

Disertación del M. V. Olegario H. Prieto recipiendario del Premio

INTRODUCCION

**Señoras y Señores
Sr. Presidente:**

Deseo agradecer a la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria haberme conferido este premio que, como dijera en la carta de respuesta a la Academia, lo acepto con mucho placer siendo motivo de gran orgullo, que me honra y por otra parte, me estimula a continuar transitando este camino de la investigación en Parasitología Veterinaria y seguir así aportando a esta querida profesión. Es realmente para mí un compromiso que debo seguir cumpliendo en el futuro.

También deseo agradecer la labor del Jurado en todos sus integrantes y al Profesor Dr. Aramburu, que presidió el cuerpo y que como bien dijo, fue mi profesor, allá por el año 1975, según puede leerse en mi Libreta Universitaria y que, además, ha tenido palabras demasiado generosas al hacer mi presentación.

Deseo también agradecer a la prestigiosa firma Bayer Argentina S.A.

la generosidad de haber instaurado este premio en la comunidad veterinaria, hecho que permite a todos aquellos profesionales que están ejerciendo la profesión, reconocerlos por la actividad que desarrollan.

También quiero agradecer muy especialmente a Noemí, mi esposa, que está aquí presente, porque siempre ha estado apoyándome en el desarrollo de este trabajo.

El tema elegido para esta ocasión ha sido seleccionado porque una gran parte de la actividad profesional del suscripto ha estado basada en el uso de esta herramienta.

Deseo pues mostrarles parte de ese trabajo a través de una exposición apoyada en una serie de fotografías transparentes (slides) que ilustrarán el relato.

El título completo de la presentación que a continuación efectuaré con vuestro permiso es:

Aportes de la Microscopía Electrónica de Barrido a la Parasitología Veterinaria

Desde la antigüedad el hombre tuvo que prestar gran atención a los parásitos debido a que estos agentes causaban severas epidemias que

azotaban a poblaciones humanas y animales.

En el mundo de la parasitología veterinaria probablemente la sarna

psoróptica ovina sea la primera ectoparasitosis descrita en animales domésticos, siendo ya citada en la Biblia en época de Moisés, (aproximadamente 1200 años a.C.) al prohibirse la ofrenda de animales sarnosos. En uno de sus versículos puede leerse lo siguiente: "Ciego, o perniquebrado, o mutilado, o verrugoso, o sarnoso, o roñoso, no ofrecéreis éstos a Jehová, ni de ellos pondréis ofrenda encendida sobre el altar de Jehová⁽¹¹⁾ .

En otros tiempos, Homero (800 años a. C.), autor de La Ilíada y La Odisea, menciona a la garrapata, parásito aún hoy difundido en el mundo y muy importante económicamente por los cuantiosos daños que provoca a la población ganadera⁽⁹⁾ .

En el siglo XII, un escritor árabe llamado Avenzoar, es el primero que menciona a los agentes productores de la sarna, los ácaros, sosteniendo que la presencia de la enfermedad puede asociarse a ellos⁽¹¹⁾.

Tanto para el estudio descriptivo de los parásitos como para su clasificación, la morfología interviene jugando un rol protagónico. Para realizar estudios relacionados con estos aspectos los investigadores del siglo XVII y más especialmente los del siglo XVIII, se valieron del empleo del microscopio óptico (el primer instrumento fue diseñado por Antony Van Leeuwenhoek, 1632-1723, y sólo podía magnificar objetos hasta 500 X), una herramienta de uso rutinario en esa época en los diferentes centros de Investigación del mundo.

Fue sólo a fines del siglo pasado y comienzos del presente que la República Argentina incorporó a sus estrategias sanitarias la lucha contra la garrapata común del bovino, el *Boophilus microplus* Can, un parásito exótico que, para esa época, había ocupado varios

cientos de miles de hectáreas. En realidad, el comienzo de la lucha contra este ácaro lo marca la creación de la ley de Policía Sanitaria Animal N° 3959 y su decreto reglamentario, hecho ocurrido en 1906.

Para reforzar esta acción, el Gobierno Nacional de la época contrató al Profesor Fernando Lahille, de origen francés, quien además de hombre de bien era un sabio, abarcando con sus conocimientos numerosos campos de la cultura. Era, entre otras cosas, un experto limnólogo, razón por la cual recorrió numerosos ríos y lagos de la Patagonia Argentina para estudiar las especies de peces que habitaban en esas aguas dulces. Pero también le interesaban los parásitos y, prueba de ello fue, que, en 1905 publicó "Contribution a l'étude des Ixodidés de la République Argentine"⁽⁸⁾ que fue el primer libro de parasitología escrito en el país y en francés. Es oportuno destacar aquí la altísima calidad y precisión morfológica lograda en los dibujos que ilustran este libro, muchos de ellos realizados con la ayuda de la Cámara clara de Abbe*, un dispositivo mecánico - óptico que adosado al microscopio óptico y mediante un juego de espejos refleja sobre un papel en la mesa de trabajo lo que se observa en el campo del microscopio, pudiendo de esta manera dibujarse la muestra bajo estudio. Valiéndose de sus conocimientos y de estos elementos, el Profesor F. Lahille logró ese maravilloso libro del cual todavía se conservan en el mundo por lo menos que yo sepa, dos ejemplares originales, uno de ellos en Japón y otro en la Argentina en manos de un reconocido parasitólogo de nombre internacional, el Profesor Dr. Jorge L. Nuñez que hoy me acompaña.

La aparición del Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) marcó el comienzo de una nueva era en el mundo

* (del que existe un ejemplar en el Area de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la U.B.A.) (1).

de la microscopía y de esta forma los investigadores contaron con una poderosísima herramienta aplicable a los más diversos campos del conocimiento. Si bien esta tecnología estuvo comercialmente disponible desde la década del 60, sus fundamentos ya se conocían desde bastante antes (1939).

No está completamente claro quién propuso por primera vez el principio de "SCANEAR" o "barrer" una superficie con un delgado haz electrónico para reproducir una imagen detallada de la misma.

La primera descripción publicada apareció en 1935 y fue hecha por un físico alemán, el Dr. Max Knöll. Posteriormente, otro físico germano, el Dr. Manfred von Ardenne, realizó algunos estudios, pero fue recién en 1942 cuando tres americanos, los Dres. Zworykyn, Hillier y Snijder, lograron un MEB mucho más práctico, con un poder de resolución de 50 nm y una capacidad de magnificación de 8000 X.

La República Argentina fue un país pionero en el mundo en el uso del MEB aplicado a la Medicina Veterinaria.

