



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE BIOLOGÍA

ÁREA TEMÁTICA
ECOLOGÍA Y CONSERVACIÓN

**Parámetros hematológicos de la tilapia nilótica
(*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1757) bajo
diferentes condiciones de cultivo**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

BIOL. IVETTE MARAI VILLA VILLASEÑOR

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ANTONIO CAMPOS MENDOZA

CO-DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. SALVADOR PADILLA ARELLANES



MORELIA, MICHOACÁN.

JUNIO 2016.

DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis metas.

A mis padres Natividad y Rodrigo, por ser mi apoyo incondicional.

A mi esposo Valentín por ser todo, mi apoyo, mi motor, mi ejemplo a seguir, el que siempre está ahí incluso para ayudarme a levantar, el que me cuida y se preocupa por mí.

A mis hermanos por ayudarme en todo momento.

A mis padres adoptivos Teresita y Valentín por apoyarme y darme de comer.

A mis abuelos Remedios y Elías, por dejarme vivir en su casa y brindarme su apoyo cuando lo he necesitado.



AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Dr. Antonio Campos por el apoyo emocional y financiero brindado para la realización de esta tesis. Le debo su apoyo, su dedicación hacia nuestro trabajo. Le agradezco creer en mí y confiar en mis habilidades.

Una mención especial se merecen los miembros de mi comité revisor, cinco grandes investigadores que sin importar lo mucho que están ocupados siempre me hacen un espacio y tienen paciencia para atenderme.


Al Dr. Salvador Padilla por guiarme durante este proceso, por enseñarme las técnicas, por prestarme el área de trabajo y sus valiosas revisiones a nuestro trabajo.

A la Dra. Rebeca Rueda por prestarme el microscopio para la observación de los frotis y sus valiosas correcciones a nuestro trabajo.

A la Dra. María Cristina Chávez por sus valiosas correcciones y sus preguntas que hacen pensar.

A la Dra. Alma Lilia Fuentes por sus valiosas revisiones a nuestro trabajo e invitarme a los cursos realizados en el INIRENA.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante la duración de la maestría, ya que sin el soporte financiero a través de la beca recibida no hubiera sido posible este trabajo.



IVETTE MARAI VILLA VILLASEÑOR

A mi familia Mango, Pango, Enanin y Adan por ayudarme a terminar mis experimentos y no dejarme sola.

A mi mamá y papá por motivarme a terminar.

A mis compañeros de laboratorio Isaac, Manuel, Ceci, Lalo, Luis, Miguel, Isabela, Karla y Diego por estar ahí conmigo.

Se agradece a todas aquellas personas que en forma directa o indirecta contribuyeron a que este trabajo de investigación pudiera llevarse a cabo.



ÍNDICE

ÍNDICE	i
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	v
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES	viii
GLOSARIO DE TÉRMINOS	ix
1. RESUMEN GENERAL	x
2. SUMMARY	xi
3. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
4. ANTECEDENTES	3
4.1. Modelo de estudio.....	3
4.1.1. Características biológicas de la tilapia nilótica	3
4.1.2. Importancia económica.....	3
4.1.3. Producción mundial	4
4.1.4. Producción en México.....	4
4.1.5. Condiciones medioambientales óptimas y efecto de su variación para el cultivo.....	5
4.2. Estrés en peces	8
4.2.1. Respuesta de los peces al estrés	9
4.2.2. Indicadores de estrés.....	14
4.2.3. Impacto del estrés en el rendimiento	15
4.3. Hematología en peces	18
4.3.1. Eritrocitos.....	18
4.3.2. Leucocitos.....	18
4.3.3. Trombocitos	20
4.3.4. Hematopoyesis	20

4.3.5. Órganos hematopoyéticos	21
4.3.6. Cambios en los parámetros hematológicos causados por estrés.....	22
4.3.7. Anestesia	23
4.3.8. Anticoagulantes	24
4.4. Estudios de los parámetros hematológicos en <i>O. niloticus</i> y su relación con los agentes estresantes.....	25
5. JUSTIFICACIÓN	31
6. HIPÓTESIS	32
7. OBJETIVOS.....	33
7.1. Objetivo General	33
7.2. Objetivos Particulares	33
8. LITERATURA CITADA	34
9. CAPITULO I.....	41
9.1. Parámetros hematológicos de referencia de la tilapia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i> , Linnaeus 1757) bajo condiciones óptimas de cultivo	41
9.1.1. Resumen	41
9.1.2. Abstract.....	41
9.1.3. Introducción	42
9.1.4. Materiales y Métodos.....	43
9.1.5. Resultados.....	48
9.1.6. Discusión	52
9.1.7. Conclusión	54
9.1.8. Literatura Citada	55
9.2. Influencia del sexo en los parámetros hematológicos de la tilapia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i> , Linnaeus 1757) de hembras Stirling, machos Stirling y Supermachos.....	58

9.2.1. Resumen	58
9.2.2. Abstract.....	58
9.2.3. Introducción	59
9.2.4. Materiales y Métodos.....	59
9.2.5. Resultados.....	63
9.2.6. Discusión	69
9.2.7. Conclusión	71
9.2.8. Literatura Citada	71
9.3. Variaciones hematológicas en la tilapia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i> , Linnaeus 1757) provocadas por el efecto de un gradiente altitudinal de 0-2000 msnm	75
9.3.1. Resumen	75
9.3.2. Abstract.....	75
9.3.3. Introducción	76
9.3.4. Materiales y Métodos.....	76
9.3.5. Resultados.....	80
9.3.6. Discusión	95
9.3.7. Conclusión	98
9.3.8. Literatura Citada	98
10. CAPITULO II.....	103
10.1. Variación en los parámetros hematológicos de la tilapia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i> , Linnaeus 1757) provocadas por un estresor ambiental: disminución de la temperatura del agua de 28 a 22 °C.	103
10.1.1. Resumen	103
10.1.2. Abstract.....	103
10.1.3. Introducción	104

10.1.4. Materiales y Métodos.....	105
10.1.5. Resultados.....	111
10.1.6. Discusión	116
10.1.7. Conclusión	119
10.1.8. Literatura Citada	119
11. DISCUSIÓN GENERAL	123
12. CONCLUSIONES GENERALES	126
13. LITERATURA CITADA	127
14. ANEXOS	129

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros

Cuadro 1. Trabajos publicados en los que se determinan los parámetros hematológicos de referencia en <i>O. niloticus</i>	25
Cuadro 2. Trabajos publicados en los que se determinan las variaciones en los parámetros hematológicos en <i>O. niloticus</i> , provocadas por agentes estresantes ambientales.	27
Cuadro 3. Trabajos publicados en los que se determinan las variaciones en los parámetros hematológicos en <i>O. niloticus</i> , provocadas por agentes estresantes físicos.	29
Cuadro 4. Trabajos publicados en los que se determinan las variaciones en los parámetros hematológicos en <i>O. niloticus</i> , provocadas por agentes estresantes ambientales.	30
Cuadro 5. Parámetros físico-químicos óptimos del agua para el cultivo de tilapia (INP, 2011).	44
Cuadro 6. Parámetros físicos y químicos del agua, promedio y error estándar.	48
Cuadro 7. Parámetros hematológicos de referencia para <i>Oreochromis niloticus</i>	49
Cuadro 8. Células sanguíneas de <i>Oreochromis niloticus</i> , promedio.	49
Cuadro 9. Concentraciones hemáticas de <i>Oreochromis niloticus</i> según varios autores.	53
Cuadro 10. Parámetros físicos y químicos del agua, promedio y error estándar.	63
Cuadro 11. Parámetros físicos y químicos del agua de las diferentes granjas.	81
Cuadro 12. Eigenvectores, dirección e intensidad de efecto de los componentes principales (CP), dada por los primeros tres componentes principales (Eigenvalores).	85
Cuadro 13. Eigenvectores, dirección e intensidad de efecto de los componentes principales (CP), dada por los primeros tres componentes principales (Eigenvalores).	94
Cuadro 14. Valores hematológicos de las diferentes granjas comparados con los parámetros hematológicos de referencia de la tilapia <i>O. niloticus</i>	95
Cuadro 15. Parámetros físicos y químicos del agua, promedio y error estándar. ...	111

Figuras

Figura 1. Respuesta de los peces al estrés.....	13
Figura 2. Células sanguíneas de <i>O. niloticus</i> , eritrocito (E), neutrófilo (N), trombocito (T) (Villa-Villaseñor).....	20
Figura 3. Peso y longitud patrón de los organismos de tres tratamientos: Hembras (H), Machos (M) y Supermachos (S). Letras diferentes indican diferencias significativas.	65
Figura 4. Parámetros hematológicos de tres tratamientos: Hembras (H), Machos (M) y Supermachos (S). Letras diferentes indican diferencias significativas.	66
Figura 5. Tamaño de las células, medidas: citoplasma largo (C.L.), citoplasma ancho (C.A.), núcleo largo (N.L.) y núcleo ancho (N.A.), entre tratamientos: hembras (H), machos (M) y supermachos (S). Letras diferentes indican diferencias significativas.	68
Figura 6. Análisis de clúster con los parámetros físicos y químicos del agua.	81
Figura 7. Granjas del estado de Michoacán: Jauja (a), Las Parotas (b), El Piojito (c) y La Unidad Acuícola de Morelia (d).	83
Figura 8. ACP con los parámetros físicos y químicos del agua, 1: granja Jauja, 2: granja Las Parotas, 3: granja El Piojito y 4: Unidad Acuícola de Morelia.	84
Figura 9. Peso y longitud patrón de los organismos de cuatro granjas: Jauja (L), Las Parotas (N), El Piojito (P) y Unidad Acuícola de Morelia (M). Letras diferentes indican diferencias significativas.....	86
Figura 10. Parámetros hematológicos de cuatro granjas: Jauja (L), Las Parotas (N), El Piojito (P) y Unidad Acuícola de Morelia (M). Letras diferentes indican diferencias significativas.	88
Figura 11. Parámetros hematológicos de cuatro granjas: Jauja (L), Las Parotas (N), El Piojito (P) y Unidad Acuícola de Morelia (M). Letras diferentes indican diferencias significativas.	89
Figura 12. Tamaño de las células, medidas: citoplasma largo (C.L.), citoplasma ancho (C.A.), núcleo largo (N.L.) y núcleo ancho (N.A.), entre granjas: Jauja (L), Las Parotas (N), El Piojito (P) y Unidad Acuícola de Morelia (M). Letras diferentes indican diferencias significativas.....	90

Figura 13. Tamaño de las células, medidas: citoplasma largo (C.L.), citoplasma ancho (C.A.), núcleo largo (N.L.) y núcleo ancho (N.A.), entre granjas: Jauja (L), Las Parotas (N), El Piojito (P) y Unidad Acuícola de Morelia (M). Letras diferentes indican diferencias significativas..... 91

Figura 14. ACP con los parámetros físicos y químicos del agua y parámetros hematológicos. Rosa: granja Jauja, azul: granja Las Parotas, verde: granja El Piojito y amarillo: Unidad Acuícola de Morelia. 93

Figura 15. Diagrama del sistema de recirculación y tratamientos utilizados en la prueba de agentes estresantes ambientales: disminución de la temperatura. 107

Figura 16. Peso y longitud patrón de los organismos de tres tratamientos: Tratamiento A (A), tratamiento B (B) y tratamiento C (C). Letras diferentes indican diferencias significativas..... 112

Figura 17. Parámetros hematológicos de los organismos de tres tratamientos: Tratamiento A (A), tratamiento B (B) y tratamiento C (C). Letras diferentes indican diferencias significativas..... 113

Figura 18. Parámetros hematológicos de los organismos de tres tratamientos: Tratamiento A (A), tratamiento B (B) y tratamiento C (C). Letras diferentes indican diferencias significativas..... 114

Figura 19. Factor de Condición de Fulton. Letras diferentes indican diferencias significativas. 115

Figura 20. Tamaño de la célula Eritrocito Maduro, medidas: citoplasma largo (C.L.), citoplasma ancho (C.A.), núcleo largo (N.L.) y núcleo ancho (N.A.), entre tratamientos: tratamiento (A), tratamiento (B) y tratamiento (C). Letras diferentes indican diferencias significativas. 116

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES

CGMH:	Concentración globular media de hemoglobina
cm:	Centímetros
fL:	Femtolitro
g:	Gramos
Hb:	Hemoglobina
Hcto:	Hematocrito
L:	Litros
mg:	Miligramos
mL:	Mililitro
mm:	Milímetro
mmHg:	Milímetros de mercurio
msnm:	Metros sobre el nivel del mar
nm:	Nanómetro
ppt:	Partes por trillón
RGB:	Recuento de glóbulos blancos
RGR:	Recuento de glóbulos rojos
rpm:	Revoluciones por minuto
TDS:	Total de sólidos disueltos
Us/cm:	Unidad para medir conductividad
VGM:	Velocidad globular media
VSE:	Velocidad de sedimentación eritrocitaria
%:	Porcentaje
µm:	Micrómetro
°C:	Grados celsius

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Amitosis: división celular directa por estrangulación sencilla del núcleo, forma atípica de mitosis.

Anemia: disminución del número de glóbulos rojos o eritrocitos en la sangre periférica y por ende disminución de la hemoglobina.

Anemia hemolítica: conjunto de trastornos que provocan la destrucción eritrocitaria.

Anemia hipocromicas: anemia que se caracteriza por un menor contenido de hemoglobina en los eritrocitos.

Anemia normocrómica microcítica: la anemia está descrita en un sistema de clasificación, en función del contenido de hemoglobina de los eritrocitos (normocrómica – normal) y en función de las diferencias de tamaño de éstos (microcítica – pequeños).

Eritroplastidos: eritrocito que ha perdido el núcleo.

Leucocitosis: aumento del número de leucocitos o glóbulos blancos en la sangre periférica.

Linfocitosis: elevación de linfocitos en la sangre periférica.

Linfopenia: disminución de linfocitos en la sangre periférica.

Monocitosis: aumento de monocitos en la sangre periférica.

Neutrofilia: aumento de neutrófilos en la sangre periférica.

Policitemia: aumento del hematocrito.

Policromatocitos: eritrocitos o glóbulos rojos inmaduros en la sangre periférica.

Trombocitopenia: aumento de los trombocitos en la sangre periférica.

1. RESUMEN GENERAL

La tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), es una de las especies más utilizada para cultivos comerciales y representa una opción económicamente viable debido a sus atributos para el mercado. Sin embargo, uno de los factores que puede limitar la producción de tilapia en la acuicultura es el estrés presente en los organismos, el cual puede causar un retraso en su crecimiento, fallos en la reproducción o una alta susceptibilidad a agentes patógenos. El objetivo de la presente investigación fue establecer los parámetros hematológicos de referencia de la tilapia *O. niloticus* bajo condiciones óptimas de cultivo y su variación en los organismos dependiendo del sexo, la altitud y de agentes estresantes ambientales. Para obtener los parámetros hematológicos se realizaron toma de muestras de sangre de diversos organismos mediante punción de la vena caudal. Los análisis incluyeron: velocidad de sedimentación eritrocitaria, hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos, glóbulos blancos, morfología eritrocitaria y leucocitaria. Como resultados se encontraron que el sexo de los organismos no influye en los parámetros hematológicos entre machos y hembras de *O. niloticus*. La altitud no tiene un efecto en los parámetros hematológicos de la tilapia. Sin embargo la concentración de oxígeno disuelto en el agua resulto importante debido a que en una menor concentración hay un mayor número de eritrocitos, los cuales tienen un menor tamaño. La disminución de la temperatura del agua causó estrés agudo en los organismos de *O. niloticus*, lo que se refleja en un aumento de hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos e índice N/L por parte de los organismos estresados a diferencia de los organismos control. En conclusión los parámetros hematológicos son buenos indicadores de cambios originados por estrés agudo.

