

Recolectando corales para histopatología. Guía práctica

Thierry M. Work DVM
U. S. Geological Survey
National Wildlife Health Center
Honolulu Field Station

Traducción-
Jenny Carolina Rodríguez Villalobos
Ecología Marina CICESE
Mexico



National Wildlife Health Center



¿Por qué hacer histopatología en corales?

Los arrecifes de coral enfrentan un deterioro a nivel global a una velocidad sin precedentes, y las enfermedades son un factor de importancia para esto en muchas regiones. Desafortunadamente, en la actualidad sabemos muy poco sobre las causas de las enfermedades coralinas, porque muy poca gente estudia histológicamente, lo que está matando los corales. La histopatología puede ser muy útil en este aspecto puesto que te permite visualizar, a nivel celular, los agentes potenciales asociados con la enfermedad así como la respuesta del hospedero ante estos.

La histopatología es usada rutinariamente para diagnosticar las posibles causas de enfermedad en la vida silvestre. Sin embargo, pocos patólogos de enfermedades animales están estudiando las lesiones en los corales. Un obstáculo significativo para involucrar veterinarios y otro tipo de patólogos de animales en el estudio de las enfermedades coralinas, ha sido la falta de guías amigables para el usuario que expliquen la manera como se deben coleccionar y procesar los corales para histopatología.

Este manual busca corregir esta situación enfocándose, de una manera accesible, en lo que se necesita para recolectar adecuadamente muestras de coral para histopatología. Esta guía NO proporciona información sobre la forma de censar enfermedades o estudiar la salud coralina desde una perspectiva amplia. El estudio de las enfermedades coralinas, es un tema extenso que debe incluir la participación de patólogos animales y de ecólogos coralinos para realizarse de la mejor manera.



IMPORTANTE: Por favor tenga en cuenta que las especies coralinas están protegidas en muchas áreas y no pueden ser recolectadas sin los permisos apropiados. Los usuarios de este manual REQUIEREN URGENTEMENTE familiarizarse con las leyes y regulaciones de las regiones y países en donde trabajen para asegurarse de contar con todos los permisos PREVIO a realizar las actividades descritas aquí. También se asume que los usuarios están familiarizados con el buceo autónomo y específicamente, lo requerido por el buceo científico y los riesgos asociados con ello. Los procedimientos aquí descritos, requieren el uso de herramientas y equipo fotográfico submarino, por lo que el buzo debe sentirse cómodo durante los buceos para realizar estas actividades.

Materiales necesarios para recolectar y procesar los corales para histopatología

Artículo	Propósito
Bolsa de malla	Transportar las bolsas plásticas bajo el agua
Pinzas	Útil para extraer muestras de corales ramificados
Nucleador	Útil para extraer muestras de corales masivos. Utilizo nucleador de madera (aproximadamente 4-5 cm de diámetro) y adaptor.
Cinzel	Igual que el anterior
Bolsa para las herramientas	Para transportar las pinzas, el nucleador y el cinzel

Martillo	Necesario para utilizar el nucleador y el cincel. Consigue uno que sea de al menos 2kg, puesto que esto facilitará martillar bajo el agua
Bolsas plásticas de colecta	Para guardar las muestras de coral. Las bolsas whirlpaks medianas o equivalente funcionan muy bien.
Cámara sumergible	Utilizada para tomar fotografías de las lesiones. Conoce tu cámara y aprende cómo usarla
Escala	Incluída en las fotografías para ayudar en las mediciones. Utilizo un pieza de 10 cm de largo y $\frac{3}{4}$ de pulgada de PVC blanco enganchado a mi cámara.
Fijador*	Preserva las muestras de coral para histopatología
Botella para mezclar	Para mezclar y diluir el fijador.
Guantes plásticos	Para proteger las manos mientras trabajas con las soluciones fijadoras
Frascos de plásticos	Para fijar las muestras de coral en el campo. Frascos de muestras de orina de 100 ml son económicos y funcionan bien
Papel sumergible	Utilizado para registrar los datos sobre una base de información
Marcador indeleble	Para marcar los frascos y bolsas
Cubeta plástica	Para tener todo el equipo de campo junto y en un solo lugar
Tabla acrílica	Utilizada para sostener las hojas de datos. Asegúrate de que las hojas estén bien seguras sobre la tabla. Yo amarro un lápiz No. 2 a la tabla mediante manguera de goma y cables.
Solución descalcificadora	Utilizada para descalcificar corales antes del corte para histopatología. Utilizamos CalExII de Fisher Scientific pero otras soluciones descalcificadoras comerciales disponibles también funcionan