El primer servicio de Microscopía Electrónica de Barrido (que también dió ayuda a países vecinos) comenzó a funcionar en el año 1971, en la Fundación Campomar, donde trabajaba el Profesor Federico Leloir, Premio Nobel de Química en 1970. Posteriormente el equipo allí instalado fue trasladado a dependencias del CONICET⁽⁵⁾ siendo intensamente utilizado por los Dres. Jorge Nuñez, Horacio Moltedo y Mario Muñoz Cobeñas, quienes aplicaron esta metodología al estudio de la morfología y fisiología de parásitos de gran importancia económica para la Argentina como *Boophilus microplus*, *Psoroptes ovis* y *Psoroptes bovis*.

Los resultados de sus investigaciones fueron volcados en dos obras:

"*Boophilus microplus*. La garrapata común del ganado vacuno" editada en 1982 y "Sarna Psoróptica en ovinos y bovinos", publicada en 1985.

El éxito alcanzado por el primero de estos libros determinó un premio en la Feria Internacional del Libro de Buenos Aires de 1987 por la calidad de las fotografías incluidas en la obra y por las posibilidades que abría al campo de la parasitología veterinaria el uso del MEB. Finalmente, este tratado sobre la garrapata común del bovino fue traducido al inglés y publicado en Alemania.

En la Argentina existen actualmente alrededor de 30 MEB e instituciones tales como la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), la Facultad de Odontología de la UBA, la Universidad de Morón, el Museo de Ciencias Naturales de la Plata, el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), Aluminios Argentinos (ALUAR) y Yacimientos Petrolíferos Fiscales (YPF), entre otras, las que no sólo poseen este tipo de instrumento sino que brindan servicio en forma rutinaria.

A continuación se describirá muy sucintamente y sin entrar en mayores detalles qué es y cómo funciona un Microscopio Electrónico de Barrido pidiendo disculpas al auditorio por esta descripción técnica, la que haré livianamente.

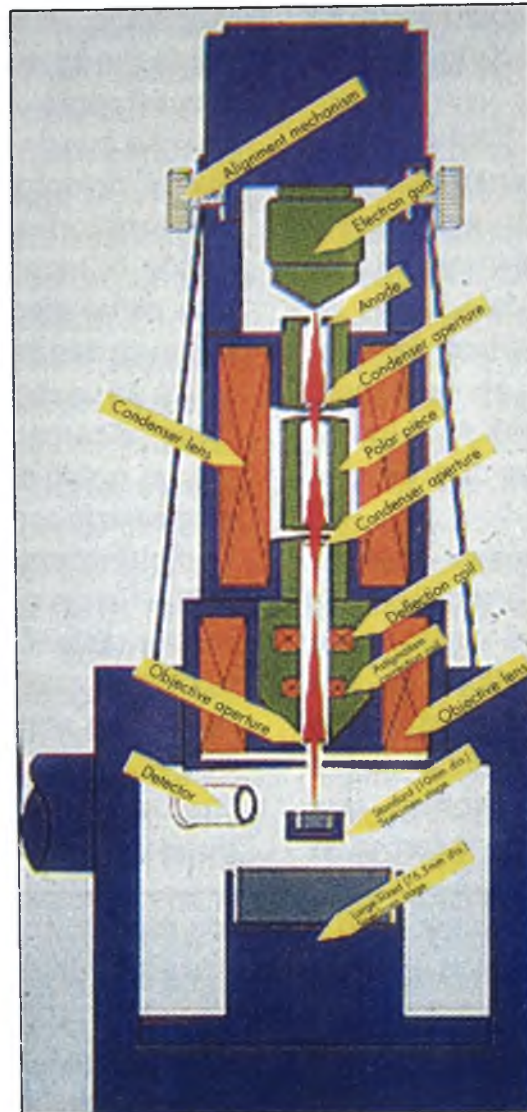
Básicamente consta de: (Esquema a)

- Una columna óptico-electrónica, en que se origina el haz electrónico.
- Una cámara porta-muestra (platina) que permite variados movimientos en distintos planos y en la cual se coloca la muestra objeto del estudio.
- Un detector encargado de recoger las distintas señales que resultan del choque del haz electrónico sobre la muestra (ejemplo electrones secundarios) y convertirlas en señales eléctricas.

- Una cámara fotográfica incorporada al equipo, para registrar las observaciones.

- Un monitor en el que se visualiza la imagen que "lee" el scanning.

ESQUEMA a.



(Foto gentileza Dr. N. De Vicenzo)

- Alignment mechanism = Mecanismo de alineación**
- Electron gun = Cañón electrónico**
- Anode = Anodo**
- Condenser aperture = Apertura del Condensador**
- Polar piece = Pieza polar**
- Condenser lens = Lente condensador**
- Deflection coil = Bobina deflectora**
- Objective lens = Lentes objetivo**
- Objective aperture = Apertura del objetivo**
- Detector = Detector**

- Un panel o consola desde la cual se opera el equipo.
- Elementos de conexión a una fuente de energía eléctrica.

En el MEB un haz sumamente delgado de electrones es dirigido desde su fuente de emisión, el cañón electrónico, hacia la muestra, impactando sobre ella.

¿Cómo se origina el haz electrónico?

El haz se origina en el cañón electrónico, donde un filamento muy delgado de tungsteno al ser calentado eléctricamente hasta su incandescencia comienza a generar (emitir) electrones que son condensados para formar un haz sumamente delgado, el cual dentro

de la columna (en un campo con alto vacío) es dirigido hacia la muestra, a la que impacta en su superficie a la vez que se le impone un movimiento de vaivén en las direcciones de los ejes "x" e "y".

El MEB trabaja con "lentes" magnéticas u óptico-electrónicas ubicadas en el interior de la columna (lente condensador, lente objetivo y lente de proyección) que tienen la función de disminuir el diámetro del haz de electrones desde unos 50 μ , en su origen, hasta un diámetro de 100 Å al incidir sobre la muestra, efecto que da una altísima resolución.

Cuando el haz electrónico primario (haz incidente de alta energía) impacta sobre la muestra, penetra a ésta hasta una determinada profundidad (desde 100 Å hasta 5 μ) y como resultado de esa interacción se originan distintos tipos de señales (= emisiones) que escapan de la muestra bajo la forma de

electrones secundarios, radiación X características, electrones retrodifundidos, radiación visible o cátodoluminiscencia, electrones Auger y otras. Cada modo de emisión constituye, potencialmente, una señal a partir de la cual se puede crear una imagen. Para ello el "detector" se encarga de recoger las emisiones secundarias emitidas desde la muestra y las transforma en una señal eléctrica que se amplifica y procesa dando una imagen que se proyecta en un monitor y puede registrarse fotográficamente (3) (6) (7) (16).