Palabras Clave: Estrés, peces, células sanguíneas, hemograma, N/L.

2. SUMMARY

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is one of the most farmed fish for a commercial purpose and represents an economically viable option due to its attributes for the market. However, one of the factors that can limit the production of tilapia in aquaculture is the stress present in organisms, which can cause a delay in growth, reproductive failure or high susceptibility to pathogens. The aim of this research was to establish a baseline of the haematological parameters of tilapia *O. niloticus* under optimal culture conditions and the variation of haematological parameters depending on sex, altitude and environmental stressors. Blood sampling from organisms were made by puncturing the tail vein. Analyses included sedimentation rate, hematocrit, hemoglobin, red blood cells, white blood cells, red blood cell and white blood cell morphology. The results showed that the sex of the organisms does not affect haematological parameters between males and females of *O. niloticus*. The altitude has no effect on hematologic parameters of tilapia. However the concentration of oxygen dissolved in the water was important, in a lower concentrations the number of erythrocytes increase, but in a smaller size. Decreasing water temperature causes an acute stress in fishes inducing a increase in hematocrit, hemoglobin, red blood cell count, White blood cell count and index N/L of stressed organisms in contrast with the control organisms. In conclusión hematological parameters are good indicators of changes caused by acute stress.

Keywords: Stress, fish, blood cells, blood count, N / L.

3. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las tilapias son peces originarios de África y el Cercano Oriente, pertenecen a la familia Cichlidae y son el segundo grupo de peces con mayor producción a través de la acuicultura mundial (Hrubec *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2002; Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011). Las tilapias contribuyen a la producción por acuicultura con aproximadamente 20 % del volumen total de peces (FAO, 2015). Esto es resultado de los atributos que presentan tales como: rápido crecimiento, tolerancia a altas densidades, adaptación a cautiverio, aceptación de una amplia gama de alimentos, alta resistencia a enfermedades, capacidad para sobrevivir a bajas concentraciones de oxígeno y a diferentes salinidades (Watanabe *et al.*, 2002; Castro-Rivera *et al.*, 2004; Arroyo-Damián, 2008; Peña-Mendoza *et al.*, 2011). Adicionalmente, las tilapias cuentan con algunos atributos para el mercado, entre los que se incluyen: carne blanca de buena calidad, buen sabor, poca espina, buena talla y precio accesible. Dentro de este grupo, la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) es la especie más cultivada con una contribución a la producción total de tilapias de aproximadamente 80 % (Basualdo-Ramírez *et al.*, 2012).

Debido a la creciente demanda de este producto alimenticio, con el fin de incrementar las ganancias, muchos productores de tilapia han adoptado sistemas intensivos de cultivo. En estos sistemas confluyen diversos estresores que pueden comprometer el crecimiento, salud de los peces y predisponerlos a enfermedades, lo cual representa un problema para las prácticas actuales de la acuicultura (Silveira-Coffigny, 2005).

Por lo anterior, se han buscado desarrollar índices que permitan evaluar la capacidad de respuesta de los animales ante el estrés y de esta manera emplear medidas correctivas, con el fin de asegurar supervivencia y mejorar el rendimiento en los cultivos de peces. Las respuestas de los organismos ante el estrés se clasifican en tres niveles: primaria, secundaria y terciaria. Las respuestas primarias típicas usadas para evaluar el estrés en los peces incluyen la determinación de los niveles

de cortisol y en menor medida, los niveles de las catecolaminas en el torrente sanguíneo. Las respuestas secundarias incluyen cambios medibles en la glucosa, el ácido láctico o lactato y los principales iones (por ejemplo, cloruro, sodio, y potasio) en la sangre. Las respuestas terciarias tienen que ver con en el crecimiento, condición y estado de salud general de los organismos, los cuales se ven reflejados en diversos índices tales como el factor de condición (k) y la relación longitud – peso (Adams *et al.*, 1989; Barton *et al.*, 2002).

Actualmente también se usan los parámetros hematológicos como un indicador de respuesta secundaria, ya que muestran el estado fisiológico de los peces y sirven para evaluar la presencia de enfermedades infecciosas, desbalance nutricional, efectos tóxicos, condiciones anóxicas, cambios ambientales y otros agentes estresantes que se presentan en los cultivos (Hrubec *et al.*, 2000; Bastardo y Díaz, 2004; Buenaño, 2010; Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011).

Para implementar un índice hematológico, el primer paso es conocer los valores hematológicos de referencia para la tilapia *O. niloticus* bajo condiciones óptimas de cultivo. Esta información, podría servir a los productores de tilapia para prevenir y reducir las respuestas de estrés en los organismos en cultivo, además de que aportaría información para la construcción de una herramienta diagnóstica para la vigilancia epidemiológica.

La presente investigación planteó establecer la relación existente entre los parámetros hematológicos y el estrés, para de esta manera contar con un índice de referencia, que nos permita evaluar la respuesta al estrés de la tilapia nilótica (*O. niloticus*).

4. ANTECEDENTES

4.1. Modelo de estudio

4.1.1. Características biológicas de la tilapia nilótica

La tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* (ON), presenta cuerpo comprimido, escamas cicloideas, el primer arco branquial tiene entre 27 y 33 filamentos branquiales, su línea lateral se interrumpe. Tiene espinas rígidas y blandas continuas en la aleta dorsal, con 16 ó 17 espinas y entre 11 a 15 radios, con numerosas líneas negras. La aleta anal tiene 3 espinas y 10 u 11 radios, la aleta caudal es trunca. Las aletas pectoral, dorsal y caudal adquieren una coloración rojiza en temporada de desove (FAO, 2005; 2015).

Las tilapias son peces eurihalinos que pueden vivir en aguas dulces, salobres y marinas, habitan una gran diversidad de cuerpos de agua; como son arroyos, ríos, lagos, lagunas, muestran una gran preferencia por aguas de escasa corriente o lenticas, con poca profundidad y cerca de las orillas. Son especies territoriales, euritemas y que soportan concentraciones de oxígeno bastante bajas. ON presenta un ciclo de vida bien definido, en las etapas de huevo, alevín, cría, juvenil y adulto, se reproducen a temprana edad, alrededor de las 8 a 10 semanas, teniendo una talla entre 7 a 16 cm, la frecuencia de desove varía considerablemente dependiendo de los factores climáticos, pudiendo ser desde seis a 16 veces al año. Las hembras son incubadoras bucales, ON se considera como una especie omnívora, puede vivir más de 10 años y alcanzar un peso de 5 kg (Arredondo-Figueroa y Lozano-Gracia, 2003; Basualdo-Ramírez *et al.*, 2012).

4.1.2. Importancia económica

La acuicultura es el sistema de producción de alimento que en décadas recientes ha tenido la mayor tasa de crecimiento en comparativamente a otras industrias productoras de alimento. Dentro de esta, la tilapia ocupa uno de los lugares primordiales de cultivo, ya que se presenta como la alternativa más ventajosa para la producción de proteína sana y barata. Esto es resultado de los altos

rendimientos, debido a que su tasa de crecimiento es mayor que el de otras especies en sistemas de cultivo intensivo. Esta especie tiene excelente calidad de carne y por lo tanto buena aceptación en los mercados. La producción mundial de las tilapias cultivadas, sobrepasó en 1995 la cifra de 500,000 ton/métricas, siendo la segunda especie más cultivada, superada solamente por la carpa. La producción se sigue incrementando, ya que la demanda de las tilapias cultivadas continua creciendo (Toledo-Pérez y García-Capote, 2000) conjuntamente con las mejoras de las técnicas para su cultivo.

4.1.3. Producción mundial

China es el mayor productor de tilapia nilótica cultivada. En el 2003, la producción china anual alcanzó casi 806,000 toneladas mientras que Egipto reportó una producción cercana a las 200,000 toneladas y Filipinas, Tailandia e Indonesia produjeron 111,000, 97,000 toneladas y 72,000 toneladas respectivamente. Los siguientes cinco países, entre los diez principales productores de tilapia nilótica fueron: la República Democrática Popular Laos, Costa Rica, Ecuador, Colombia y Honduras. Por su parte Brasil y Taiwán también son grandes productores de tilapia nilótica y otros países tales como Cuba, Israel, Malasia, USA, Viet Nam y Zimbabwe producen importantes cantidades anualmente. No obstante, la producción de estos países se reportan a la FAO entre la categoría general de 'tilapias nei' (las cuales pueden incluir otras especies de tilapia) (FAO, 2015).

4.1.4. Producción en México

La tilapia fue introducida a México por primera vez en 1964, procedente de Auburn, Alabama, EUA y fue depositada en la Estación Piscícola de Temascal, Oaxaca. Las especies que se incluyeron en esta introducción fueron: *Oreochromis aureus*, *Tilapia melanopleura* y *O. mossambicus*. Posteriormente, en 1978 se introdujo *O. niloticus* procedente de Panamá en el mismo sitio. En 1986, nuevamente se hizo otra introducción de tilapia de la especie nilótica, procedente de la universidad de Stirling en el Reino Unido, con dos variedades: negra y roja. Estos organismos se depositaron en Zacatepec, Morelos por segunda vez (Morales-Díaz,

1991). El primer registro de producción de tilapia en México ocurrió en 1970 con un volumen de 200 toneladas. En 1990 y 2003 se observó una disminución considerable en la producción de tilapia en México. Pero para el año 2006, México contribuyó con 2.5% de la producción mundial de tilapia. Actualmente, la producción no abastece la demanda del mercado nacional de tilapia entera o fileteada, lo que ha ocasionado que en los últimos años México se situara como el segundo importador mundial de esta especie, después de EUA. México consume alrededor de 200 mil toneladas anuales que incluyen la producción nacional y la importada. Considerando las estadísticas antes mencionadas, se pronostica que el consumo seguirá incrementándose año con año (Basualdo-Ramírez *et al.*, 2012).

4.1.5. Condiciones medioambientales óptimas y efecto de su variación para el cultivo

La calidad del agua apropiada para el cultivo de tilapia está dada por las propiedades físico-químicas, entre las más importantes se tiene:

Temperatura:

Los intervalos óptimos de temperatura para el cultivo de *ON* se encuentran ubicados entre 24 y 29 °C, ya que fuera de estos límites puede decaer la tasa de crecimiento y la actividad reproductiva (Morales Díaz, 1991; Arredondo-Figueroa y Lozano-Gracia, 2003). Los cambios de temperatura afectan directamente la tasa metabólica, mientras mayor sea la temperatura mayor será la tasa metabólica y por ende, mayor consumo de oxígeno. El consumo de oxígeno es dependiente de la temperatura en actividad rutinaria y en reposo, esto quiere decir que el aumento de temperatura disminuye la concentración de oxígeno disuelto en el agua. Las temperaturas letales bajas en cultivo de tilapia se ubican entre los 10 y 11 °C. Las enfermedades se producen cuando en el cultivo se presentan temperaturas por debajo de los 16 y 17 °C y por arriba de 37 a 38 °C se producen problemas por estrés (Morales-Díaz, 1991; Arredondo-Figueroa y Lozano-Gracia, 2003; Basualdo-Ramírez *et al.*, 2012).

Oxígeno disuelto (O. D.):

El nivel de O. D. presente en un estanque es el parámetro más importante en la calidad del agua. El intervalo óptimo para que se lleve a cabo la reproducción es de 5 mg/L, ya que valores menores reducen el crecimiento, pueden conducir al estrés y facilitar la aparición de enfermedades e incrementar la mortalidad (Morales Díaz, 1991; Basualdo-Ramírez *et al.*, 2012).

Dióxido de carbono (CO₂):

Los reportes indican que en condiciones de cultivo de 50 a 100 ppm de CO₂ provocan estrés y que si este se prolonga demasiado causa la muerte, por lo que los valores de dióxido de carbono no deben rebasar los 30 ppm. El CO₂ afecta a los organismos disminuyendo la capacidad de la sangre para captar el oxígeno (Morales-Díaz, 1991; Salazar-Ariza, 2001).

Salinidad:

Salinidades altas (30 a 40 ppm) afectan a las tilapias y no pueden reproducirse, por lo que crecen más rápido a salinidades intermedias (isotónicas), ya que reducen el gasto de energía para el control osmótico de sus fluidos corporales (Morales-Díaz, 1991).

pH:

El intervalo óptimo de pH para *ON* está entre 6.5 a 8.5, aunque el valor ideal es 7.5. Los valores por encima o por debajo, causan cambios de comportamiento en los peces, tales como letargia, inapetencia, retardo en el crecimiento y en la reproducción. Valores de pH cercanos a 5 producen mortalidad en un período de 3 a 5 horas, por fallas respiratorias. Los cambios de pH en un mismo cuerpo de agua están relacionados con la concentración de dióxido de carbono, la cual acidifica el agua (Morales-Díaz, 1991; Salazar-Ariza, 2001).

Turbidez:

El intervalo óptimo que se recomienda es menor de 25 ppm de partículas sólidas que forman suspensiones en el agua. Este parámetro está relacionado con la temperatura, ya que habiendo una buena penetración de los rayos solares, el agua tendrá un calentamiento homogéneo, lo que traerá consigo, una mayor actividad reproductiva, además de evitar que las crías recién nacidas padezcan enfermedades branquiales por exceso de partículas suspendidas en el agua (Morales-Díaz, 1991).

Amonio no ionizado (NH₃):

El intervalo óptimo de amonio debe fluctuar entre 0.01 a 0.1 ppm (valores cercanos a 2 ppm son críticos). Una concentración alta de amonio en el agua causa bloqueo del metabolismo, daño en las branquias, movimientos erráticos rápidos, pérdida de equilibrio, afecta el balance de las sales, produce lesiones en órganos internos, inmunosupresión, susceptibilidad a enfermedades, reducción del crecimiento, la supervivencia, exoftalmia (ojos brotados) y ascitis (acumulación de líquidos en el abdomen) (Portz *et al.*, 2006). Los niveles de concentración del amonio tóxico (NH₃) no son totalmente dependientes, pero si están muy relacionados con otros factores tales como la temperatura y pH. A elevada temperatura y pH la concentración de amonio tóxico es mayor y puede alcanzar valores subletales sobre todo cuando éste se mantiene por largos intervalos de tiempo (Arredondo-Figueroa y Lozano-Gracia, 2003).

Nitritos (NO₂⁻):

La concentración debe de estar por debajo de 0.1 mg/L. Concentraciones elevadas de este parámetro interfieren con la habilidad de la sangre de los organismos para absorber oxígeno. Niveles de 0.2 mg/L pueden ocasionar la “enfermedad de la sangre café o metahemoglobinemia” producida por la oxidación del ión ferroso de la hemoglobina a ión férrico metahemoglobina que da el color característico. La metahemoglobina no puede unirse al oxígeno y pueden resultar en hipoxia y mortalidad, además de ocasionar anemia crónica (Portz *et al.*, 2006).

Nitratos (NO_3^-):

Los nitratos no presentan mayor problema para los peces, siempre y cuando no se expongan a concentraciones mayores a 40 mg/L y por tiempos prolongados. Concentraciones elevadas pueden afectar la osmorregulación de los peces y el intercambio de gases (Portz *et al.*, 2006). El mantener valores elevados de O. D. previene el aumento de estas especies químicas, favoreciendo la oxidación del nitrógeno en todas sus formas mediante la participación de las bacterias nitrificantes (Arredondo-Figueroa y Lozano-Gracia, 2003).

