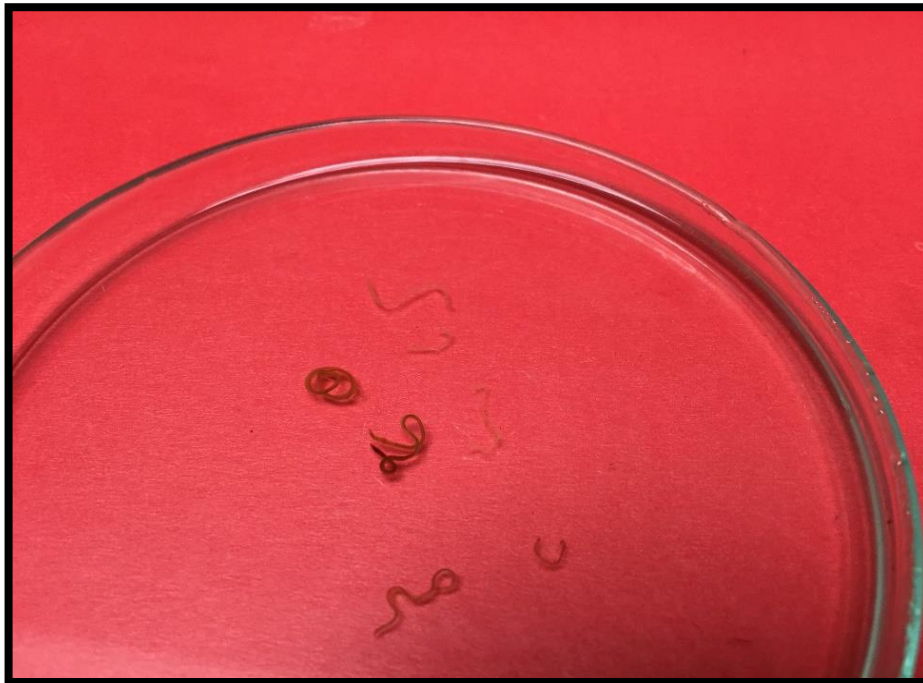
Anexo 7. Protocolo de Microscopia Eletrônica de Barrida.

ESPECIMEN	SEXO	LONGITUD mm	ANCHO μm
1	MACHOS	5.2	321
2	MACHOS	5.6	293
3	MACHOS	5.5	289
4	MACHOS	5.1	286
5	MACHOS	4.5	290
6	MACHOS	4.9	312
7	MACHOS	4.1	315
8	HEMBRAS	6.5	318
9	HEMBRAS	7.1	311
10	HEMBRAS	6.4	318
11	HEMBRAS	6.9	316
12	HEMBRAS	6.8	305
13	HEMBRAS	7.2	320
14	HEMBRAS	6.6	315
15	HEMBRAS	7	313

Anexo 8. Tabla de longitud y ancho de *Rondonia rondoni*.



Anexo 9. Tejido epitelial simple cilíndrico del tracto intestinal de *Piaractus brachipomus*. Tejido sano, no presenta inflamación y sin presencia de parásitos.



Anexo 10. Parásitos encontrados a nivel de los ciegos pilóricos. Obsérvese en la imagen superior trematodos de la especie *Dadaytrema oxycephala* y en la imagen inferior a nematodos del género *Procamallanus* sp.