La notable performance del MEB, comparado con otros microscopios, está dada básicamente por:

- Su altísimo poder de resolución: es la menor distancia entre dos puntos adyacentes que el MEB puede "leer" o "ver" y se encuentra alrededor de los 250 Å . Es una medida de la característica más pequeña que el microscopio puede ver.

"El ojo humano desnudo tiene un poder de resolución de 0.2 mm, es decir puede distinguir dos puntos separados entre si por una distancia de 0.2 mm."

- Su notable profundidad de campo que es uno de sus mayores méritos permite obtener una visión tridimensional de la muestra bajo estudio. Así, la profundidad de un campo corresponde aproximadamente a la mitad de su anchura. Esto significa que para un campo de 1 mm. de ancho se halla

nítidamente enfocado hasta una profundidad de 0.5 mm.

- Su alto poder de magnificación llegando a alcanzar con facilidad aumentos del orden de los 30.000 X que para estudios de parasitología veterinaria resultan adecuados.

Medidas de uso común en microscopia electrónica de barrido.

La unidad de longitud es el **nanómetro** (nm)

1 nm = 1 millonésimo de mm. o 10^{-9} metro.

Una medida intermedia es el **micrómetro** (μm)

1 μm = 1 milésima de mm. o 1000 nm.

En la bibliografía también se encuentra como unidad de medida el Angström (A), equivalente a 0.1 nm. y el micrón, antiguo nombre para micrómetro.

El estudio de materiales biológicos con el MEB comenzó mucho más tarde que el de los materiales duros como los metales y cristales. Los tejidos duros (dientes, huesos) son más fáciles de preparar comparados con los tejidos blandos (células, bacterias o parásitos) pero requieren un trabajo previo más complejo ya que no son buenos conductores eléctricos y se deforman por la acción del vacío y la desecación.

El objetivo del MEB es la superficie de la muestra bajo estudio, ya sean superficies naturales y libres (todas las partes externas de un parásito) o las obtenidas artificialmente por corte, rotura o aplastamiento (por ejemplo corte transversal o tangencial de huevos de insectos).

De acuerdo a nuestra experiencia y digo nuestra porque una gran parte de estos trabajos que presento aquí fueron realizados conjuntamente con otras personas como el Dr. Jorge Núñez (U.B.A.) y los Licenciados Armando Cicchino y Alberto Abrahamovich del Museo de La Plata, para preparar muestras parasitológicas la metodología que a continuación se describe ha dado excelentes resultados.

Obtenida la muestra directamente de su hospedador o del ambiente donde este habita, según el parásito (ácaros, insectos, helmintos, etc.), se deben cumplir con los siguientes pasos:

1- Fijación: se sumerge la muestra obtenida en una solución de glutaraldehído (GAL) al 2.5-3%. Esta sustancia penetra en los tejidos de la muestra y produce puentes transversales entre las proteínas de forma tal que endurece la muestra evitando cambios posteriores de forma.

Otros fijadores que han mostrado buenos resultados son: el etanol + a.

acético (1:1 vol/vol.) y el etanol + acético + glicerina (1:1:1 vol/vol/vol.).

2- Como las muestras deben ser anhidras (no sólo para que resistan el vacío del equipo sino también para que se puedan recubrir con un material metálico a fin de obtener buena conductibilidad eléctrica), se deben **deshidratar** y para ello se usa acetona realizando pasajes por concentraciones crecientes desde 30%, 50% y 70% hasta 90% y 100%. La acetona es un solvente que sustituye el agua de la muestra y luego se evapora.

3- La limpieza del material se efectúa con un vibrador ultrasónico en los primeros pasos de la deshidratación durante 20" a 2' según la suciedad de la muestra.

4- Posteriormente se somete la muestra a un proceso de **secado** por punto crítico, haciendo pasar CO₂ líquido a alta presión, eliminando todo resto de agua quedando la muestra prácticamente liofilizada.

5- El montaje se realiza sobre tacos metálicos de bronce, aluminio o cobre, en diferentes posiciones sobre una cinta de doble faz.

6- El siguiente paso es el **Metalizado** y se realiza al vacío evaporando sobre la muestra un metal o mezcla de metales como aluminio, plata, oro, paladio u otros. La mezcla de oro-paladio nos ha dado muy buenos resultados. De esta forma se deposita sobre la superficie de la muestra una delgadísima capa de metal (de alrededor de 100 Angström) que respeta la forma de todos los accidentes de la misma.

Ese delgado baño metálico asegura una adecuada conductibilidad eléctrica y la formación de una superficie que pueda emitir un gran número de electrones secundarios tras el bombardeo con el haz incidente.

En este sentido, el oro es un metal

que emite un gran cantidad de electrones y se evapora fácilmente, siendo por lo tanto de gran utilidad.

Para que la superficie pueda ser recubierta o "bañada" uniformemente en todos sus puntos, se coloca la muestra sobre una platina dentro del equipo metalizador y se le impone movimientos de rotación (alrededor de un eje vertical) y de oscilación (alrededor de un eje horizontal).

Finalizada la preparación la muestra se encuentra lista para ser observada, para lo cual se la coloca en la platina porta-muestra, dentro de la cámara del MEB.

7- En Microscopía Electrónica de Barrido la fotografía es un paso muy importante porque es el resultado final de la observación y sobre la cual se harán el análisis, las mediciones, el diagnóstico y el informe final.

Como las observaciones se realizan a altos aumentos es necesario documentarlas ya que volver a encontrar la misma imagen anteriormente observada en un campo tan amplio suele resultar azaroso o por lo menos difícil.

De ahí que se deban emplear técnicas estandarizadas de fotografiado y revelado, siendo aquí especialmente importante el trabajo desarrollado por el personal técnico que manejar el "scanning".

El Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) o Scanning Electron Microscope (SEM) es un instrumento que comenzó a producirse en serie en la década de 1960, siendo Japón e Inglaterra los países líderes en la producción comercial. Desde entonces se lo utiliza rutinariamente tanto en el campo de las ciencias básicas como aplicadas; fuera del ámbito de las ciencias naturales tiene aplicación en campos tan diversos como el de la metalúrgica,

minería, odontología, química, la industria textil, alimenticia, del papel y muchísimos otros más.

En el terreno específico de la Parasitología Veterinaria este instrumento es de una gran utilidad para:

- Identificar parásitos (artrópodos, helmintos y protozoarios).
- Resolver problemas taxonómicos (diferenciar especies).
- Levantar caracteres morfológicos, tanto a nivel estructural como ultraestructural.
- Realizar mediciones.
- Estudiar lesiones provocadas por los parásitos en los tejidos.
- Estudiar ciclos biológicos y dinámica poblacional.
- Analizar relaciones interparasitarias.
- Comprender algunos aspectos de la terapéutica antiparasitaria.
- Hacer docencia.