4.2. Estrés en peces

Clásicamente el estrés se define como un estímulo puntual, agresivo o no, percibido como amenazante para la homeostasis, el cual activa un conjunto de reacciones que implican respuestas conductuales y fisiológicas (neuronales, metabólicas y neuroendocrinas) que permiten al organismo responder al estresor de la manera más adaptada posible (Álvarez, 2008; Barandica y Tort, 2008; Arturo-Rodríguez, 2012).

Los posibles agentes estresantes o estresores en peces cultivados son múltiples y de variado origen: alimentación deficiente, alta densidad de cultivo, baja oxigenación del agua, condiciones físico-químicas del agua por debajo del óptimo, fotoperiodo no adecuado, vibraciones, ruidos, manipulación, transporte y el propio confinamiento físico. Cuando se mantienen estos agentes estresantes por un largo periodo, pueden afectar a la producción, ya sea causando un retraso en el crecimiento de los organismos, fallos en la reproducción o una alta susceptibilidad a agentes patógenos. Por ello es importante reducir cualquier fuente de estrés para el organismo (Ocampo y Camberos, 1999; Arturo-Rodríguez, 2012).

Los agentes estresantes pueden agruparse en:

Agentes estresantes ambientales y de cultivo:

Los cambios en la composición química del agua son provocados por el oxígeno disuelto, amonio, dureza, pH, temperatura, altas concentraciones de metales en el agua (cobre, cadmio, hierro), entre otros. Algunas sustancias contaminantes como el cloro, arsénico, fenoles, herbicidas, fungicidas también afectan negativamente el cultivo. El confinamiento, transportación, agotamiento y manutención en una red fuera del agua por un período de tiempo prolongado (Silveira-Coffigny, 2005).

Agentes estresantes biológicos:

Estos integran los efectos de organismos patógenos, ya sean bacterias, hongos y protozoarios (Silveira-Coffigny, 2005).

4.2.1. Respuesta de los peces al estrés

Los primeros trabajos sobre el estrés en los peces se derivan de los estudios de Black en la década de 1950, sobre las respuestas metabólicas de salmónidos a un ejercicio exhaustivo y a condiciones de hipoxia. A partir de este trabajo se observó la aparición de un número creciente de estudios fisiológicos sobre los peces (durante los 20 años siguientes); la mayoría de las cuales se centraron en el salmón del Pacífico de América del Norte (*Oncorhynchus sp.*) (Pickering, 1998).

La idea de que la respuesta de un animal a condiciones extremas puede tener algunas consecuencias perjudiciales para su bienestar se originó a partir del trabajo de Cannon en 1929, con el principio resultante de la respuesta de lucha o huida (también llamada respuesta de estrés agudo o hiperexcitación), la cual es una respuesta fisiológica ante la percepción de daño, ataque o amenaza a la supervivencia. La reacción es conocida como la primera etapa de un síndrome de adaptación general que regula las respuestas de estrés de vertebrados (Pickering, 1998).

Dependiendo de la intensidad del agente estresante, la respuesta de estrés puede presentar dos niveles: el estrés agudo o letal. Este ocurre rápidamente como

respuesta a perturbaciones a corto plazo, tales como derrames de sustancias químicas o cambios radicales en los factores ambientales, como oxígeno disuelto y temperatura. El estrés crónico o subletal es más común y resulta de exposiciones continuas o periódicas a bajos niveles de agentes causantes de estrés en periodos de semanas o incluso años (Ocampo y Camberos, 1999).

En los vertebrados superiores (mamíferos), el conjunto de sistemas orgánicos interrelacionados implicados en la respuesta a las situaciones de estrés se denomina eje Hipotálamo Pituitario Adrenal (HPA). El equivalente de este eje en los peces se denomina eje hipotálamo-pituitario-interrenal (HPI); esto se debe a que los peces no poseen una glándula adrenal como tal, sino un conjunto difuso de células interrenales (Barandica y Tort, 2008). Además, en los peces existe un segundo eje fisiológico implicado en el conjunto de la respuesta a los factores estresantes: el eje Hipotálamo Simpático Cromafin (HSC).

Los estresores son primero percibidos y las señales enviadas a los sensores del sistema nervioso central (CNS), específicamente en el hipotálamo, donde los dos grandes ejes reguladores son estimulados: el HSC y el HPI. En el eje HSC, la síntesis y liberación de las catecolaminas (CA) (adrenalina y noradrenalina) en el torrente sanguíneo está estimulada por las fibras colinérgicas del sistema simpático. En los mamíferos, las CA son liberadas de la médula adrenal, en tanto que en los peces teleósteos el principal origen de las CA circulantes son las células cromafin dispuestas en la pared de la vena cardinal posterior, en la región del riñón. Las CA activan diversas respuestas cardiovasculares, respiratorias y metabólicas dirigidas a aliviar los efectos perjudiciales asociados con los estresores agudos (Barandica y Tort, 2008) (Figura 1).

La primera hormona del eje HPI es la hormona liberadora de la corticotropina (CRH), la cual es liberada por las neuronas hipotalámicas de la región pre-óptica. La CRH se ha encontrado en peces conjuntamente con la hormona liberadora de la tiroides (TRH). La TRH y la CRH estimulan la liberación de la hormona adrenocorticotropina (ACTH) de la pituitaria e inducen la producción y liberación del

mayor esteroide estresor: el cortisol. Este compuesto es liberado por las células interrenales (Barandica y Tort, 2008) (Figura 1).

De acuerdo a esto, se ha dividido la respuesta de estrés en:

Respuesta primaria o de alarma:

La respuesta primaria implica inicialmente la percepción de un estímulo estresante. Esta es de naturaleza neuroendocrina y conlleva a la liberación de las catecolaminas y glucocorticoides (cortisol) a la circulación. Dentro de las respuestas primarias hay una fase de actuación inmediata con la activación del HSC y la liberación de catecolaminas. La segunda fase es más retardada y se asocia con la activación del HPI y la liberación del cortisol desde las células interrenales (Weber, 2009) (Figura 1).

Respuesta secundaria:

La respuesta secundaria es consecuencia directa de la liberación de las catecolaminas y el cortisol. Las catecolaminas tienen efectos muy rápidos en el sistema cardiovascular, como la liberación de células rojas de la sangre, adicionales del bazo para mejorar el transporte de oxígeno. Los cambios promovidos por estas hormonas se podrían resumir en dos aspectos fundamentales: a) en los cambios que tiene lugar en el sistema circulatorio, como los cambios en los valores hematológicos, aumento del consumo de oxígeno, incremento en la actividad cardíaca, perturbaciones del equilibrio hidromineral y b) cambios en la movilización de los sustratos energéticos, como la hiperglucemia (Weber, 2009) (Figura 1).

Respuesta terciaria:

La respuesta terciaria es consecuencia de mantener crónicamente los cambios que tienen lugar durante las respuestas secundarias. Cuando la acción de algunos agentes estresantes es prolongada o repetitiva existe una constante perturbación de la homeostasis. Esta perturbación es la que finalmente puede producir una disminución del rendimiento animal que afecta negativamente a la reproducción, al crecimiento y al estado inmunitario, pudiendo llegar a disminuir sus

probabilidades de supervivencia. Estas respuestas terciarias se reflejan tanto a nivel individual como de la población (Weber, 2009) (Figura 1).

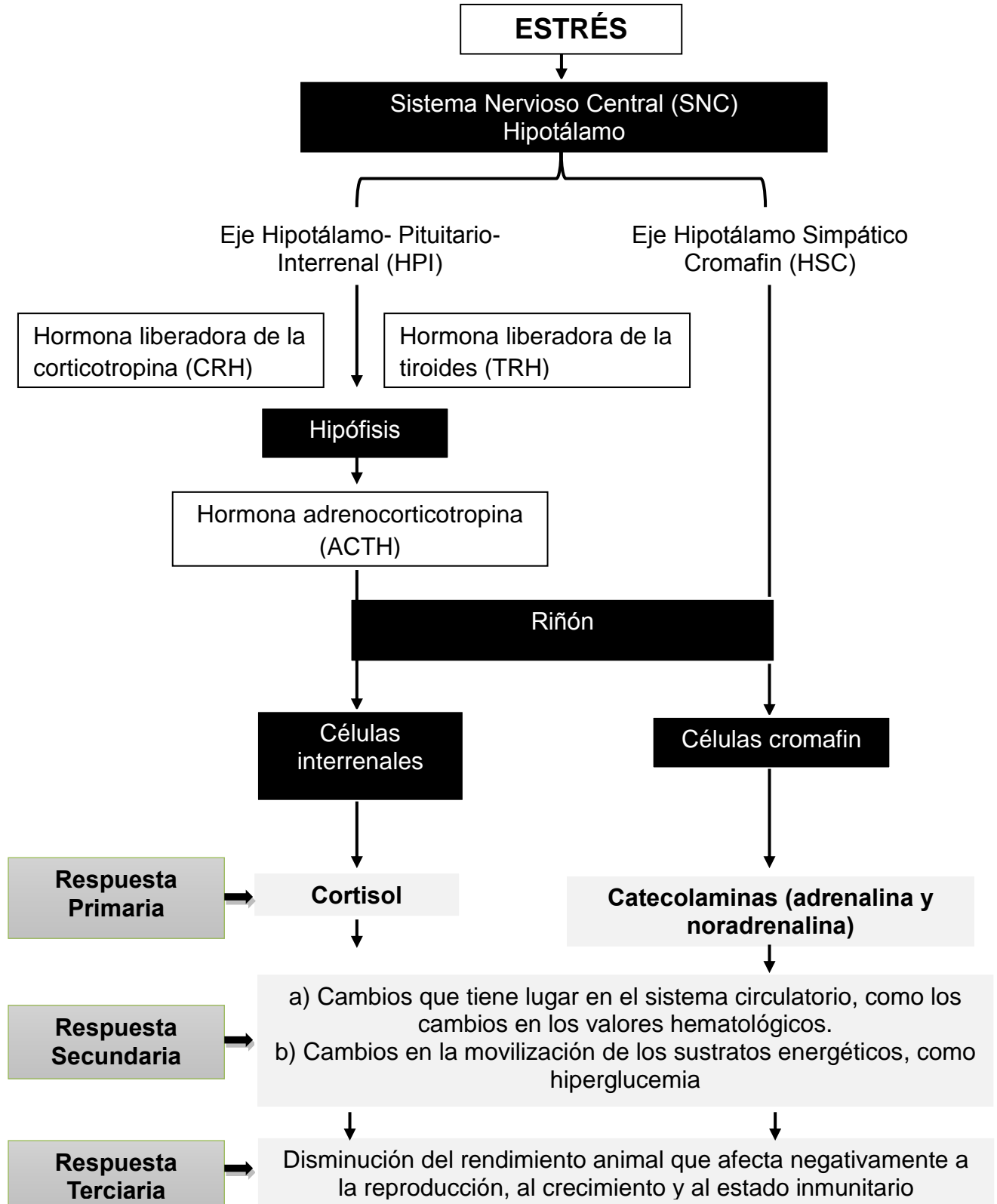


Figura 1. Respuesta de los peces al estrés.

4.2.2. Indicadores de estrés

Indicadores neuroendocrinos de respuesta primaria:

Actualmente es posible detectar y cuantificar los cambios en casi todos los elementos asociados a las respuestas primarias del estrés, aunque para éstas el indicador más utilizado es la determinación de los niveles plasmáticos de cortisol (Barandica y Tort, 2008). A pesar de ser un parámetro para evaluar intensidad de respuesta, se considera que valores bajos de cortisol no significan ausencia de estrés. Además se debe considerar que el desarrollo reproductivo, las modificaciones del estado nutricional o de la edad son acompañados naturalmente de cambios en los niveles de cortisol, por lo que también su presencia refleja las alteraciones del metabolismo animal y no solo estrés. La concentración plasmática de cortisol es el resultado de un proceso dinámico entre lo producido y lo eliminado y debido a que no necesariamente muestra una elevación durante el proceso de estrés, podría en ciertos casos ser un indicador poco fiable (Flores-Quintana, 2002).

Con respecto al posible uso de las catecolaminas como índices de estrés hay dos problemas: en primer lugar sus niveles circulantes se incrementan casi de inmediato después de la generación de un mínimo estrés y en segundo lugar la complejidad de su extracción desde la sangre y de su análisis, hacen que su uso este prácticamente restringido en la investigación sobre el estrés (Barandica, 2010).

Indicadores metabólicos de respuesta secundaria:

Los análisis de algunos de los parámetros relacionados con las respuestas secundarias son fáciles de determinar y por tanto de uso potencial en la acuicultura. Un ejemplo son los parámetros hematológicos, que se modifican por la presencia de la adrenalina ya que se produce desequilibrio en los iones y en los niveles del agua e hinchamiento de las células sanguíneas. Estas afectaciones causan modificación del número y tamaño de las células y con ello el valor hematocrito.

En presencia de estrés agudo aumenta la demanda de oxígeno, lo que provoca cambios significativos en los valores hematológicos o en el número de glóbulos rojos (Barandica, 2010). Asimismo, en el análisis plasmático de glucosa, la

hiperglucemia observada durante el estrés es resultado de la glucogenólisis y gluconeogénesis, en ambos casos están implicados el efecto de las catecolaminas y el cortisol (Flores-Quintana, 2002).

Indicadores de respuesta terciaria:

Cuando la situación estresante es persistente se denomina crónica; entonces las llamadas respuestas terciarias son fácilmente visibles y detectables por un piscicultor experto. Estas incluyen cambios en el comportamiento, disminución del crecimiento, aumento en la incidencia de enfermedades (fúngicas, víricas y bacterianas) y un deterioro reproductivo (Flores-Quintana, 2002).

4.2.3. Impacto del estrés en el rendimiento

Sistema Inmune:

El estudio de estresores tales como, captura, hacinamiento o dietas deficientes pueden afectar la homeostasis de los animales y en concreto del sistema inmune. La mayoría de las investigaciones demuestran que el estrés produce inmunosupresión, pero la prolongación de sus efectos es muy variable y depende de muchos factores claves. La naturaleza de la respuesta está relacionada con el estresor: dependiendo de su tipo, intensidad, persistencia y duración de la exposición (tiempo) generando diferentes respuestas (Barandica y Tort, 2008).

La función esencial del sistema inmune en todos los vertebrados es la defensa contra las infecciones y con ello permite la supervivencia del individuo. El sistema de defensa de los peces puede ser dividido en dos tipos de mecanismos: sistema de defensa innato (natural o inespecífico) y sistema inmune adquirido o específico. El primero es el que posee todos los seres vivos desde el nacimiento, formado por componentes celulares y humorales. El segundo involucra la producción de anticuerpos a través de un reconocimiento específico del antígeno, aunque también participan elementos celulares. La importancia relativa de ambos puede variar con la edad del pez y están influenciados por distintos factores. En el caso de los peces teleósteos, el sistema defensivo está compuesto de subpoblaciones de leucocitos

que incluyen los linfocitos B y T, los granulocitos, los trombocitos, los macrófagos y las células citotóxicas inespecíficas (Olabuenaga, 2000).

La elevada producción de cortisol suprime los sistemas de defensa del organismo y esto conlleva a una mayor susceptibilidad a la enfermedad. Algunos estudios han demostrado que niveles altos de cortisol en el organismo tienen un impacto negativo en la resistencia a infecciones microbianas en peces, esto resultado de una reducción de la actividad fagocítica de los leucocitos (Pickering, 1998; Barandica y Tort, 2008).