TRABAJANDO CON FIJADORES: El fijador adecuado para corales es Zinc-Formalina disponible en [Anatech](#) (Zfix concentrado Cat. 171). Si este fijador no está disponible en tu región, entonces formalina neutralizada es el siguiente mejor reactivo fácilmente disponible. Éste puede obtenerse mezclando 15 partes de formaldehído al 37% con 85 partes de agua de mar. Los fijadores son PELIGROSOS y deben ser manipulados en áreas bien ventiladas utilizando guantes de caucho.

Un vistazo al proceso



1) Antes del buceo:

Preparar bolsas para recolección, equipo, hojas sumergibles y cámara.



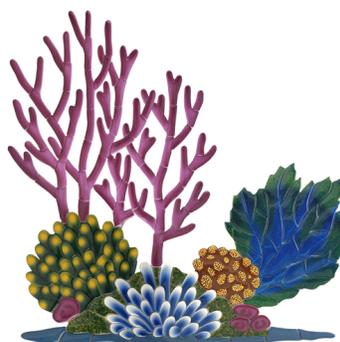
2) Buceo: Tomar fotografías de las lesiones, recolectar muestras y registrar información.



3) Después del buceo: Tomar fotografías de los fragmentos, fijar las muestras, registrar



4) Preparación histológica: preparar y etiquetar las muestras, descalcificar, recortar para histopatología.



ANTES DEL BUCEO

1) Preparar las bolsas para la recolecta: numerar las bolsas con anticipación de 1-20 (o más si planeas recolectar más corales durante un buceo en particular). Por experiencia, 20 bolsas usualmente son suficientes para un buceo. Si se utilizan Whirl-Packs®, asegúrate de remover las pestañas de plástico con anterioridad.

2) Tabla acrílica: Asegúrate que el papel sumergible y lápiz están apropiadamente asegurados en la tabla y que llevas un lápiz adicional.

3) Herramientas: Las pinzas, nucleador, y cincel, deben estar en una misma bolsa de malla colgada al chaleco compensador. El martillo puede ir independientemente colgado al chaleco.

4) Cámara: Asegúrate que la batería esté cargada, la tarjeta de memoria instalada, el housing cerrado correctamente y las configuración de fotografía sean adecuadas. Asegúrate de llevar una escala. Un trozo de PVC blanco de 10 cm es lo que uso.



1) Bajo el agua: Ajusta el blanco de la cámara en la profundidad de trabajo (consulta el manual de la cámara para las instrucciones del balance de blancos). Hacer esto mejora considerablemente la fidelidad y calidad de las fotos.



Foto sin balance de blancos. Nota como todo se ve azul y desteñido.



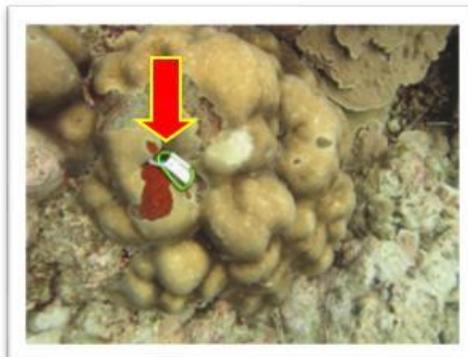
Foto con balance de blancos. Nota una mayor variedad y fidelidad de los colores.

2) Fotografiando corales: Cuando se encuentre un coral enfermo, saca una bolsa previamente enumerada (el orden no importa), toma una fotografía de la colonia con la bolsa, y registra el número de la bolsa. Esto te ayudará después a saber qué muestras corresponden con cada foto. A mí me gusta tomar fotos de la colonia completa y dependiendo del tamaño de la lesión, fotos de mediana y corta distancia. Utilizar una barra de escala en las fotos es útil puesto que sirve como

referencia si se quieren hacer análisis posteriores relacionados con el tamaño de la lesión o de la colonia. Asegúrate de tomar múltiples fotografías pues seguramente algunas no resultarán. Las fotos son **EXTREMADAMENTE IMPORTANTES** pues proveen información macroscópica de las lesiones y son esencialmente, análogas a las observaciones de una necropsia.



Fotografía de la colonia con una bolsa numerada que ayuda a hacer seguimiento a las muestras.