Por ello, a continuación se describirán y mostrarán algunos ejemplos en que este tipo de tecnología ha efectuado aportes interesantes en este campo de las Ciencias Veterinarias.

Una contribución importante del MEB se obtiene cuando se aplica para identificar parásitos a través de sus caracteres morfológicos y resolver así difíciles problemas taxonómicos.

En el estudio de las zoonosis parasitarias conocer exactamente por ejemplo que especie de áscaris puede estar parasitando a un canino es esencial, ya que en un alto porcentaje los casos de ascariasis humana (frecuentes en niños) son producidas por la especie *Toxocara canis* (12), pudiendo dar una presentación ocular al alojarse las larvas en el globo ocular y estructuras anexas, trastorno que muchas veces termina con la ablación quirúrgica del órgano afectado.

Un ejemplo de identificación y diferenciación de especies se muestra en la foto 1 con las moscas que comúnmente se hallan sobre el pelaje de los vacunos, teniendo en cuenta los detalles

morfológicos de la cabeza donde aparecen diferencias, por ejemplo, a nivel de ojos y palpos entre *Haematobia irritans irritans*, *Stomoxys calcitrans* y *Musca doméstica* (4)

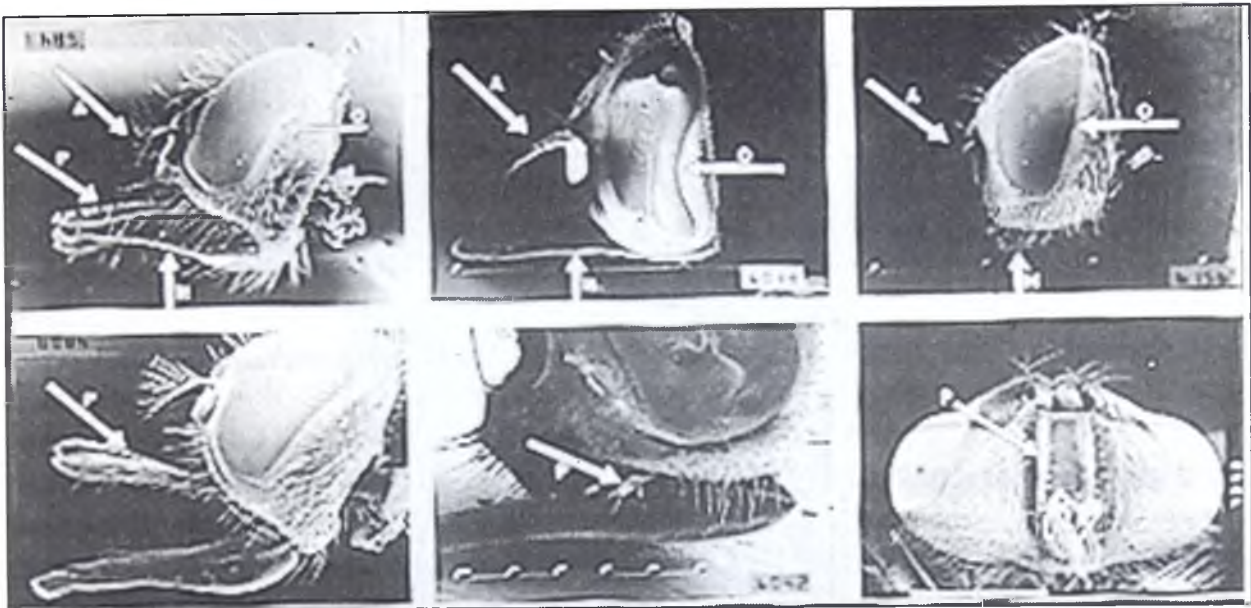


FOTO 1:

Diferenciación entre *Haematobia irritans irritans*, *Stomoxys calcitrans* y *Musca doméstica*.

Fotos de la izquierda, superior e inferior: *Haematobia irritans irritans*

Fotos centrales superior e inferior: *Stomoxys calcitrans*

Fotos de la derecha, superior e inferior, *Musca doméstica*

Abreviaturas: P= palpos; H= proboscide; O= borde posterior de la orbita del ojo; A= antena.

Característica /Especie	<i>H. irritans irritans</i>	<i>S. calcitrans</i>	<i>M. doméstica</i>
Borde posterior de la órbita ocular	Casi recto	cóncavo	ligeramente convexo
Tamaño relativo palpos: probóscide	4/5 o subiguales	menor de 1/3	aprox. 1/2

Una estructura morfológica ampliamente estudiada con el scanning es el órgano de Haller, ubicado en el tarso de la garrapata *Boophilus microplus*, muy

bien fotografiado y descrito por Núñez et. al., 1982 El órgano de Haller (foto 2) posee una depresión anterior (ap) con setas (ap₁₋₅) rugosa y porosa,

propias de receptores químicos y olfatorios y una cápsula posterior (pcp) con una abertura externa (H) en cuyo interior se alojan setas con función olfatoria. Para algunos autores, este

órgano cumpliría un papel importante en la detección del huésped (bovino) a ser parasitado por las larvas de vida libre que se encuentran contaminando las pasturas.

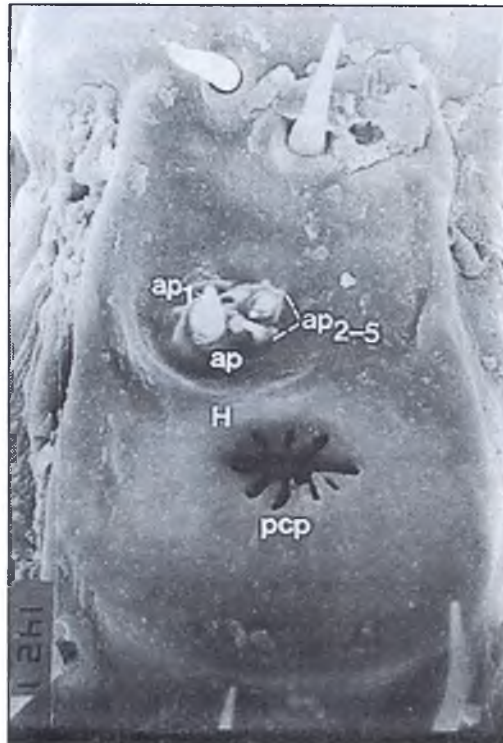


FOTO 2: *Boophilus microplus*, órgano de Haller

Abreviatura: H= abertura externa del órgano de Haller; ap: depresión anterior
ap₁ y ap₂₋₅ = Setas sensoriales; pcp= cápsula posterior.