El cortisol no es un factor negativo en los organismos. En los vertebrados es esencial para el desarrollo normal, el mantenimiento de la homeostasis basal, como de los eventos relacionados con el estrés, regula una amplia gama de procesos metabólicos y de funciones fisiológicas a través de sus receptores. Se convierte en un factor negativo cuando se mantienen las situaciones de estrés y los niveles altos de cortisol durante un largo período, por lo que, la activación del metabolismo interfiere con los demás procesos fisiológicos y puede llegar a ser letal para el organismo (Barandica y Tort, 2008).

Comportamiento:

Los cambios de comportamiento pueden ser utilizados como indicadores de estrés y como una alerta temprana en la unidad de producción. Los acuicultores experimentados identifican los cambios en el comportamiento de los organismos, principalmente en el comportamiento alimenticio (Pickering, 1998).

Crecimiento:

En los peces, una de las consecuencias típicas del estrés es la reducción de la tasa del crecimiento. Cuando la acción del estímulo estresante es duradera y supera la capacidad de adaptación del animal, la energía disponible para el crecimiento deriva casi en su totalidad hacia la restauración del equilibrio homeostático. El caso particular de las tilapias, se han observado que a altas densidades de siembra disminuye del crecimiento (Weber, 2009).

Reproducción:

Es común encontrar problemas en la reproducción en peces sometidos a cualquier tipo de estrés. Este puede desajustar el balance hormonal necesario para un funcionamiento correcto de la función reproductiva. El estrés puede interferir negativamente con la endocrinología reproductiva, lo que puede resultar en gametos de mala calidad y la reducción de la capacidad reproductiva, así como una alteración de la conducta reproductiva o incluso en la inhibición total de la reproducción. Si el estrés es grave o prolongado, puede conducir a la reducción del tamaño de los huevos de la hembra, una disminución en el conteo de espermatozoides en el macho y la reducción de la supervivencia en la progenie resultante (Pickering, 1998; Weber, 2009).

La calidad del producto:

La apariencia, la textura y el sabor del producto final son factores muy importantes para determinar el éxito de una operación acuícola, especialmente para el mercado. Tal vez el aspecto más estudiado de la calidad del producto en relación con el estrés es la influencia de las condiciones inmediatamente anteriores al sacrificio. Se piensa que la calidad de la carne puede estar influenciada por la intensidad y la duración del rigor mortis después de la muerte (Pickering, 1998).

El rigor mortis está caracterizado por una progresiva rigidez del cuerpo del pez debido a la reducción de los niveles de ATP en la musculatura. Cuando más tarde se produce y mayor sea la duración del periodo de rigor mortis, menores serán las alteraciones de las características de la carne y mayor la longevidad del producto después del procesamiento. Los peces que están hambrientos, exhaustos o estresados antes de morir, entran en un estado de rigor mortis más rápidamente (Varga *et al.*, 2013).

4.3. Hematología en peces

El inicio de la ictiohematología (disciplina que estudia la sangre de los peces) se remonta a finales del siglo XIX y se desarrolló principalmente en salmónidos. La diferenciación e identificación celular durante muchos años, se basó en la morfología celular y su comparación con las células de aves y mamíferos, a partir de estas teorías reevaluadas se propusieron estandarizar reglas consistentes en nomenclaturas y procedimientos solo para peces (Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011).

A diferencia de los vertebrados superiores, los peces no tienen médula ósea, la sangre se forma en el intersticio del riñón y del bazo principalmente, aunque se ha notado cierta actividad hematopoyética en el órgano del timo, en la submucosa del intestino y parcialmente en el hígado (Zaragoza, 2004).

Los peces tienen un volumen total de sangre del 3% del peso del cuerpo. Del total del volumen de sangre, el 17% está constituido por células sanguíneas, mientras que el 83% es plasma compuesto por agua, minerales en solución, enzimas, anticuerpos y sustancias disueltas (Zaragoza, 2004). Las células sanguíneas están compuestas de tres tipos de células: rojas (eritrocitos o glóbulos rojos), blancas (leucocitos o glóbulos blancos) y trombocitos (Hrubec y Smith, 2010).

4.3.1. Eritrocitos

Al igual que en los mamíferos, los eritrocitos de los peces contienen hemoglobina, que es un pigmento cuya función principal es realizar el intercambio gaseoso. Los eritrocitos son nucleados y son metabólicamente más activos que sus homólogos de mamíferos. Los reticulocitos (eritrocitos inmaduros) son fácilmente reconocibles por su citoplasma ligeramente basófilo y por ser células pequeñas con un núcleo más abierto (Hrubec y Smith, 2010; Campbell, 2012) (Figura 2).

4.3.2. Leucocitos

Los leucocitos participan en la respuesta inmune, protegiendo al organismo contra los microorganismos patógenos que entran en su cuerpo, como las bacterias, virus y parásitos (Hrubec y Smith, 2010). Los más comunes en los peces son los

granulocitos y los mononucleares o agranulocitos. Dentro de estos dos grupos se encuentran a su vez distintas categorías: a) los granulocitos, incluyen los neutrófilos, los eosinófilos y los basófilos y b) los agranulocitos, incluyen los monocitos y los linfocitos. a) Granulocitos: la mayoría de éstos son móviles y fagocíticamente activos, su citoplasma contiene gránulos lisosomales, vacuolas, mitocondrias y otros organelos. En la mayoría de las especies, el núcleo está abierto y en forma de óvalo, se divide en segmentos, lo que posiblemente indica que las células maduran en circulación antes de migrar a los tejidos. Estas células se encuentran en distintas proporciones en la sangre, dependiendo de las especies. Los neutrófilos, contienen en su citoplasma numerosos gránulos, son pobremente fagocíticos en el sentido que ingieren poco material extraño, pero poseen la mayoría de las enzimas presentes en los mamíferos. Por lo tanto su rol primario sería la lisis extracelular por secreción de estas enzimas y otras sustancias antimicrobianas. Los neutrófilos de peces óseos suelen ser células redondas o ligeramente ovoides de núcleos excéntricos. El núcleo de los neutrófilos maduros varían en forma, puede ser redondo, ovalado, alargado (tipo banda), o segmentado y por lo general con dos o tres lóbulos. Los núcleos no segmentados son los más comunes en los granulocitos de los peces óseos. Los eosinófilos contienen gránulos citoplásmicos que se tiñen con los colorantes ácidos, en la mayoría de los peces teleósteos son escasos o ausentes en la circulación. Algunos están presentes en el peritoneo y tejidos. Los basófilos contienen gránulos en el citoplasma que se tiñen con los colorantes básicos y su presencia es escasa y rara en la sangre periférica de la mayoría de las especies (Olabuenaga, 2000; Rubio-Godoy, 2010; Campbell, 2012) (Figura 2).

b) Los monocitos son móviles, fagocíticos y normalmente de mayor tamaño que otros leucocitos, tienen un citoplasma vacuolado y basofílico. Se han encontrado en sangre y riñón. Los macrófagos son células fagocíticamente activas derivadas de los monocitos que se encuentran en tejidos y en las cavidades peritoneal y pericárdica, de mayor tamaño que los anteriores y por esta razón pueden fagocitar partículas más grandes. En peces teleósteos los macrófagos son especialmente abundantes en el bazo y en el tejido linfomieloideo renal y puede haber en otros tejidos, por ejemplo la mucosa olfatoria.

Los linfocitos son células inmunocompetentes que constituyen la base de las reacciones inmunes. Los linfocitos en el sentido morfológico son generalmente pequeños con citoplasma azul oscuro y un núcleo condensado. Las células son redondas y con frecuencia tienen pseudópodos a lo largo del margen, son células no fagocíticas. La mayoría de los linfocitos son producidos en el pronefros y en el timo, existen dos tipos, los linfocitos B y T. La población de linfocitos T y sus diferentes clones son los responsables de la inmunidad mediada por células (Olabuena, 2000; Hrubec y Smith, 2010; Rubio-Godoy, 2010).

4.3.3. Trombocitos

Los trombocitos están involucrados en la coagulación y la formación de coágulos. Estas células son similares a las plaquetas, con un sistema de interconexión y gránulos citoplasmáticos. Los trombocitos tienen un núcleo condensado con un citoplasma claro. La forma de la célula varía con el estado de activación, son generalmente de forma oval, pero se vuelven pequeños y redondos similar a un linfocito cuando se activan (Hrubec y Smith, 2010; Campbell, 2012) (Figura 2).

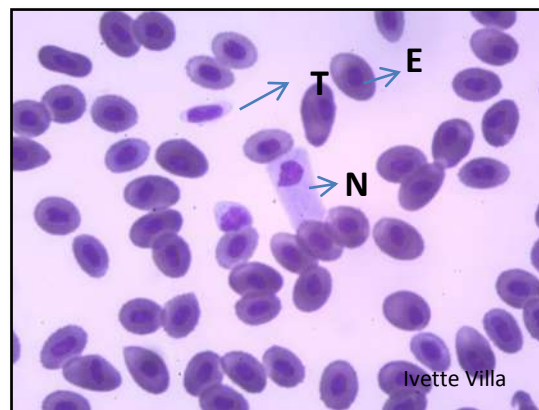


Figura 2. Células sanguíneas de *O. niloticus*, eritrocito (E), neutrófilo (N), trombocito (T) (Villa-Villaseñor).

4.3.4. Hematopoyesis

La hematopoyesis en los peces es similar a la de los mamíferos y se produce en dos etapas, la hematopoyesis primitiva y la hematopoyesis definitiva. La hematopoyesis primitiva comienza cuando aún el organismo está en la fase de huevo

o poco después de la eclosión. En esta etapa durante el desarrollo larvario, las células se extienden lateralmente a los somitas. Estas migran para formar la masa celular intermedia (ICM), localizándose ventralmente a la notocorda. Las células se diferencian en células endoteliales, del tronco y proeritroblastos. Algunas especies de peces utilizan el saco vitelino como el sitio de la hematopoyesis primitiva. Los proeritroblastos de estos centros hematopoyéticos primitivos entran en la circulación y maduran en glóbulos rojos primitivos que son distintos de los glóbulos rojos de peces adultos, tienen menos citoplasma y un núcleo alargado. Un segundo sitio de la hematopoyesis primitiva, es el mesodermo anterior que produce tanto células mieloides, como elementos vasculares. Las células madre hematopoyéticas adultas son producidas en una región de los peces cuando están en desarrollo, llamada aorta-mesonefros-gónadas (AGM). En los mamíferos, estas células madre hematopoyéticas se translocan al hígado y la médula ósea fetal. En los peces, estas células se translocan al riñón, al igual que las células sanguíneas progenitoras de todos los tipos. Los precursores eritroides son similares a los observados en los mamíferos y se liberan desde el riñón a la circulación en una etapa inmadura. Los reticulocitos están frecuentemente presentes en preparaciones de sangre de peces. Las células T se desarrollan y maduran en el timo, mientras que las células B se desarrollan en la región del pronefros del riñón (Hrubec y Smith, 2010; Campbell, 2012).

4.3.5. Órganos hematopoyéticos

El timo es un órgano par, bilateral, situado debajo del epitelio faríngeo, dorso lateral y alojado en la parte superior interna de las cámaras branquiales. El principal componente celular es el timocito, los cuales son linfocitos en maduración. Como en otros vertebrados, se le considera como un órgano linfoide primario donde se producen los linfocitos vírgenes que luego migran para juntarse con los linfocitos periféricos en la circulación y otros órganos linfoides. También pueden estar presentes células epitelioideas o células tipo macrófago y células granulares eosinofílicas (Olabuenaga, 2000).

La parte anterior del riñón o pronefros es el principal órgano hematopoyético de los peces y el principal sitio de diferenciación de eritrocitos, granulocitos, linfocitos B y monocitos. Es el principal órgano productor de anticuerpos. Este es un órgano de filtración que contiene macrófagos que fagocitan los diferentes antígenos, componentes linfomieloides, renales y endocrinos, suplementados por la sangre de las arterias y de la vena porta caudal. Lo cual sirve como un análogo de la médula ósea, de los ganglios y en parte de la glándula adrenal de los vertebrados superiores. El mesonefros o riñón propiamente, cumple con funciones de equilibrio hidrosalino (Olabuenaga, 2000; Abdel-Aziz, 2010).

El bazo contiene menor número de células hemopoyéticas y linfoides en comparación con el riñón y está compuesto principalmente por sangre alojada en cavidades. Está formado por elipsoides, paredes capilares compuestas por una trama de fibras reticulares y macrófagos. Las fibras se especializan en atrapar complejos inmunes y antígenos. Un rasgo particular del bazo de los teleósteos es la presencia de macrófagos conteniendo pigmentos de color oscuro, principalmente melanina y que se denominan melanomacrófagos. Estos se agrupan y forman agregados llamados centros melanomacrofágicos (CMM). Su número y tamaño aumenta en peces crónicamente enfermos (Olabuenaga, 2000).

4.3.6. Cambios en los parámetros hematológicos causados por estrés

En los peces, el estrés causa una leucopenia caracterizado por una linfopenia y una neutrofilia. Los peces también demuestran una respuesta inflamatoria típica que consiste en una neutrofilia y linfocitosis (Hrubec y Smith, 2010). La manipulación de peces de tan solo 20 segundos da como resultado la liberación de catecolaminas, que tienden a causar la hemoconcentración e hinchazón de los eritrocitos. Asimismo, la anemia normocrómica microcítica se ha asociado con el estrés provocado por el ambiente. Los núcleos anormales de eritrocitos (es decir, amitosis, la segmentación y la fragmentación), así como la formación de eritroplastidos pueden referirse a trastornos nutricionales, tales como la deficiencia de ácido fólico o vitamina E y toxicosis de aceites rancios y contaminantes ambientales. Debido a que los eritrocitos inmaduros de peces son más pequeños que los eritrocitos maduros,

microcitosis a menudo se asocia con hemorragias o anemias hemolíticas marcadas, en la que la regeneración de eritrocitos inmaduros representa a la mayoría de los eritrocitos de la sangre periférica (Clauss *et al.*, 2008). Las anemias hemorrágicas de peces están asociadas con un trauma, parásitos, deficiencia de vitamina K, y septicemia (bacterias o virus). El cadmio es un bloqueador del canal de calcio que impide la función normal de la membrana de los eritrocitos, produciendo anemia hemolítica en los peces teleósteos de agua dulce expuestos a niveles tóxicos de cadmio en el agua (Campbell, 2012). La intoxicación por nitritos (enfermedad de la sangre de color marrón o síndrome del tanque nuevo) también se traduce en anemia hemolítica severa. El nitrito se absorbe fácilmente en las branquias y entra a la sangre, donde entonces oxida la hemoglobina en metahemoglobina, que a su vez cambia gradualmente la sangre de rojo a marrón. Se produce una anemia hemolítica debido a que los macrófagos esplénicos eliminan los eritrocitos afectados de la circulación (Clauss *et al.*, 2008). Varias deficiencias nutricionales se han producido experimentalmente en los peces, por ejemplo, las deficiencias de ácido fólico provocan anemias macrocíticas normocrómicas y las deficiencias de vitamina B12 dan lugar a anemias hipocrómicas (Hrubec y Smith, 2010).

4.3.7. Anestesia

Durante la toma de muestra de sangre de los peces, el procedimiento de recolección de sangre debe llevarse a cabo en menos de 30 segundos, debido a que si los peces se mantienen fuera del agua durante períodos más largos sufren de problemas respiratorios y desequilibrio electrolítico (Campbell, 2012). La mayoría de los peces responden negativamente al ser manipulados, por lo que se recomienda la sedación o anestesia antes de la toma de muestra de sangre, para disminuir los cambios hematológicos provocados por estrés a la hora de la captura. Entre los agentes anestésicos se encuentra el MS-222 en concentraciones de 100-200 mg/L el cual es el más ampliamente aceptado. La solución de MS-222 debe ser tamponada con bicarbonato de sodio u otro tampón adecuado para evitar la disminución extrema en el pH de la solución no tamponada de MS-222, ya que puede causar alteraciones significativas en las mediciones fisiológicas y hematológicas de los peces. La

solución anestésica debe ser de concentración suficiente para inducir la anestesia en etapa dos (pérdida de equilibrio) en 20 segundos y la etapa tres, anestesia dentro de 1 minuto (Hrubec y Smith, 2010).