Fotografía de una colonia con una barra de escala (flecha).

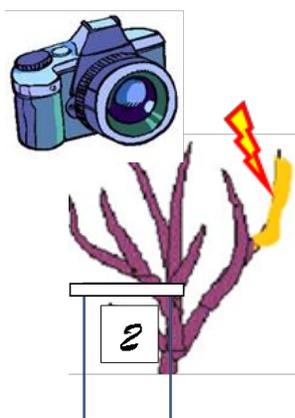


Acercamiento a una lesión

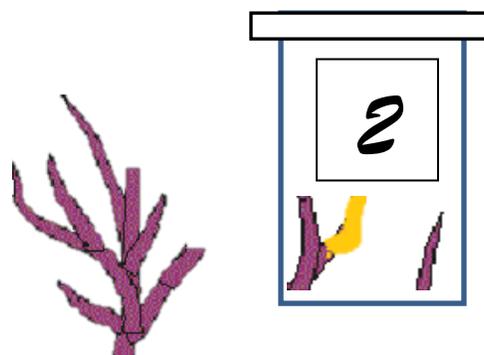
3) Extracción de muestras de coral: los corales tienen varias morfologías que van desde ramificaciones delgadas hasta estructuras a manera de piedra. El reto en el muestreo es asegurarse de conseguir muestras adecuadas con un daño mínimo a la colonia. De tal manera, es importante utilizar un buen criterio y si una lesión está localizada en una región cuyo muestreo afecte la colonia, es mejor no hacerlo. Las pinzas son ideales para colonias ramificadas, mientras que cinceles y nucleadores son más apropiados para colonias masivas. Al realizar muestreo de lesiones, es importante tener tanto tejido sano como afectado en un mismo fragmento. También es importante tener pares de muestras, con tejido no afectado o “normal” de la misma colonia, ya que esto ayudará en la interpretación histológica.



Coral con lesión



Fotografía con una bolsa en el frente



Recolectar fragmentos con lesión y fragmentos normales en una bolsa con agua de mar

 **PRECAUCIÓN:** Muchas Veces, la gente piensa estar recolectando tejido vivo de coral, pero en realidad todo está muerto y no hay nada para procesar histológicamente. Esto es un problema particularmente con la pérdida de tejido. Se debe prestar atención a dónde se encuentra el margen del tejido. Algunas fotografías de ejemplo de dónde se desea muestrear en realidad.



4) Poner las muestras en las bolsas: La bolsa numerada que utilizaste para tomar la fotografía es dónde se almacenarán las muestras pareadas normales y enfermas. Asegúrate que la bolsa de recolección está sellada con suficiente agua de mar para proteger las muestras mientras se transportan en la bolsa de malla.



La bolsa debe estar sellada y con suficiente agua de mar para proteger las muestras durante el buceo.

5) Registro de datos: Registrar el número del buceo, el número de la bolsa, una breve (1-3 palabras) descripción de la lesión y el género/especie de la colonia en la hoja de datos.

Fecha: 3 de junio

Localidad: Woleai

Buceo 1:

Bolsa 6 A: Cytherea pérdida aguda de tejido

Bolsa 1 p: Compressa cambio de coloración

Bolsa 3 p: Compressa pérdida de tejido sub-aguda

DESPUÉS DEL BUCEO

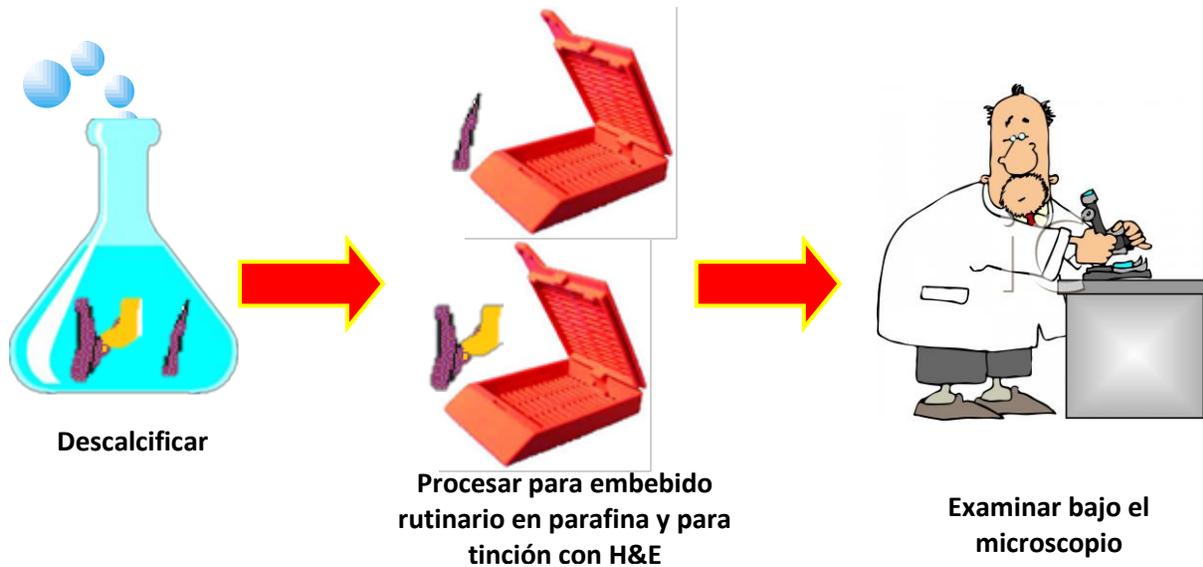
Una vez de regreso al bote, es crítico que los fragmentos de coral sean puestos en solución fijadora tan pronto como sea posible. Hacerlo siguiendo los siguientes pasos:

1) Fotografiar los fragmentos: Esto es importante puesto que los corales perderán su color con la fijación. Tener una fotografía real de los fragmentos y la lesión ayudará grandemente cuando se está descalcificando y recortando los corales para la histopatología. Generalmente tengo una manera estandarizada de fotografiar los fragmentos con el lado normal hacia la izquierda y el lesionado hacia la derecha.



4) Envío de fragmentos: Si planeas enviar los fragmentos por correo o por barco, drena todo el fijador del frasco y empácalo con toallas de papel humedecidas en la solución fijadora. Esto previene que las muestras se muevan de un lugar a otro durante el transporte y puedan dañarse.

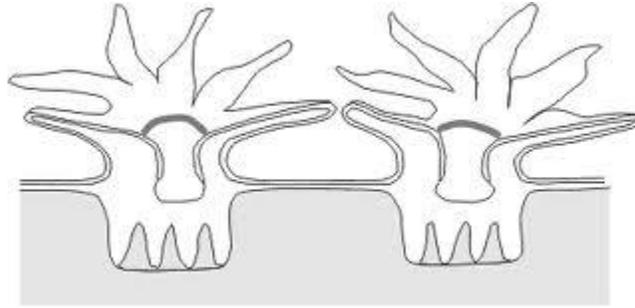
PREPARACIÓN HISTOLÓGICA



- 1) **Descalcificación:** Utilizamos Cal-Ex II de Fisher Scientific que es una mezcla de ácido fórmico y formaldehído. Éste normalmente descalcifica en 2-3 días. Si no lo puedes conseguir, cualquier otra solución descalcificadora comercial disponible funcionará. EDTA también funciona pero toma mucho tiempo (días a semanas).
- 2) **Recorte:** los tejidos de coral son cortados como cualquier otro tejido animal. Puedes referenciar el corte mirando las fotografías de los fragmentos que tomaste con anterioridad para asegurarte que estás cortando a través de la sección real de la lesión. Los tejidos los ponemos en cassetes y los enviamos a un laboratorio comercial de histología que los impregna en parafina, los corta y los tiñe con hematoxilina y eosina.



NOTA: En algunos géneros (Acroporidae), los tejidos colapsarán completamente tras la descalcificación, por lo que el recorte de estos se hará de la mejor manera mirando las fotos de los fragmentos frescos (ver arriba). En otros géneros (Porites, Pavona, Astreopora), los tejidos retienen su arquitectura. En estos casos, cortamos secciones sagitales para visualizar desde la epidermis hasta el esqueleto.



Sección sagital de los corales

- 3) Examinar bajo el microscopio: Aquí es donde el verdadero trabajo comienza. Solamente puedes aprender a interpretar apropiadamente las lesiones con práctica, pero al final, encontrarás que el esfuerzo vale la pena. Muchos artículos en histología de corales existen en la literatura, y una buena manera de empezar a aprender acerca de la histología de corales está disponible [aquí](#).

EXENCIÓN DE RESPONSABILIDAD

Las menciones o uso de los productos o de las marcas no implican aprobación del Gobierno de los Estados Unidos.