El *Ancylostoma caninum* es un helminto intestinal que principalmente en regiones tropicales y subtropicales parasita al perro, al gato y al hombre. Al estudiar su extremidad cefálica con un MEB, se observa la presencia de una cápsula bucal bien desarrollada, que con tres pares de dientes y dos placas cortantes (Foto 3). Estas estructuras le permiten alimentarse tanto

con trozos de mucosa intestinal (histiófago) como con sangre (hematófago). Nuestro interés por este parásito radica en que se trata de una zoonosis con casos frecuentes en niños que caminan descalzos sobre terrenos infestados, ya que la larva 3 infectante tiene la capacidad de ingresar al huésped a través de la piel aún intacta de la planta de los pies.

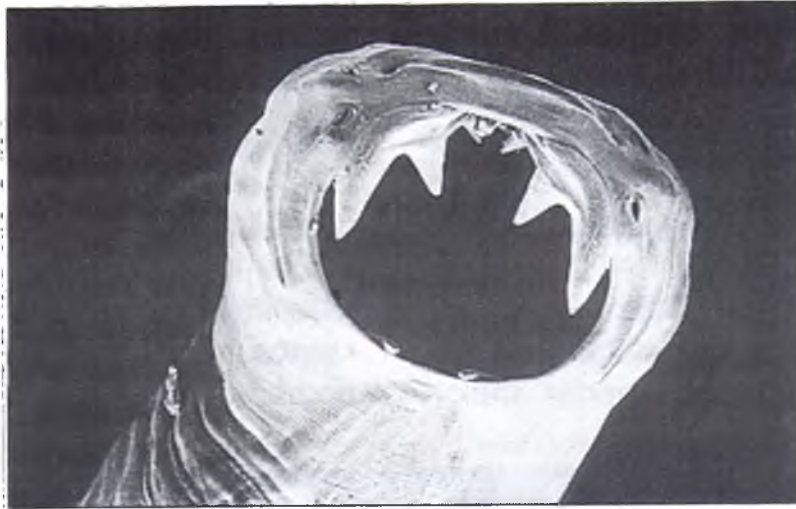


FOTO 3: *Ancylostoma caninum*. Vista de la cápsula bucal

Los artrópodos tienen en general su aparato bucal adaptado al tipo de alimentación que realizan. A modo de ejemplo se muestra aquí un aparato bucal perteneciente a un Ischnocera, *Bovicola (B.) bovis* (foto 4) el piojo masticador del bovino, que posee en la región ventral de su cabeza piezas bucales que integran un aparato masticador típico compuesto por labro, labio, maxilas y mandíbulas alojando

receptores químicos, táctiles y de presión (13).

En cambio, los insectos hematófagos como *Stomoxys calcitrans* o "mosca brava" y *Hematobia irritans irritans* o "mosca de los cuernos", tienen piezas bucales transformadas en un órgano perforante y succionador de sangre denominado probóscide, con forma de tubo, ubicado en ventral de la cabeza.



FOTO 4: *Bovicola (B.) bovis*. Cabeza y tórax en vista ventral.

En la cabeza se observan: pu= pulvillo; lr= labro; mx= maxilas; lb= labio; g= gula; C= conus; las tres regiones de la antena: e= escapo, p= pedicelo y f= flagelo. En el tórax se observan las patas con sus segmentos: cx= coxa; tr=trocanter; fe= fémur; ti= tibia; ta I y II = tarsitos I y II; u= uña.

El extremo libre de este tubo o canal (foto 5) está dotado de dientes en placa adaptados, unos, para la fijación mientras que otros actúan en el limado y raspado, provocando en conjunto laceración y perforación de la piel ⁴.

El conocimiento de estas estructuras, que pueden apreciarse claramente con el MEB, permite comprender mejor

cómo, por ejemplo, los piojos mastica-
dores al no tomar contacto con la san-
gre (porque su aparato bucal no está
adaptado para ello) no pueden ser
bien controlados con formulaciones an-
tiparasitarias de acción sistémica,
efecto que sí se logra cuando con
idénticas formulaciones se ataca a pa-
rásitos hematófagos como los antes
nombrados.

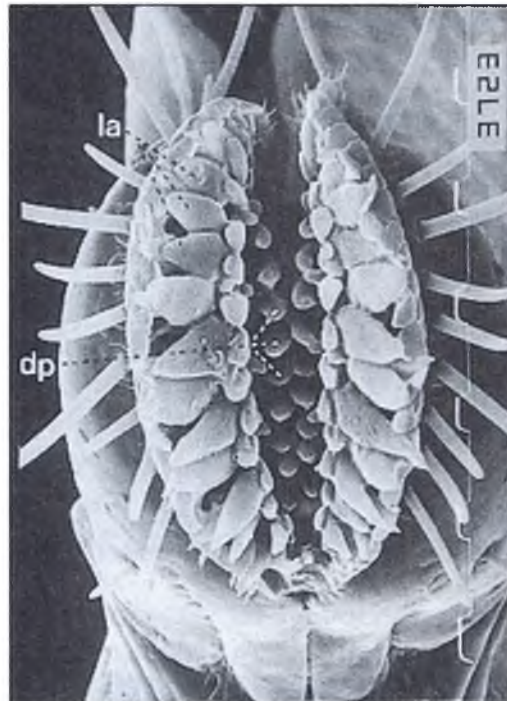


FOTO 5: *Haematobia irritans irritans*. Proboscide: porción distal o libre mostrando las labelas en una vista apical. la= labelas; dp= dientes

Por otro lado, la presencia de dientes y otras estructuras provoca en la piel del hospedador, en este ejemplo los bovinos, microheridas que se aprecian muy bien con el MEB, al estudiar cueros procedentes de animales con infestaciones muy severas por

H. irritans irritans hecho que afecta negativamente a la industria curtidora por considerarlos dañados y de menor valor económico por su menor resistencia debiéndoselos destinar a la elaboración de productos de menor calidad.