4.3.8. Anticoagulantes

Durante el análisis de sangre, esta debe de ser trasladada inmediatamente a un tubo con anticoagulante para minimizar la coagulación. La elección del anticoagulante para la conservación de la morfología celular parece ser específica para las diferentes especies de peces. En los salmónidos, ciprínidos y esturión, los glóbulos rojos conservan mejor la morfología con heparina, mientras que las células de la tilapia y del pacu se conservan mejor en ácido etildiaminotetraacético (EDTA). A pesar del uso de los anticoagulantes, ocasionalmente la sangre se coagulará aún en la presencia de este. Los coágulos pueden llegar a ser extremadamente visibles y los trombocitos aparecen agrupados cuando se realizan los frotis sanguíneos (Hrubec y Smith, 2010). El uso de un anticoagulante y la reducción del pre-estrés de captura puede evitar la formación de grumos de trombocitos (Hrubec y Smith, 2010). Las desventajas de la heparina incluyen la tendencia de los leucocitos y trombocitos a aglutinarse y la creación de un tinte azul en los frotis de sangre con tinciones de Romanowsky. Además, si la muestra de sangre contiene un pequeño coágulo, la heparina puede no prevenir la coagulación una vez que esta ha comenzado. Las desventajas del EDTA incluyen la hemólisis de los eritrocitos en algunas especies de peces (Campbell, 2012).

En un estudio realizado en *O. niloticus* se determinó el efecto de los anticoagulantes EDTA y heparina en los parámetros hematológicos. Los resultados obtenidos en este estudio, demostraron que en los frotis de sangre con heparina se observaron imágenes que estaban más cerca de lo normal (control) que el EDTA, además, se observó una hemólisis significativa de células en la sangre con EDTA, por lo que, la heparina ha demostrado ser el anticoagulante preferido para la sangre de *O. niloticus* (Ekanem *et al.*, 2012).

4.4. Estudios de los parámetros hematológicos en *O. niloticus* y su relación con los agentes estresantes

Parámetros hematológicos de referencia:

Cuadro 1. Trabajos publicados en los que se determinan los parámetros hematológicos de referencia en *O. niloticus*.

Autor, año y lugar	Organismos utilizados	Anestesia y anticoagulante	Altitud y calidad del agua		Parámetros hematológicos (promedio)	
Hrubec et al., 2000. Centro de Acuicultura de Virginia, EUA.	Adultos de <i>O. niloticus</i> , <i>O. mossambicus</i> y <i>O. aureus</i> W = 240 g L = 22 cm.	MS-222 y EDTA.	Temperatura (°C)	29.9	Hematocrito L/L	.33
			pH	7.4	Hemoglobina g/L	82
			NH ₃ no ionizado (mg/L)	0.020	VGM fL	135.7
			NO ₂ -N (mg/L)	0.36	CMH pg	34.9
			NO ₃ -N (mg/L)	70	CGMH g/L	25.7
			Oxígeno disuelto (mg/L)	9.4	Eritrocitos 10 ¹² /L	2.31
					Leucocitos 10 ⁹ /L	75.659
					Trombocitos 10 ⁹ /L	53.734
					Linfocitos 10 ⁹ /L	71.864
					Neutrófilos 10 ⁹ /L	1.805
		Monocitos 10 ⁹ /L	1.520			
		Eosinófilos 10 ⁹ /L	334			
Rodrigues-Bittencourt et al., 2003. Estación Experimental de Acuicultura, Universidad de Maringá, Brasil.	Adultos W = 100 a 900 g L = 16-37 cm Edad = 6 a 9 meses.	Benzocaína a 1:15 en agua. Heparina.	Temperatura (°C)	16-28.3.	Hematocrito L/L	.31
					Hemoglobina g/L	105.2
					VGM fL	148.80
					CMH pg	40.74
					CGMH g/L	35.24
					Eritrocitos 10 ¹² /L	6.93

IVETTE MARAI VILLA VILLASEÑOR

Hahn-Von-Hessberg <i>et al.</i> 2011. Estación Piscícola de la Universidad de Caldas en Santágueda (Caldas, Colombia).	Adultos, revertidos sexualmente W = 250 a 350 g.	Solución de sulfato de quinaldine a 1:100.000 en agua. EDTA.	Altitud (msnm) Temperatura (°C) pH Oxígeno disuelto (mg/L)	1050 27 5.5-7.9 5	Hematocrito L/L Hemoglobina g/L VSE mm/H VGM fL CMH pg Eritrocitos 10 ¹² /L Leucocitos 10 ⁹ /L Trombocitos 10 ⁹ /L Linfocitos 10 ⁹ /L Neutrófilos 10 ⁹ /L Monocitos 10 ⁹ /L Eosinófilos 10 ⁹ /L Basófilos 10 ⁹ /L	.33 85.6 2.10 185.39 50.50 1.78 12.1 17.5 9.29 0.85 0.16 0.01 0.04
Rego-Barros <i>et al.</i>, 2012. Tilapias cultivada en la región de Paraíba, Río de Janeiro, Brasil.	Adultos W = 441 g L = 28.43 cm.	EDTA.	Temperatura (°C) Oxígeno disuelto (mg/L)	7.0 7.18	Hematocrito L/L Hemoglobina g/L CGMH g/L Trombocitos 10 ⁹ /L Linfocitos 10 ⁹ /L Neutrófilos 10 ⁹ /L Monocitos 10 ⁹ /L Eosinófilos 10 ⁹ /L	.29 97.7 32.98 (%) 64.18 (%) 24.96 (%) 64.45 (%) 10.45 (%) 0.10

VSE (velocidad de sedimentación eritrocitaria), VGM (velocidad globular media), CMH (concentración media de hemoglobina), CGMH (concentración globular media de hemoglobina).

IVETTE MARAI VILLA VILLASEÑOR

Agentes estresantes ambientales:

Cuadro 2. Trabajos publicados en los que se determinan las variaciones en los parámetros hematológicos en *O. niloticus*, provocadas por agentes estresantes ambientales.

Autor, año y lugar	Organismos utilizados	Anestesia y anticoagulante	Altitud y calidad del agua			Parámetros hematológicos (promedio)		
				Control	Estresores		Control	Estresores
Azevedo et al., 2006. Santa Catarina, Brasil.	Adultos de granjas destinadas para la pesca y estanques de piscicultura con asociación con cerdos.	Benzocaina y EDTA.	Temperatura (°C)	23	22.9	Hematocrito L/L	29.2	29
			pH	6.3	6.1	Eritrocitos 10 ¹² /L	1.14	1.24
			Alcalinidad (mg/L)	30	33	Leucocitos 10 ⁹ /L	60	74
			Amonio (mg/L)	0.116		Trombocitos 10 ⁹ /L	38	44.4
			Oxígeno disuelto (mg/L)	6.0	4.5	Linfocitos 10 ⁹ /L	58.80	72.30
						Neutrófilos 10 ⁹ /L	4.8	9.6
						Monocitos 10 ⁹ /L	7.8	8.1
No hay diferencias entre las variables hematológicas de los dos sistemas de cultivo.								
Ishikawa et al., 2007. San Paulo, Brasil.	Juveniles W = 27.13 g L = 12.4 cm. Diferentes concentraciones de mercurio.	Benzocaina y Heparina.	Temperatura (°C)	25.43	25.28	Hematocrito L/L	.26	.21
			pH	6.77	7.03	Hemoglobina g/L	57	46
			Alcalinidad (mg/L)	62.35	50.16	VGM fL	110	120
			Amonio (mg/L)	14.90	11.30	CMH pg	23	27
						CGMH g/L	23	26
						Eritrocitos 10 ¹² /L	2.5	1.6
						Leucocitos 10 ⁹ /L	21	14.1
						Trombocitos 10 ⁹ /L	14.5	20
						Linfocitos 10 ⁹ /L	14	11
						Neutrófilos 10 ⁹ /L	5.8	2.5

IVETTE MARAI VILLA VILLASEÑOR

						Monocitos 10 ⁹ /L	0.75	0.6
No hay diferencias significativas en los valores hematológicos de organismos estresados en relación con el control.								
Ispir et al., 2011. Universidad Firat, Facultad de Pesca, Turquía.	Juveniles W = 12.8 g. Expuestas a diferentes niveles de vitamina E.	Heparina.	Temperatura (°C) pH Oxígeno disuelto (mg/L)	26.6 7.5 7.5	27.0 7.4 7.5	Hematocrito L/L Hemoglobina g/L VGM fL CMH pg CGMH g/L Eritrocitos 10 ¹² /L Leucocitos 10 ⁹ /L	.17 53 170 50.84 29.74 1.05 36	.19 50 188 51.02 26.64 0.99 51
Hay diferencias significativas en el número de leucocitos.								

VSE (velocidad de sedimentación eritrocitaria), VGM (velocidad globular media), CMH (concentración media de hemoglobina), CGMH (concentración globular media de hemoglobina).

Agentes estresantes físicos:

Cuadro 3. Trabajos publicados en los que se determinan las variaciones en los parámetros hematológicos en *O. niloticus*, provocadas por agentes estresantes físicos.

Autor, año y lugar	Organismos utilizados	Anestesia y anticoagulante	Altitud y calidad del agua		Parámetros hematológicos (promedio)			
				Control	Estresores		Control	Estresores
Silva <i>et al.</i> , 2012. Departamento de Piscicultura de la Universidad Federal de Goiás, Brasil.	Adultos W = 340 g. Sometidas a la exposición al aire en diferentes tiempos.	EDTA.	Temperatura (°C)	24.3-27.6	24.3-27.6	Hematocrito L/L	.29	.29
			Oxígeno disuelto (mg/L)	5.18-5.70	5.18-5.70	Hemoglobina g/L	79.7	82
						VGM fL	169	189.7
						CMH pg	45.7	53.6
						CGMH g/L	26.9	28.5
						Eritrocitos 10 ¹² /L	1.7	1.5
						Leucocitos 10 ⁹ /L	13.85	7.084
						Trombocitos 10 ⁹ /L	6.08	3.17
						Linfocitos 10 ⁹ /L	5.2	1.87
						Neutrófilos 10 ⁹ /L	1.84	1.6
			Monocitos 10 ⁹ /L	0.67	0.36			
			Eosinófilos 10 ⁹ /L	0.03	0.05			
Hay diferencias significativas en el número de leucocitos.								

VSE (velocidad de sedimentación eritrocitaria), VGM (velocidad globular media), CMH (concentración media de hemoglobina), CGMH (concentración globular media de hemoglobina).

Agentes estresantes biológicos:

Cuadro 4. Trabajos publicados en los que se determinan las variaciones en los parámetros hematológicos en *O. niloticus*, provocadas por agentes estresantes ambientales.

Autor, año y lugar	Organismos utilizados	Anestesia y anticoagulante	Altitud y calidad del agua		Parámetros hematológicos (promedio)			
			Control	Estresores	Control	Estresores		
Sebastião et al., 2011. Universidad del Estado de São Paulo, Brasil.	Adultos en condiciones sanas y con un diagnóstico clínico de columnaris W = 263.68 g.	Benzocaina y heparina.	Temperatura (°C)	28	28	Hematocrito L/L	.38	.35
			pH	7.4	7.4	Hemoglobina g/L	19	19
			Oxígeno disuelto (mg/L)	4.8	4.8	VSE mm/H	204.38	197.97
						VGM fL	55.75	52.17
						CMH pg	5.35	5.15
						CGMH g/L	1.9	1.81
						Eritrocitos 10 ¹² /L	19	29
						Leucocitos 10 ⁹ /L	17	18
						Trombocitos 10 ⁹ /L	7.7	13
						Linfocitos 10 ⁹ /L	8.7	11

Hay diferencias significativas en el recuento de leucocitos totales.

VSE (velocidad de sedimentación eritrocitaria), VGM (velocidad globular media), CMH (concentración media de hemoglobina), CGMH (concentración globular media de hemoglobina).

5. JUSTIFICACIÓN

Actualmente los estudios relacionados con la tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* en México se centran en abordar aspectos biológicos y productivos. Sin embargo, no existen trabajos publicados que muestren el estado de salud de *O. niloticus* basándose en los parámetros hematológicos como un indicador.

El desconocimiento y la escasez de investigaciones disponibles en áreas como la ictiohematología de especies de importancia productiva y económica, han puesto en desventaja a la producción nacional. Es por ello que el presente trabajo se orientó en determinar los parámetros hematológicos de referencia en *O. niloticus*. Los indicadores hematológicos son económicos y de fácil determinación en condiciones de campo, confiables y reproducibles. Con ello se cuenta con una herramienta útil que permitirá evaluar los cambios originados por efecto del estrés sobre los peces sometidos a cultivo y además de que pondremos a disposición de los acuicultores de tilapia una herramienta económica, útil y eficaz para conocer el estado de salud de los organismos.

6. HIPÓTESIS

Los parámetros hematológicos de la tilapia *Oreochromis niloticus* bajo condiciones de cultivo, pueden utilizarse como indicadores de cambios originados por estrés.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo General

- Establecer los parámetros hematológicos de referencia de la tilapia *Oreochromis niloticus* bajo condiciones óptimas de cultivo y su relación con los agentes estresantes.

7.2. Objetivos Particulares

- Determinar los parámetros hematológicos de la tilapia *Oreochromis niloticus* bajo condiciones óptimas de cultivo (parámetros de referencia).
- Determinar la influencia del sexo en los parámetros hematológicos de la tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* de hembras Stirling, machos Stirling y Supermachos.
- Determinar las variaciones hematológicas en la tilapia *Oreochromis niloticus* provocadas por el efecto de un gradiente altitudinal (0-2000 msnm) considerando temperatura y saturación de oxígeno.
- Determinar las variaciones hematológicas en la tilapia *Oreochromis niloticus* provocadas por un estresor ambiental: disminución de la temperatura del agua de 28 a 22 °C.

8. LITERATURA CITADA

- Abdel-Aziz El-Saydah H., Suzan B. S. Abdu, Tamer El-Sayed Ali and Huda F. Fouad. 2010. **Haemopoiesis in the head kidney of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae): a morphological (optical and ultrastructural) study.** Fish Physiol Biochem, 36: 323–336.
- Adams S. M., K. L. Shepard, M. S. Greeley Jr, B. D. Jimenez, M. G. Ryon, L. R. Shugart and J. F. McCarthy. 1989. **The Use of Bioindicators for Assessing the Effects of Pollutant Stress on Fish.** Marine Environmental Research, 28: 459-464.
- Álvarez, L. 2008. **Efectos negativos del estrés sobre la reproducción en animales domésticos.** Arch. Zootec, 57: 39-59.
- Arredondo-Figueroa José Luis y Silvia Delia Lozano-Gracia. 2003. **La acuicultura en México.** Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. 266 pp.
- Arroyo-Damián M. 2008. **Aprovechamiento de la harina de *Plecostomus spp.* Como ingrediente en alimento para el crecimiento de tilapia (*Oreochromis niloticus*).** Tesis de Maestría. Centro interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional CIIDIR Michoacán. Instituto Politécnico Nacional. Jiquilpan, Michoacán. 115 pp.
- Arturo-Rodríguez C. H. 2012. **El estrés en peces de granja.** Revista Investigación Pecuaria, 1 (1): 47-52.
- Azevedo T. M., M. L. Martins, M. M. Yamashita y C. J. Francisco. 2006. **Hematología de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no vale do rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil.** B. Inst. Pesca, São Paulo, 32 (1): 41-49.