Del mismo modo, con la ayuda del scanning, puede comprenderse mejor la lesión nodular ocasionada en la mucosa del intestino delgado de los porcinos por el *Macracanthorhynchus hirudinaceus*. Este parásito de distribución mundial, que pertenece a la clase Acanthocephala (cilíndrico, flácido, algo aplanado y de 10 a 35

cm. de largo) se toma muy fuertemente a la mucosa a través de su probóscide o cabeza ganchuda (2) (por estar cubierta de numerosos ganchitos con forma de espina de rosa) dando origen a lesiones nodulares que pueden apreciarse desde la serosa del órgano al realizarse la necropsia (fotos 6 y 7)



FOTO 6: *Macracanthorhynchus hirudinaceus*. Vista de la extremidad anterior mostrando los típicos ganchos que tapizan la "cabeza" del parásito



FOTO 7: Nótese la lesión nodular (de aspecto blanquecino y centro deprimido) ubicada sobre la mucosa del intestino porcino muy cerca de la extremidad cefálica del *Macracanthorhynchus hirudinaceus*.

Estudios efectuados con el MEB han permitido describir en forma detallada y a nivel ultraestructural la anatomía del huevo de *Haematopinus suis*, un ectoparásito hematófago conocido vulgarmente como piojo chupador, que afecta exclusivamente a los porcinos.

Efectuando cortes en diversos sentidos (transversales, tangenciales, sagitales) sobre varias decenas de huevos o liendres y expuesta la superficie resultante a la observación con el scanning se puede apreciar, en detalle, la conformación anatómica de este estadio del ciclo biológico tan resistente a los diversos factores agresivos del medio ambiente y a la acción ovicida de los distintos compuestos que se emplean para su control.

Anatómicamente, el embrión que se desarrolla en el interior de un huevo está muy bien protegido por la existencia de envolturas (foto 8) que cumplen con diversas funciones, siendo de afuera hacia adentro las siguientes: exocorion, endocorion, membrana vitelina y membrana embrionaria, esta última en estrecho contacto con el embrión. Estas capas actúan en la regulación térmica, evitan el colapso por deshidratación y participan en la eclosión.

Además, una diferenciación del corion llamada "hidrópila coriónica" (que se relaciona con la espumalina, una sustancia higroscópica y adherente que fija las liendres a los pelos) regula el balance hídrico del embrión (14). De esta forma, las envolturas nombradas, por su conformación y disposición, son normalmente resistentes frente a la acción agresiva de los agentes quelantes y/o expoliantes y sustancias tóxicas inhibitorias del desarrollo embrionario presentes en el medio, protegiendo así al embrión. Esta situación explicaría también lo difícil que

resulta encontrar sustancias que posean una buena actividad ovicida frente a este estadio.

La mosca de los cuernos *H. irritans irritans* llegó a los Estados Unidos, procedente de Francia, alrededor de 1885-1886, difundiéndose rápidamente a Canadá (1892), México y Panamá (1904). En 1937 comenzó su expansión por América Latina llegando al norte de Brasil (Roraima) en 1977 y a los estados sureños de Paraná, Santa Catalina y Río Grande do Sul en 1991, simultáneamente con la presencia de focos en Paraguay.

Fue en Octubre de 1991 cuando Luzuriaga detectó por primera vez la presencia de esta plaga en nuestro país, en la provincia de Misiones (15). De allí en más su dispersión a otras provincias fue explosiva y rápida, habiendo alcanzado, en 1993, las provincias patagónicas (9).

Cuando un fenómeno de esta naturaleza acontece (foto 9) en el que la invasión del país por una nueva plaga es un hecho sanitario muy importante, desde lo epidemiológico y lo científico se puede abordar la problemática con un trabajo rápido y superficial o bien seguir un camino de más largo plazo, en base a un trabajo planificado, racional y de resultados más profundos. Este último fue el criterio seguido por la Universidad de Buenos Aires a través de la Facultad de Ciencias Veterinarias, conjuntamente con la Secretaría de Ciencia y Técnica y el Área de Parasitología y Enfermedades Parasitarias de esa Casa de Estudios.

Siguiendo esa última línea se llevaron a cabo diversos estudios sobre la mosca de los cuernos *H. irritans irritans* que abarcaron aspectos relacionados con su biología, morfología, fisiología, enemigos naturales y monitoreo de resistencia en diferentes áreas ganaderas

del país, algunos de cuyos resultados ya se han publicado en revistas de la especialidad (4,17); en este sentido, gran parte de los trabajos científicos realizados se han basado en el uso del MEB como herramienta de rutina.

Al realizar estudios bioecológicos, referidos por ejemplo a dinámica poblacional de *Haematobis irritans*

irritans, la diferenciación de sexos reviste un gran interés. En los dípteros muscoideos el dimorfismo sexual se puede apreciar en los caracteres cefálicos a través del "ancho frontal" en términos de "índice frontal" (I.F.) que es la relación existente entre el menor ancho de la frente y la mayor longitud de ojo.

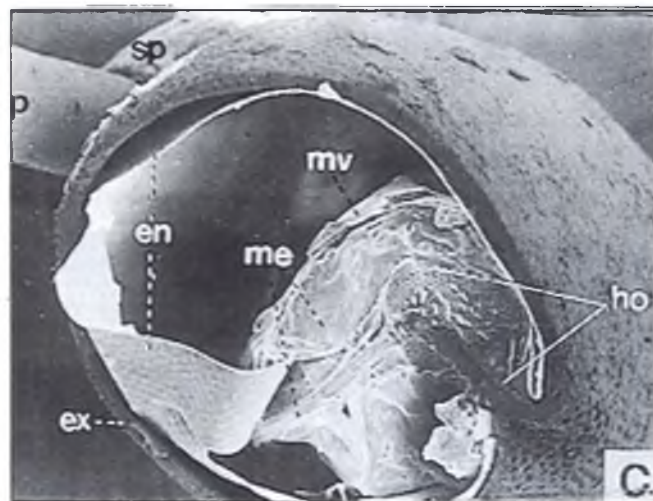


FOTO 8. Huevo de *Haematopinus suis* seccionado transversalmente cerca del opérculo, abreviatura: p= pelo; sp= espumalina; ex= exocorion; en= endocorion; mv= membrana vitelina; me= membrana embrionaria; ho= hatching organ u órgano de eclosión.

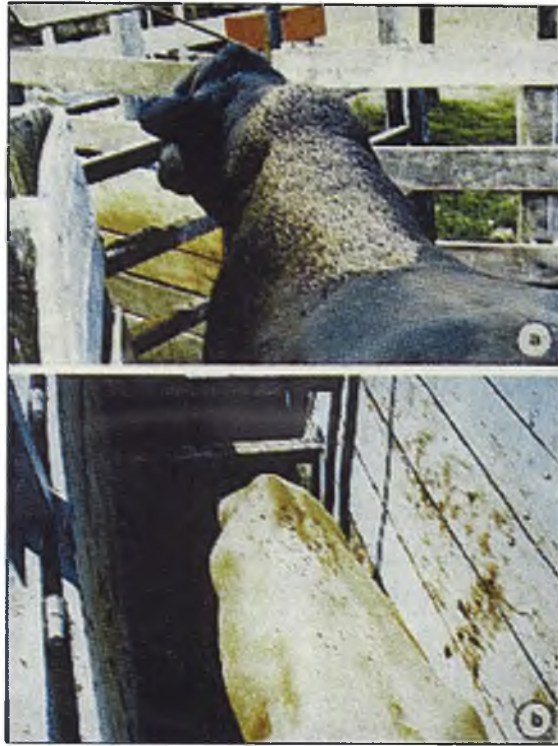


FOTO 9. Bovinos parasitados por *Haematobia irritans irritans*.