- Barandica C. Lilian M. y Luis Tort B. 2008. **Neuroendocrinología e Inmunología de la Respuesta al Estrés en Peces**. Rev. Acad. Colomb. Cienc., 32 (123): 267-284.
- Barandica C. Lilian. 2010. **Efectos de las dietas experimentales en la respuesta inmune de los peces**. Tesis de doctorado. Facultad de Biociencias. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. 127 pp.
- Barton, B.A., J.D. Morgan and M.M. Vijayan. 2002. **Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish**. Chapter 4 in S.M. Adams, editor. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. In press.
- Bastardo A. y B. Díaz. 2004. **Parámetros hematológicos de la paragua, *Chaetodipterus faber* (Broussonet) (Pices: Ehippidae), en condiciones de cultivo**. Zootecnia Trop., 22 (4): 361-370.
- Basualdo-Ramírez Luis Javier, Fernando Jiménez-Guzmán, Antonio César Jiménez-Saavedra, Francisco Javier Macal-Niño, Eduardo A. Mendoza-Quintero Mármol, David Miguel Montaña-Aguilar, Edmundo Urcelay-Gutiérrez. 2012. **Criterios Técnicos y Económicos para la Producción Sustentable de Tilapia en México**. Comité Sistema Producto Tilapia de México AC. México. 181 pp.
- Buenaño M. V. 2010. **Hemograma de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en tres etapas de producción en la cuenca alta de la provincia del Napo, Ecuador**. Boletín Técnico 9, Serie Zoológica, 6: 1-14.
- Campbell Terry W. 2012. **Hematology of Fish**. En: Thrall Mary Anna, Glade Weiser, Robin W. Allison, Terry W. Campbell (Second Edition). **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Wiley-Blackwell, A John Wiley & Sons, Inc. Published. USA. pp 298-312.
- Castro-Rivera R., J. P. Hernández-Girón y G. Aguilar-Benítez. 2004. **Evaluación del crecimiento de alevines de tres especies de Tilapia (*Oreochromis***

sp.) en aguas duras, en la región de la Cañada, Oaxaca, México. Revista AquaTIC, (20): 38-43.

Clauss Tonya M., Alistair D. M. Dove and Jill E. Arnold. 2008. **Hematologic disorders of fish.** Vet Clin Exot Anim, 11: 445-462.

Ekanem A. P., A. P. Inyang-Etoh and A.J. Udoh. 2012. **Effect of Different Anticoagulants on Hematological Parameters of *Oreochromis niloticus*.** International Journal of Science and Advanced Technology, 2 (6): 17-20.

FAO. 2015. **Cultured Aquatic Species Information Programme *Oreochromis niloticus*.** Programa de información de especies acuáticas. Texto de Rakocy, J. En: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 18 february 2005. [Citado 10 january 2015].

Flores-Quintana Carolina. 2002. **Respuestas neuroendócrinas al estrés en peces teleósteos.** Rev.ictiol., 10 (1/2): 57-78.

Hahn-Von-Hessberg C. M., A. Grajales-Quintero y A. V. Gutiérrez-Jaramillo. 2011. **Parámetros hematológicos de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1757) con peso entre 250 g y 350 g, en el Centro Experimental Piscícola de la Universidad de Caldas.** Vet. Zootec., 5 (1): 47-61.

Hrubec T. C., J. L. Cardinale and S. A. Smith. 2000. **Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*).** Veterinary Clinical Pathology, 29 (1): 7-12.

Hrubec T. C. y S. A. Smith. 2010. **Hematology of fishes.** En: Douglas J. W. y K. J. Wardrop (6° Edición). **Veterinary Hematology.** Editorial WILEY-BLACKWELL. USA. pp. 994-1003.

Ishikawa N. M., M. J. Tavares Ranzani-Paiva, J. V. Lombardi and C. M. Ferreira. 2007. **Hematological parameters in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to sub-lethal concentrations of mercury.** Brazilian archives of biology and technology an international journal, 50 (4): 619-626.

- Ispir U., M. E. Yonar and O. B. Oz. 2011. **Effect of dietary vitamin e supplementation on the blood parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. The Journal of Animal & Plant Sciences, 21 (3): 566-569.
- Morales-Díaz Armando. 1991. **La tilapia en México, biología, cultivo y pesquerías**. AGT EDITOR, S.A. 189 pp.
- Ocampo A. A. y L. O. Camberos. 1999. **Diagnóstico del Estrés en Peces**. Vet. Méx., 30 (4): 337-344 pp.
- Olabuenaga Susana E. 2000. **Sistema inmune en peces**. Gayana (Concepc.), 64 (2): 17-25.
- Peña-Mendoza B., J. L. Gómez-Márquez y G. García-Alberto. 2011. **Ciclo reproductor e histología de las gónadas de tilapia *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae)**. Ciencia Pesquera, 19 (2): 23-36.
- Pickering Alan D. 1998. **Stress responses of farmed fish**. En: Black Kenneth D. y Pickering Alan D. **Biology of Farmed Fish**. Sheffield Academic Press Ltd. England. pp. 222-255.
- Portz Donald E., Christa M. Woodley and Joseph J. Cech. 2006. **Stress-associated impacts of short-term holding on fishes**. Rev Fish Biol., 16:125–170.
- Rego-Barros R. C., N. R. Pereira-Almosny, E. de F. Marqués de Mesquita y R. de A. Torres-Filho. 2012. **Observação sobre os aspectos hematológicos de tilapia, *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Ciclidae), capturada em cultivos na região de piraí, rio de Janeiro, Brasil**. Rev. Bras. Med. Vet., 34 (3):183-187.
- Rodrigues-Bittencourt N., L. Ma. Molinari, D. Oliveira-Scoaris, R. Bocchi-Pedroso, C. Vataru-Nakamura, T. Ueda-Nakamura, B. Alves de Abreu-Filho and B. Prado-Dias Filho. 2003. **Haematological and biochemical values for Nile**

- tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in semi-intensive system.** Acta Scientiarum. Biological Sciences, Maringá, 25 (2): 385-389.
- Rubio-Godoy Miguel. 2010. **Inmunología de los peces óseos.** Revisión. Rev Mex Cienc Pecu, 1 (1): 47-57.
- Toledo-Pérez, S.J. y M. C. García-Capote. 2000. **Nutrición y alimentación de tilapia cultivada en América Latina y el Caribe.** En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México. 83-137.
- Salazar-Ariza Gustavo. 2001. **Fundamentos de acuicultura continental.** 2a. ad. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. Bogotá, Colombia. 418 pp.
- Sebastião F. A., D. Nomura, R. Sakabe and F. Pilarski. 2011. **Hematology and productive performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) naturally infected with *Flavobacterium columnare*.** Brazilian Journal of Microbiology, 42: 282-289.
- Silva R. D., L.O. Rocha, B.A.D. Fortes, D Vieira and M. C. S. Fioravanti. 2012. **Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar.** Pesq. Vet. Bras., 32: 99-107.
- Silveira-Coffigny Raquel. 2005. **Índices hematológicos y celulares como bioindicadores de estrés en *Oreochromis aureus* Steindachner (tilapia) de cultivo.** Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur. 115 pp.
- Varga Dániel, András Szabó, Csaba Hancz, Zsigmond Jeney, László Ardó, Marcell Molnár and Tamás Molnár. 2013. **Impact of handling and pre-mortal stress on the quality of common carp (*Cyprinus carpio* L.).** The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh, 66: 1-7.

Watanabe W. O., T. M. Losordo, K. Fitzsimmons and F. Handley. 2002. **Tilapia Production Systems in the Americas: Technology Advances, Trends, and challenges**. Reviews in Fisheries Science, 10 (3 y 4): 465-498.

Weber Robilson Antonio. 2009. **Efecto del estrés y de la anestesia sobre indicadores primarios y secundarios de estrés y sobre los neurotransmisores monoaminérgicos cerebrales en el lenguado *Solea senegalensis* Kaup, 1858**. Tesis de Doctorado. Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. 213 pp.

Zaragoza O. B. 2004. **Efecto del estrés térmico sobre los parámetros sanguíneos de la tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) (Pisces: Cichlidae)**. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada. Ensenada, B.C. 142 pp.

CAPITULO I

PARÁMETROS

HEMATOLÓGICOS

DE REFERENCIA

9. CAPITULO I

9.1. Parámetros hematológicos de referencia de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1757) bajo condiciones óptimas de cultivo

9.1.1. Resumen

La tilapia es un pez que se utiliza comúnmente en la acuicultura debido a que es apreciada para fines alimenticios. A pesar de que la tecnología de cultivo esta bien desarrollada, los reportes de parámetros hematológicos en esta especie bajo las condiciones de cultivo de México son limitados. Por lo tanto se carece de la línea base de referencia para el estudio hematológico de la tilapia. El objetivo de éste trabajo fue determinar los parámetros hematológicos de referencia de la tilapia *Oreochromis niloticus* bajo condiciones óptimas de cultivo. Los peces fueron criados en un sistema de recirculación durante cinco meses, después de éste tiempo se procedió a la toma de muestra de sangre de 120 organismos. La sangre fue analizada utilizando técnicas estándar y los intervalos de referencia se determinaron utilizando métodos paramétricos. En relación con la morfología de los elementos celulares se identificaron 12 tipos de células: eritrocitos maduros, policromatocitos, trombocitos maduros e inmaduros, linfocitos menores a 10 µm, con pseudópodos, con un tamaño mayor a 10 µm, neutrófilos mielocitos, metamielocitos, juveniles, adultos y monocitos. Los valores de los parámetros hematológicos obtenidos en esta investigación son semejantes a los reportados por otros autores para *O. niloticus* en condiciones similares en otros países, pero con la diferencia de tener intervalos con una menor amplitud.

Palabras clave: tilapia, acuicultura, células sanguíneas.

9.1.2. Abstract

Tilapia is a commonly used fish in aquaculture because it is appreciated for food purposes. Although culture technology is well developed, reports of hematological parameters in this species under culture conditions in Mexico are

limited. Therefore there are not a reference baseline for hematological study of tilapia. The objective of this study was to determine reference hematological parameters of tilapia *Oreochromis niloticus* under optimal culture conditions. The fish were reared in a recirculation system for five months, after this time we proceeded to taking a blood sample from 120 organisms. Blood was analyzed using standard techniques and reference intervals were determined using parametric methods. Regarding the morphology of cellular elements 12 cell types were identified: mature erythrocytes, policromatocitos, mature and immature thrombocytes, lower lymphocytes to 10 μm , pseudopods, with greater than 10 μm size, myelocytes neutrophils, metamyelocytes, youth, adults and monocytes. The values of haematological parameters obtained in this study are similar to those reported by other authors for *O. niloticus* in similar conditions in other countries, but with the difference of intervals with lower amplitude.

Keywords: tilapia, aquaculture, blood cells.

9.1.3. Introducción

La sangre es el componente más accesible en el sistema de fluidos corporales de los vertebrados, en consecuencia, es el tejido examinado con más frecuencia para evaluar el estado fisiológico de los organismos. Debido a esto, los parámetros hematológicos se consideraron una herramienta prometedora para conocer el estado de salud de los peces (Houston, 1997).

Los parámetros hematológicos sirven para evaluar la presencia de enfermedades infecciosas, desbalance nutricional, efectos tóxicos, condiciones anóxicas, cambios ambientales y otros agentes estresantes que se presentan en los cultivos de peces (Kefas *et al.*, 2015). Un examen hematológico comprende: la determinación de la concentración de hemoglobina, el porcentaje de hematocrito, el cálculo de los índices hematológicos que incluyen la velocidad globular media (VGM) y la concentración globular media de hemoglobina (CGMH), los conteos totales y diferenciales de los diferentes grupos celulares y la morfología de estos (Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011).

Para poder emplear a los parámetros hematológicos como una herramienta diagnóstica es necesario analizar dichos indicadores en peces saludables y en óptimas condiciones ambientales para establecer los valores de referencia de la especie. El concepto de valores de referencia se introdujo en 1969 por Grasbeck y Saris para describir las fluctuaciones de las concentraciones de analitos en sangre en grupos bien caracterizados de individuos. Los intervalos de referencia son obtenidos a partir de un grupo de muestra de individuos sanos. La población de estos individuos describe la variación de los valores que se pueden esperar en animales sanos. El razonamiento lógico detrás del uso de estos intervalos es que un valor medido fuera del intervalo de referencia es poco probable que se origine en un individuo sano y por lo tanto representará un individuo enfermo (Weiser y Allison, 2012). Un intervalo de referencia abarca los valores de la mediana (95%) de una población sometida a prueba de animales aparentemente sanos. En la mayoría de los casos, los animales sanos son aquellos que no tienen la enfermedad y no presentan anomalías detectables en un examen superficial. En general, entre más animales se muestrean es más probable que los intervalos de referencia verdaderamente reflejen el intervalo de valores que se espera en los animales sanos. Para una mayor confiabilidad, deben analizarse un mínimo de 120 muestras para establecer los intervalos de referencia (Geffre *et al.*, 2009; Kjelgaard-Hansen y Lundorff-Jensen, 2010).

Por lo anterior, el objetivo de éste trabajo fue determinar los parámetros hematológicos de referencia de la tilapia *Oreochromis niloticus* bajo condiciones óptimas de cultivo.

9.1.4. Materiales y Métodos

La presente investigación se realizó en la Unidad Acuícola del Laboratorio de Biología Acuática J. Javier Alvarado Díaz, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

9.1.4.1. Diseño experimental

Organismos utilizados

Los organismos que se utilizaron en la presente investigación fueron obtenidos de la granja acuícola Tecnopez, en agosto del 2015. Se obtuvieron 500 crías de la tilapia *O. niloticus*, línea GIFT, con un peso promedio de 0.5 gramos. Los organismos fueron cultivados en la Unidad Acuícola del laboratorio de Biología Acuática, durante cuatro meses en condiciones óptimas para el cultivo de tilapia, según lo propuesto en la Carta Nacional Acuícola (Cuadro 5).

Cuadro 5. Parámetros físico-químicos óptimos del agua para el cultivo de tilapia (INP, 2011).

PARAMETRO	ÓPTIMO	LIMITES
Temperatura	24 °C - 29 °C	< 22 < 32 °C
Oxígeno disuelto	< 5 mg/l	> 3 mg/l
pH	7.5	> 6.5 - < 8.5
CO ₂	< 30	< 50
Amonio	0.1	< 0.1 mg/L
Nitritos	4.6	< 5 mg/L
Salinidad	depende	< 20
Turbidez	25	< 30

Después de los cuatro meses, se seleccionaron un total de 200 tilapias adultas con peso promedio \pm error estándar de 163.3 ± 2.5 y con una longitud patrón 16.27 ± 0.06 , para distribuirlos en cuatro estanques de aclimatación, con 50 organismos por estanque. Los organismos se mantuvieron en estos estanques durante un mes. Todos los días se revisaron las variables físicas y químicas del agua con un multiparamétrico (YSI Modelo 6820V2, USA). La alimentación de los peces se realizó *ad libitum*, seis veces al día, con alimento comercial de la marca Nutripec, cabe destacar que el alimento suministrado era el recomendado para cada etapa por la que se encontraba la tilapia. Posteriormente 30 organismos de

cada estanque fueron seleccionados al azar para la toma de muestra de sangre. A estos peces se les midió la longitud total, longitud patrón y peso total.

Manipulación de los organismos y anestesia

La toma de muestras de sangre y la medición de las variables longitud total, longitud patrón y peso total, se llevó a cabo bajo anestesia para minimizar la influencia del estrés por manipulación durante el muestreo, así como para cumplir con normas éticas para la experimentación con seres vivos (Hrubec y Smith, 2010). Los peces fueron anestesiados por inmersión en un 10% (p/v) de benzocaína (solución de 4-aminobenzoato de etilo). La concentración de esta solución en agua fue de 1:10,000. Una vez extraída la sangre de los peces, estos se colocaron en recipiente de plástico con agua limpia y oxigenada para su pronta recuperación, y cuando estuvieron totalmente recuperados fueron asignados a otros estanques (Campos-Mendoza, 2004).

Procedimiento para la toma de muestra de sangre

La toma de muestras de sangre se realizó a través de punción de la vena caudal con jeringas estériles de insulina (1 mL) y agujas 23 G impregnadas con heparina, el cual es un anticoagulante (4-mg/mL). De cada organismo se obtuvo 1 mL de sangre y en el lugar que se realizó la punción se le colocó azul de metileno con una torunda. Inmediatamente después del muestreo, la aguja se retiró de la jeringa, seguidamente, las muestras de sangre se depositaron en microtubos eppendorf que contenían heparina para 1 mL de sangre y se colocaron en hielo hasta que se completó el muestreo (Campos-Mendoza, 2004).

9.1.4.2. Trabajo de laboratorio

Los análisis de las muestras de sangre incluyeron:

Velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSE):

Un tubo de microhematocrito se llenó hasta una altura de 50 mm y se selló uno de los extremos colocándose en posición vertical por una hora a temperatura ambiente. Con papel milimétrico se determinó el descenso de los eritrocitos en la

columna de sangre. El resultado se expresó como VSE en mm/hora (Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011).

Hemoglobina (Hb):

Para ésta prueba se utilizó el reactivo de Drabkin y se siguió el método de la cianometahemoglobina. Un tubo de ensayo se llenó con 1.5 mL del reactivo de Drabkin y con seis microlitros de sangre, se mezcló y se dejó reposar durante 10 minutos. Después la muestra se centrifugó durante 5 minutos y posteriormente se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 546 nm. El resultado de la concentración de hemoglobina se expresó en g/L (Valenzuela *et al.*, 2002; Correa-Negrete *et al.*, 2009; Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011).

Recuento de eritrocitos (RGR) y leucocitos (RGB):

Para la evaluación de este parámetro se utilizó la solución de Natt y Herricks, una pipeta hematológica de toma calibrada, la cámara de Neubauer y el microscopio.

Lo primero que se realizó fue tomar 5 microlitros de sangre con la pipeta de toma, después tomar de la solución de Natt y Herricks hasta llegar a una dilución 1:200 de sangre-solución. Posteriormente se mezcló durante un minuto y se depositó una gota en uno de los compartimientos de la cámara de Neubauer, extendiéndose por capilaridad entre la cámara y el cubreobjetos, se dejó reposar durante tres minutos y se observó en el microscopio (Conroy, 1998). El recuento de eritrocitos se realizó en el cuadro central de la cámara (solo se contaron cinco cuadros, los cuadros de las esquinas y el cuadro central). El recuento de los leucocitos se realizó en los cuatro cuadros grandes de la cámara (Buenaño, 2010; Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011). El número de eritrocitos se expresó en células por $10^{12}/L$ y el número de leucocitos se expresó en células por $10^9/L$ (Buenaño, 2010).

Hematocrito (Hcto):

Un tubo de microhematocrito se llenó con sangre hasta una altura de cinco centímetros. Para evitar burbujas de aire se selló uno de los extremos del tubo, se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos. La lectura se realizó utilizando una regla milimétrica, el resultado se expresó en L/L (Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011).

Volumen globular medio (VGM):

Para obtener este parámetro se realizó la siguiente formula (Buenaño, 2010; Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011):

$$VGM (fL) = \frac{Hcto (L/L) \times 1000}{RGR (celulas \times 10^{12}/L)}$$

Concentración globular media de hemoglobina (CGMH):

Para obtener este parámetro se realizó la siguiente formula (Buenaño, 2010):

$$CGMH (g/L) = \frac{Hb (g/L) \times 100}{Hcto (L/L)}$$

El análisis de la morfología leucocitaria y eritrocitaria se realizó con base a frotis sanguíneos delgados, secados en el aire, fijados en metanol y teñidos por la técnica estándar de Diff-Quick (Conroy y Conroy, 2007). Los frotis fueron observados con lente de 100 x y aceite de inmersión. Cada campo se visualizó siguiendo un patrón estándar de zigzag, identificando diferentes tipos de glóbulos blancos y trombocitos hasta llegar a 200 células. Cada tipo de leucocito y trombocito se expresó en número de células por $10^9/L$ y se les tomaron fotos. Para cada organismo se observaron dos laminillas para obtener un promedio. Cada tipo de célula observada en el microscopio fue medida tanto en el ancho y largo del citoplasma como el del núcleo, usando el programa INFINITY ANALYZE (Buenaño, 2010).

9.1.4.3. Análisis de datos

Los valores de referencia de los parámetros hematológicos de las tilapias en condiciones óptimas de cultivo se determinaron al eliminar 2.5 % de los valores inferiores y superiores, cubriendo así 95 % de los valores centrales. Los valores restantes proporcionaron el intervalo de la referencia, tomando el valor más bajo y el más alto. Además se tomaron los intervalos de referencia del diámetro de cada célula, se midieron cinco células de cada tipo identificado por cada organismo.

9.1.5. Resultados

A un total de 120 tilapias adultas de *O. niloticus*, línea GIFT, de cinco meses de edad, con peso promedio \pm error estándar de 283.9 ± 3.9 y longitud patrón de 19.6 ± 0.08 se les tomaron muestras de sangre.

Los valores de los parámetros físicos y químicos del agua donde fueron cultivadas las tilapias se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Parámetros físicos y químicos del agua, promedio y error estándar.

PARÁMETRO	UNIDAD ACUÍCOLA DE MORELIA
Temperatura (°C)	28.31 ± 0.08
Presión (mmHg)	609.44 ± 0.24
Saturación de Oxígeno (%)	88.47 ± 0.75
Oxígeno disuelto (mg/L)	5.52 ± 0.05
Total de sólidos disueltos (TDS)	491.67 ± 2.82
NH₄⁺-N (mg/L)	0.62 ± 0.01
NH₃-N (mg/L)	0.15 ± 0.04
Conductividad (C-us/cm)	802.89 ± 4.27
pH	8.32 ± 0.01
Salinidad	0.36 ± 0.02

En el Cuadro 7 se muestran los resultados de los parámetros hematológicos de referencia.


IVETTE MARAI VILLA VILLASEÑOR

Cuadro 7. Parámetros hematológicos de referencia para *Oreochromis niloticus*.

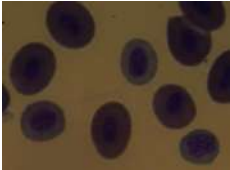
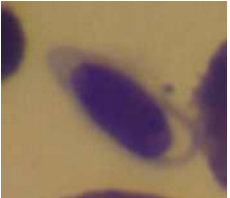

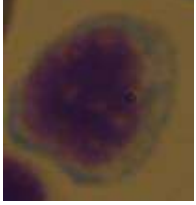

Analito	Unidad	Promedio ± Error estándar	Valores de Referencia	
			Valor mínimo	Valor máximo
VSE	mm/H	1.90 ± 0.08	1.81	2.12
Hematocrito	L/L	0.34 ± 0.02	0.32	0.36
Hemoglobina	g/L	88.44 ± 0.60	85	92
Eritrocitos	10 ¹² /L	1.95 ± 0.02	1.80	2.10
VGM	f/L	178.19 ± 2.31	173.61	183.00
CGMH	g/l	258.32 ± 1.43	255.49	262.00
Policromatocitos	10 ¹² /L	0.06 ± 0.00	0.06	0.07
Trombocitos maduros	10 ⁹ /L	28.62 ± 1.08	26.48	30.77
Trombocitos Inmaduros	10 ⁹ /L	2.98 ± 0.34	2.30	3.65
Leucocitos	10 ⁹ /L	47.67 ± 1.60	44.50	50.84
DIFERENCIAL				
Neutrófilos mielocitos	10 ⁹ /L	2.70 ± 0.21	1	3.50
Neutrófilos metamielocitos	10 ⁹ /L	0.41 ± 0.04	0.21	0.50
Neutrófilos juveniles	10 ⁹ /L	0.03 ± 0.01	0.006	0.05
Neutrófilos adultos	10 ⁹ /L	0.14 ± 0.02	0.09	0.20
Monocitos	10 ⁹ /L	1.04 ± 0.08	0.05	1.20
Linfocitos menores a 10 μm	10 ⁹ /L	38.97 ± 1.49	36.93	41.93
Linfocitos menores a 10 μm con seudópodos	10 ⁹ /L	3.98 ± 0.45	2.07	4.90
Linfocitos mayores de 10 μm	10 ⁹ /L	0.31 ± 0.05	0.21	0.41

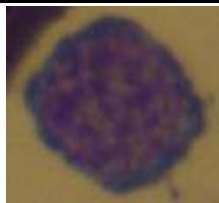
En relación con la morfología de los elementos celulares se identificaron 12 tipos de células: eritrocitos maduros, policromatocitos, trombocitos maduros e inmaduros, linfocitos menores a 10 μm, con seudópodos, con un tamaño mayor a 10 μm, neutrófilos mielocitos, metamielocitos, juveniles, adultos y monocitos (Cuadro 8).

Cuadro 8. Células sanguíneas de *Oreochromis niloticus*, promedio.

Célula	Tamaño (μm)	Características
Eritrocito maduro	Citoplasma 10.34 - 6.80 Núcleo 5.21 - 3.26.	Los eritrocitos son nucleados, de forma elíptica. El núcleo localizado en el centro de la célula.
		

IVETTE MARAI VILLA VILLASEÑOR

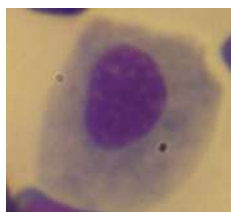
<p>Policromatocito</p> 	<p>Citoplasma 7.66 - 5.98 Núcleo 4.98 - 3.84.</p>	<p>Células parecidas a los eritrocitos maduros pero con un color azul grisáceo.</p>
<p>Trombocito maduro</p> 	<p>Citoplasma 6.97 - 4.47 Núcleo 5.65 - 3.41.</p>	<p>Con forma elíptica al igual que el núcleo, con citoplasma ligeramente basófilo.</p>
<p>Trombocito inmaduro</p> 	<p>Citoplasma 6.04 - 5.26 Núcleo 4.67 - 4.20.</p>	<p>Con forma redonda o elíptica, se puede confundir con un linfocito, pero son más pequeños.</p>
<p>Linfocito menor a 10 μm</p> 	<p>Citoplasma 8.63 - 6.25 Núcleo 6.67 - 4.59.</p>	<p>El núcleo ocupa casi todo el tamaño de la célula.</p>
<p>Linfocito menor a 10 μm, conseudópodos</p> 	<p>Citoplasma 9.63 - 6.46 Núcleo 6.80 - 5.55.</p>	<p>Presenta forma irregular con prominentesseudópodos.</p>
<p>Linfocito mayor a 10 μm</p>	<p>Citoplasma 11.04 - 8.31 Núcleo 6.85 - 6.23.</p>	<p>Con la misma forma que los linfocitos menores a 10 μm, lo único que cambia es el tamaño.</p>



Neutrófilo mielocito

Citoplasma 14.08 - 10.15
Núcleo 7.54 - 5.00.

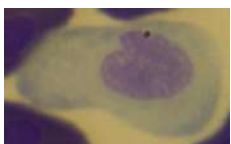
Con forma redonda al igual que el núcleo.



Neutrófilo metamielocito

Citoplasma 14.06 - 10.44
Núcleo 6.67 - 4.59.

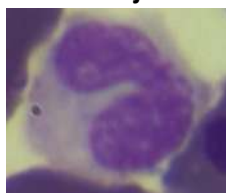
El núcleo de ésta célula tiene forma de corazón y tiene posición excéntrica.



Neutrófilo juvenil

Citoplasma 13.36 - 10.30
Núcleo 8.07 - 4.14.

El núcleo de esta célula presenta forma de banda.



Neutrófilo adulto

Citoplasma 14.76 - 9.72
Núcleo 7.80 - 4.10.

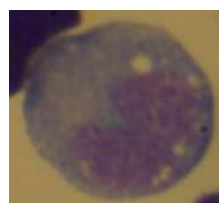
El núcleo de ésta célula es bilobulado con posición excéntrica.



Monocito

Citoplasma 13.93 - 10.06
Núcleo 9.26 - 5.87.

Presentan citoplasma vacuolado y basofílico.



9.1.6. Discusión

La mayor parte de los estudios sobre parámetros hematológicos de referencia de la tilapia nilótica son realizados con un bajo número de organismos (Hrubec *et al.*, 2000; Rodrigues-Bittencourt *et al.*, 2003; Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011). Esto puede ocasionar que dichos parámetros reflejen en forma limitada toda la variación o que se sobreestime o subestime los valores máximos y mínimos de los intervalos (Kjelgaard-Hansen y Lundorff-Jensen, 2010). Esto planteaba la problemática de determinar si su uso se adecua a los organismos y condiciones locales. Los resultados de este estudio fueron congruentes con lo reportado por la literatura, sin embargo presentaron particularidades respecto a los intervalos de las variables.

Los intervalos de las variables hematológicas que se determinaron para el presente coinciden con los registrados para la tilapia híbrida de las cruza entre *Oreochromis nilotica* * *O. mossambicus* * *O. aureus* del Centro de Acuicultura de Virginia, EUA (Hrubec *et al.*, 2000). Los intervalos obtenidos en nuestra investigación son más homogéneos y presentan una menor amplitud. Los organismos utilizados para ambos trabajos fueron similares en peso, condiciones de cultivo y en el método para obtener los parámetros hematológicos de referencia, por lo que la diferencia puede deberse al empleo de híbridos o al tamaño de muestra reducido utilizado por Hrubec *et al.* (2000).

El tamaño de la muestra se relaciona directamente con la amplitud de los intervalos, por lo que este es clave en los resultados observados en los diversos trabajos. Los resultados obtenidos en este trabajo tienen un intervalo con una amplitud reducida con respecto al trabajo realizado en tilapias adultas de *O. niloticus* revertidas sexualmente en Colombia, con condiciones similares (Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011), pero este autor empleo un número de muestra de 50 organismos y no realizo intervalos de referencia, solo obtuvo el valor mínimo y el valor máximo. Por lo anterior, es claro que el tamaño de muestra es importante para estudios hematológicos posteriores.

El valor máximo encontrado de las variables VSE, hematocrito y recuento de glóbulos rojos es inferior a lo reportado en los siguientes trabajos (Hrubec *et al.*, 2000; Rodrigues-Bittencourt *et al.*, 2003; Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011) (Cuadro 9). Esto podría deberse a las diferencias en los sistemas de cultivo, pues estos presentan condiciones medioambientales y de manejo propios (Grant, 2015).

Cuadro 9. Concentraciones hemáticas de *Oreochromis niloticus* según varios autores.