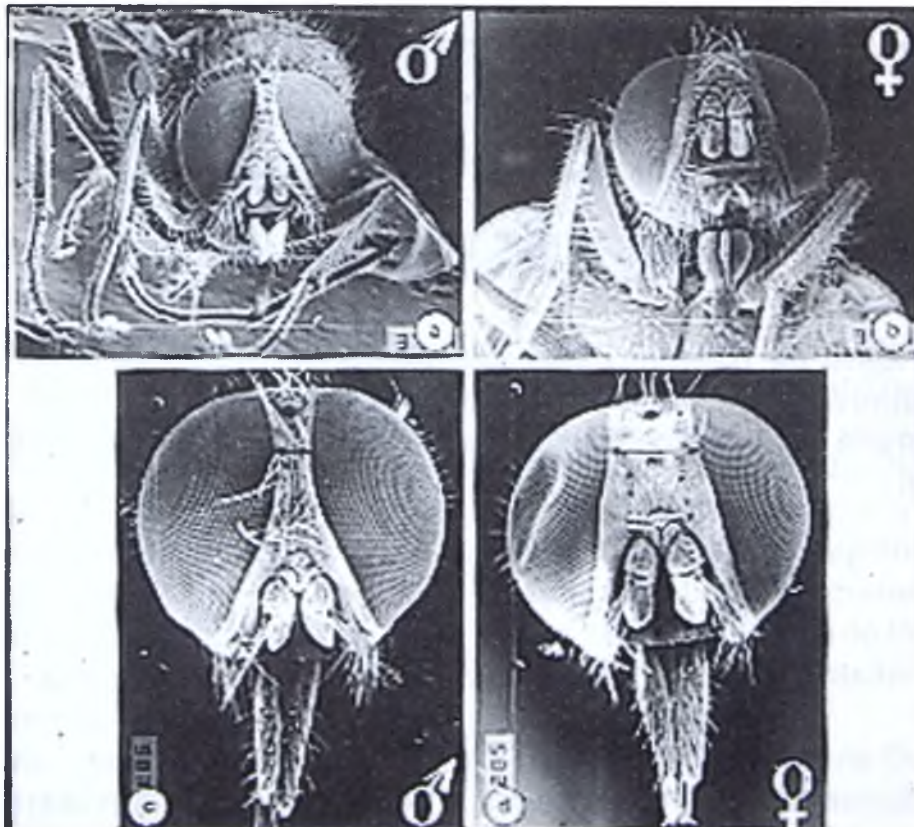


FOTO 10. *Haematobia irritans irritans*. Dimorfismo sexual por caracteres cefálicos. a) macho, vista frontal; b) hembra, vista frontal; c) cabeza masculina, vista frontal; d) cabeza femenina, vista frontal. Abreviatura ei= espacio interorbitario (\leftrightarrow)

Estudios realizados por Cicchino y col., 1994 (4) sobre poblaciones locales de moscas de los cuernos tomadas al azar de diferentes regiones ganaderas del país, sexadas por este método y confirmado por examen de sus genitales, arrojaron resultados de proporción de sexos 1:1 (macho:hembra) o muy cercano a ello. Entonces, para calcular el I.F. se deben realizar mediciones exactas, de la región frontal y de los ojos, y en este aspecto, el MEB es de gran utilidad porque permite obtener una foto de la muestra en estudio en la que aparece una barra con una medida conocida la que es transportada luego sobre la zona a medir para obtener la información buscada.

Desde el punto de vista práctico, resulta muy seguro realizar el sexado de *Haematobia irritans irritans* teniendo en cuenta los caracteres cefálicos, puesto que los machos, por ser de "frente angosta" (ojos más grandes que las hembras, por lo tanto espacio interorbitario más angosto) registran un índice frontal menor al de las hembras, las que poseen "frente ancha". (Foto 10).

Con esta característica evidente pueden separarse machos de hembras "de visu" e "in vivo" en un corto tiempo (4).

En estas microfotografías también pueden observarse los dos ojos compuestos y las antenas trisegmentadas ubicadas en una depresión cefálica (fosa antenal) que llevan órganos sensoriales de función olfativa (18).

Estudiando la presencia de los enemigos naturales de *Haematobia irritans irritans* en el país, además de hallar organismos competidores por el sustrato, desecadores del sustrato, depredadores y parasitoides, se encontraron foréticos (Foto 11), los cuales fueron identificados mediante

Microscopía Electrónica de Barrido como *Siteroptes (Siteroptoides)*, Cross 1965, (Acarina: Actinedidae: Pygmephoridae). Estos ácaros se hallaron foretizados tanto a machos como hembras de *H. irritans irritans* y otros muscoideos, con una prevalencia del 10 al 13% entre los meses de septiembre 1992 a febrero 1993, en el área de San Bernardo, en la provincia de Santa Fe (17).

Este tipo de relaciones muy especial, en la cual un animal (forético) busca activamente y se adhiere a la superficie de otro animal (foretizado) durante un tiempo limitado, representa un mecanismo a través del cual una especie puede ser trasladada desde áreas poco propicias para su desarrollo futuro a otras más adecuadas; esto resulta importante en lo que respecta a la sanidad animal y agrícola porque los artrópodos podrían actuar como difusores de plagas (ejemplo, transportando hongos, ácaros, piojos y otros en forma mecánica), situación que debería estudiarse más profundamente.

Finalmente, y ya como para ir concluyendo esta exposición, deseo destacar muy especialmente un campo al cual el MEB ha realizado importantes aportes y es el relacionado con la Docencia. Ello es debido básicamente a que el material objeto de estudio puede ser registrado fotográficamente, siendo las imágenes obtenidas irremplazables y de muy fácil comprensión, aún para personas no familiarizadas con el tema tratado debido al alto grado de resolución y adecuada profundidad de campo alcanzada en las microfotografías. Este tipo de material bien puede emplearse como recurso didáctico de apoyo en el dictado de clases o conferencias o bien incluirse como material ilustrativo en libros o en la publicación de trabajos científicos,

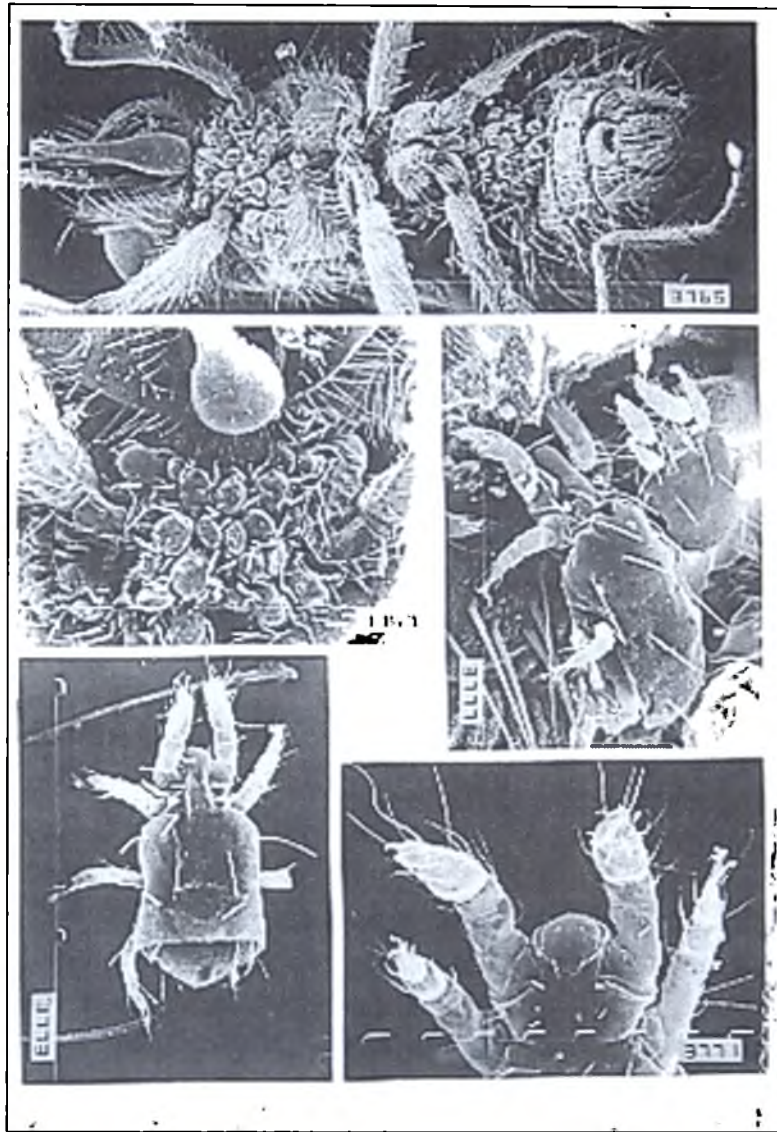


FOTO 11. Siteroptes (Siteroptoides) sp. forético sobre Haematobia irritans irritans.
 Foto superior: vista frontal de la mosca foretizada. En el resto de los cuadros se aprecian detalles de los ácaros Siteroptes.

por nombrar sólo algunas de las aplicaciones en el área de la educación.
 Doy nuevamente las gracias por el

premio recibido y también a Uds miembros del paciente auditorio por la atención demostrada.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Aramburu, H.G. - Comunicación personal, 1996.
- (2) Bases de Parasitología Veterinaria. Editorial Hemisferio Sur S.A., 1988.
- (3) Bolondi, A.; Gaggino, O.; Monesiglio, J. - Microscopio Electrónico Técnicas Generales. Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 1995.
- (4) Cicchino, A.; Abrahamovich, A.; Torres, P.; Núñez, J.; Prieto, O. Mosca de los cuernos, *Haematobia irritans irritans* (L1758). Contribución para su conocimiento en la Argentina. Parte I y II. Revista de Medicina Veterinaria. Vol. 75 (2 y 4), 1994.
- (5) De Vicenzo, N. - Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido. Universidad de Morón. Comunicación personal. 1996.
- (6) Ipohorski, M.; Marrapodi, M. - Microscopía Electrónica de Barrido. Comisión Nacional de Energía Atómica, 1973.
- (7) Kimoto, S.; Russ, J.C. - The Characteristics and Applications of the Scanning Electron Microscope. American Scientist, 57, 1, 1969.
- (8) Lahille, F. - Contribution a l'etude des ixodidés de la Republique Argentine, Min. de Agricultura y Ganadería, Bs. As., 1905.
- (9) Nari, A.; Field, C. - Enfermedades Parasitarias de Importancia Económica en Bovinos. Editorial Hemisferio Sur, 1994.
- (10) Núñez, J.; Muñoz Cobeñas, M.; Moltedo, H. - *Boophilus microplus*. La Garrapata común del Ganado Vacuno. Editorial Hemisferio Sur, Bs. As., Argentina, 1982.
- (11) Núñez, J. y Moltedo, H. - Sarna Psoroptica en Ovinos y Bovinos, Editorial Hemisferio Sur, Bs. As., Argentina, 1985.
- (12) Núñez, J. y col. - Fundamentos de Parasitología Veterinaria. Editorial Hemisferio Sur, Bs. As., 1986.
- (13) Prieto, O.; Cicchino, A.; Abrahamovich, A.; Núñez, J. - Piojos (Phthiraptera) parásitos del Bovino y Porcinos. Parte I. Revista de Medicina Veterinaria. Vol. 72 (4), 1991.
- (14) Prieto, O.; Abrahamovich, A.; Cicchino, A.; Núñez, J. - Características Anatómicas del Huevo de *Haematopinus suis* (Phthiraptera, Anoplura, Haematopinidae) y su relación con la resistencia frente a los factores agresivos del ambiente. Revista de Medicina Veterinaria. Vol. 74 (6), 1993.
- (15) Romano, A.; Ferrari, O. - Mosca de los cuernos, *Hematobia irritans* (L.). 1993
- (16) Thornton, P.R. - Scanning Electron Microscopy. Chapman & Hall. London, 1968.
- (17) Torres, P.; Cicchino, A.; Abrahamovich, A.; Núñez, J.; Prieto, O. Los enemigos naturales de *Haematobia irritans irritans* (Díptero, Muscidae) en dos áreas ganaderas de la Argentina. Revista de Medicina Veterinaria. Vol. 75 (1), 1994.
- (18) White, S.L. & Bay, D.E. - Antennal olfactory sensilla of the horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). J.Kansas Entomol. Soc. 53:641-642, 1980.