Analito	Unidad	Valor de referencia	Autor
VSM	mm/H	1 – 5	Hahn-Von-Hessberg <i>et al.</i> , 2011
		1.81 – 2.12	Presente trabajo
Hematocrito	L/L	0.27 – 0.37	Hrubec <i>et al.</i> , 2000
		0.15 – 0.45	Rodrigues-Bittencourt <i>et al.</i> , 2003
		0.15 – 0.33	Silveira-Coffigny, 2005
		0.27 – 0.43	Hahn-Von-Hessberg <i>et al.</i> , 2011
		0.32 – 0.35	Presente trabajo
Hemoglobina	g/L	70 – 98	Hrubec <i>et al.</i> , 2000
		65.8 – 159.8	Rodrigues-Bittencourt <i>et al.</i> , 2003
		46 – 80	Silveira-Coffigny, 2005
		55.9 – 116.1	Hahn-Von-Hessberg <i>et al.</i> , 2011
		85 – 92	Presente trabajo
Eritrocitos	10 ¹² /L	1.90 – 2.83	Hrubec <i>et al.</i> , 2000
		0.7 – 2.8	Rodrigues-Bittencourt <i>et al.</i> , 2003
		0.7 – 1.72	Silveira-Coffigny, 2005
		1.09 – 2.76	Hahn-Von-Hessberg <i>et al.</i> , 2011
		1.8 – 2.1	Presente trabajo
VGM	f/L	115 – 183	Hrubec <i>et al.</i> , 2000

		123.6 – 528.57	Rodrigues-Bittencourt <i>et al.</i> , 2003
		150.9 – 297	Silveira-Coffigny, 2005
		97.82 – 357.79	Hahn-Von-Hessberg <i>et al.</i> , 2011
		173.61 - 183	Presente trabajo
Trombocitos	$10^9/L$	25.06 – 85.21	Hrubec <i>et al.</i> , 2000
		42 – 49.60	Hahn-Von-Hessberg <i>et al.</i> , 2011
		26.48 – 30.77	Presente trabajo
Leucocitos	$10^9/L$	21.55 – 154.69	Hrubec <i>et al.</i> , 2000
		18 – 21	Hahn-Von-Hessberg <i>et al.</i> , 2011
		44 – 50	Presente trabajo
Neutrófilos	$10^9/L$	0.55 – 9.87	Hrubec <i>et al.</i> , 2000
		0 – 3.2	Hahn-Von-Hessberg <i>et al.</i> , 2011
		1 – 3.50	Presente trabajo
Linfocitos	$10^9/L$	28.33 – 167.22	Hrubec <i>et al.</i> , 2000
		5.92 – 11.3	Hahn-Von-Hessberg <i>et al.</i> , 2011
		36.93 – 41.93	Presente trabajo
Monocitos	$10^9/L$	0.4 – 4.28	Hrubec <i>et al.</i> , 2000
		0 – 0.96	Hahn-Von-Hessberg <i>et al.</i> , 2011
		0.05 – 1.20	Presente trabajo

9.1.7. Conclusión

Los parámetros hematológicos encontrados son congruentes con los encontrados en otras regiones geográficas, sin embargo presentan un intervalo de menor amplitud. Por lo tanto, se sugiere utilizar los parámetros de referencia propuestos en este estudio como herramienta diagnóstica para el estado de Michoacán.

9.1.8. Literatura Citada

- Buenaño M. V. 2010. **Hemograma de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en tres etapas de producción en la cuenca alta de la provincia del Napo, Ecuador.** Boletín Técnico 9, Serie Zoológica, 6: 1-14.
- Campos-Mendoza Antonio. 2004. **Regulatory Mechanisms Associated with Egg Production and Egg Activation in *Oreochromis niloticus*.** Tesis de Doctorado. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, Scotland U.K. 245 pp.
- Conroy, D. A. 1998. **Manual de métodos y técnicas de laboratorio de uso común en la hematología pisciaria.** Departamento de Biología, Microbiología y Bacteriología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Santa. Venezuela. 25p.
- Conroy D. y G. Conroy. 2007. **Atlas Básico de las Células Sanguíneas Normales y Anormales en Tilapias Cultivadas.** Patterson Peddie Consulting Ltd.
- Correa-Negrete J. C., A. A. Garrido-Correa, M. J. Prieto-Guevara, V. J. Atencio-García, S. C. Pardo-Carrasco. 2009. **Caracterización de células sanguíneas y parámetros hematológicos en blanquillo *Sorubim cuspicaudus*.** Zootecnia Trop., 27 (4): 393-405.
- Geffre A., K. Friedrichs, K. Harr, D. Concordet, C. Trumel and J. P. Braun. 2009. **Reference values: a review.** Veterinary Clinical Pathology, 38(3): 288-298.
- Hahn-Von-Hessberg C. M., A. Grajales-Quintero and A. V. Gutiérrez-Jaramillo. 2011. **Parámetros hematológicos de *Tilapia nilótica (Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1757) con peso entre 250 g y 350 g, en el Centro Experimental Piscícola de la Universidad de Caldas.** Vet. Zootec., 5 (1): 47-61.

- Houston Arthur H. 1997. **Review: Are the Classical Hematological Variables Acceptable Indicators of Fish Health?** Transactions of the American Fisheries Society, 126 (6): 879-894.
- Hrubec T. C., J. L. Cardinale, S. A. Smith. 2000. **Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*).** Veterinary Clinical Pathology, 29 (1): 7-12.
- Hrubec T. C. and S. A. Smith. 2010. **Hematology of fishes.** En: Douglas J. W. y K. J. Wardrop (6° Edición). **Veterinary Hematology.** Editorial WILEY-BLACKWELL. USA. pp. 994-1003.
- INP/SEMARNAP. 2011. **Carta Nacional Pesquera.** Diario Oficial de la Federación. 1 junio.
- Kefas M., K. Abubakar, A. Ja'afaru. 2015. **Haematological indices of tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Lake Geriyo, Yola, Adamawa State, Nigeria.** International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 3(1): 09-14.
- Kjelgaard-Hansen Mads and Asger Lundorff-Jensen. 2010. **Reference Intervals.** En: Douglas J. W. y K. J. Wardrop (6° Edition). **Veterinary Hematology.** Editorial WILEY-BLACKWELL. USA. pp. 1034-1038.
- Rodrigues-Bittencourt N., L. Ma. Molinari, D. Oliveira-Scoaris, R. Bocchi-Pedroso, C. Vataru-Nakamura, T. Ueda-Nakamura, B. Alves de Abreu-Filho y B. Prado Dias-Filho. 2003. **Haematological and biochemical values for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in semi-intensive system.** Acta Scientiarum. Biological Sciences, Maringá, 25 (2): 385-389.
- Silveira-Coffigny Raquel. 2005. **Índices hematológicos y celulares como bioindicadores de estrés en *Oreochromis aureus* Steindachner (tilapia) de cultivo.** Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur. 115 pp.

Valenzuela A., K. Alveal y E. Tarifeño. 2002. **Respuestas hematológicas de truchas (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) a estrés hipoxico agudo: serie roja.** *Gayana*, 66 (2): 255-261.

Weiser Glade and Robin W. Allison. 2012. **Perspectives in Laboratory Data Interpretation and Disease Diagnosis.** En: Thrall Mary Anna, Glade Weiser, Robin W. Allison, Terry W. Campbell (Second Edition). **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry.** Wiley-Blackwell, A John Wiley & Sons, Inc. Published. USA. pp 40-50.

9.2. Influencia del sexo en los parámetros hematológicos de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1757) de hembras Stirling, machos Stirling y Supermachos

9.2.1. Resumen

Oreochromis niloticus es una de las principales especies explotadas comercialmente en México. En los últimos años, se ha ganado importancia para la acuicultura. El objetivo de la presente investigación fue estudiar los parámetros hematológicos de machos y hembras de *O. niloticus* para determinar si están influenciados por el sexo de los peces. Las muestras de sangre fueron recolectadas de 90 organismos (30 hembras, 30 machos y 30 supermachos). La sangre fue analizada utilizando técnicas estándar. El recuento de eritrocitos, hematocrito y hemoglobina fue mayor en los machos que en las hembras, pero sin diferencia significativa, el recuento diferencial de leucocitos mostró diferencias significativas entre los organismos machos y hembras, valores mayores para los machos.

Palabras clave: tilapia, células sanguíneas, sexo, actividad metabólica.

9.2.2. Abstract

Oreochromis niloticus is one of the main commercially exploited species in Mexico. In recent years, it has gained importance for aquaculture. The aim of this research was to study the hematological parameters of males and females of *O. niloticus* to determine whether they are influenced by the sex of fish. Blood samples were collected from 90 organisms (30 females, 30 males and 30 supermales). Blood was analyzed using standard techniques. Erythrocyte count, hematocrit and hemoglobin was higher in males than in females, but no significant difference, differential leukocyte count showed significant differences between male and female bodies, higher values for males.

Keywords: tilapia, blood cells, sex, metabolic activity.

9.2.3. Introducción

Los parámetros hematológicos de los peces varían en diferentes especies e individualmente. La variación individual se puede atribuir a la variación genética, el estado nutricional, el sexo, la edad, el estrés causado por la captura, manipulación y procedimientos de muestreo (Kefas *et al.*, 2015).

Estudios realizados en peces como la paragua, (*Chaetodipterus faber*), la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), la trucha marrón (*Salmo gairdneri*), el esturión estrellado (*Acipenser stellatus*), la carpa forrajera (*Ctenopharyngodon idella*), el betta (*Betta splendens*) mostraron que el sexo de los peces puede influir en los parámetros hematológicos (Bastardo y Díaz, 2004; Gabriel *et al.*, 2004; Motlagh *et al.*, 2012; Karimi *et al.*, 2013; Docan *et al.*, 2014; Ejraei *et al.*, 2015).

La tilapia nilótica *O. niloticus* es una especie importante en la acuicultura mundial, sin embargo, no existen estudios publicados sobre la influencia del sexo en sus parámetros hematológicos. Es por ello que la investigación se orientó a determinar cualquier variación en los parámetros hematológicos de hembras, machos y supermachos de *O. niloticus*, sometidos a las mismas condiciones de cultivo.

9.2.4. Materiales y Métodos

La presente investigación se realizó en la Unidad Acuícola del Laboratorio de Biología Acuática J. Javier Alvarado Díaz, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

9.2.4.1. Diseño experimental

Para este experimento se utilizó un sistema de recirculación que cuenta con seis estanques, tres de ellos con capacidad de 2.52 m³ y otros tres con capacidad de 5.85 m³ cada uno. En los estanques más pequeños se colocó una jaula de un metro de ancho por dos de largo y un metro de profundidad, en los estanques más grandes se colocaron dos jaulas por estanque, de las mismas dimensiones. En cada jaula se colocaron 10 organismos y en total se utilizaron 90 organismos,

repartidos en 30 organismos por tratamiento. Los organismos se mantuvieron en estas condiciones durante un mes. Todos los días se revisaron las variables físicas y químicas del agua con un multiparamétrico (YSI Modelo 6820V2, USA). La alimentación de los peces se realizó *ad libitum*, dos veces al día, con alimento comercial de la marca Nutripec, cabe destacar que el alimento suministrado era el recomendado para cada etapa por la que se encontraba la tilapia.

Organismos utilizados y Tratamientos

Los organismos que se utilizaron en la presente investigación fueron reproductores hembras y machos de tilapia de la Unidad Acuícola del Laboratorio de Biología Acuática J. Javier Alvarado Díaz, Facultad de Biología, (UMSNH).

Se elaboraron tres tratamientos, cada uno con tres replicas:

- Tratamiento “A” machos de tilapia nilótica *O. niloticus*, línea Stirling.
- Tratamiento “B” Supermachos de *O. niloticus*.
- Tratamiento “C” hembras de tilapia nilótica *O. niloticus*, línea Stirling.

Manipulación de los organismos y anestesia

La toma de muestras de sangre y la medición de las variables longitud total, longitud patrón y peso total, se llevó a cabo bajo anestesia para minimizar la influencia del estrés por manipulación durante el muestreo, así como para cumplir con normas éticas para la experimentación con seres vivos (Hrubec y Smith, 2010). Los peces fueron anestesiados por inmersión en un 10% (p/v) de benzocaína (solución de 4-aminobenzoato de etilo). La concentración de esta solución en agua fue de 1:10,000. Una vez extraída la sangre de los peces, estos se colocaron en recipiente de plástico con agua limpia y oxigenada para su pronta recuperación, y cuando estuvieron totalmente recuperados fueron asignados a otros estanques (Campos-Mendoza, 2004).

Procedimiento para la toma de muestra de sangre

La toma de muestras de sangre se realizó a través de punción de la vena caudal con jeringas estériles de insulina (1 mL) y agujas 23 G impregnadas con

heparina, el cual es un anticoagulante (4 mg/mL). De cada organismo se obtuvo 1 mL de sangre y en el lugar que se realizó la punción se le colocó azul de metileno con una torunda. Inmediatamente después del muestreo, la aguja se retiró de la jeringa, seguidamente, las muestras de sangre se depositaron en microtubos eppendorf que contenían heparina para 1 mL de sangre y se colocaron en hielo hasta que se completó el muestreo (Campos-Mendoza, 2004).

9.2.4.2. Trabajo de laboratorio

Los análisis de las muestras de sangre incluyeron:

Velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSE):

Un tubo de microhematocrito se llenó hasta una altura de 50 mm y se selló uno de los extremos colocándose en posición vertical por una hora a temperatura ambiente. Con papel milimétrico se determinó el descenso de los eritrocitos en la columna de sangre. El resultado se expresó como VSE en mm/hora (Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011).

Hemoglobina (Hb):

Para ésta prueba se utilizó el reactivo de Drabkin y se siguió el método de la cianometahemoglobina. Un tubo de ensayo se llenó con 1.5 mL del reactivo de Drabkin y con seis microlitros de sangre, se mezcló y se dejó reposar durante 10 minutos. Después la muestra se centrifugó durante 5 minutos y posteriormente se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 546 nm. El resultado de la concentración de hemoglobina se expresó en g/L (Valenzuela *et al.*, 2002; Correa-Negrete *et al.*, 2009; Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011).

Recuento de eritrocitos (RGR) y leucocitos (RGB):

Para la evaluación de este parámetro se utilizó la solución de Natt y Herricks, una pipeta hematológica de toma calibrada, la cámara de Neubauer y el microscopio.

Lo primero que se realizó fue tomar 5 microlitros de sangre con la pipeta de toma, después tomar de la solución de Natt y Herricks hasta llegar a una dilución

1:200 de sangre-solución. Posteriormente se mezcló durante un minuto y se depositó una gota en uno de los compartimientos de la cámara de Neubauer, extendiéndose por capilaridad entre la cámara y el cubreobjetos, se dejó reposar durante tres minutos y se observó en el microscopio (Conroy, 1998). El recuento de eritrocitos se realizó en el cuadro central de la cámara (solo se contaron cinco cuadros, los cuadros de las esquinas y el cuadro central). El recuento de los leucocitos se realizó en los cuatro cuadros grandes de la cámara (Buenaño, 2010; Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011). El número de eritrocitos se expresó en células por $10^{12}/L$ y el número de leucocitos se expresó en células por $10^9/L$ (Buenaño, 2010).

Hematocrito (Hcto):

Un tubo de microhematocrito se llenó con sangre hasta una altura de cinco centímetros. Para evitar burbujas de aire se selló uno de los extremos del tubo, se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos. La lectura se realizó utilizando una regla milimétrica, el resultado se expresó en L/L (Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011).

Volumen globular medio (VGM):

Para obtener este parámetro se realizó la siguiente formula (Buenaño, 2010; Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011):

$$VGM (fL) = \frac{Hcto (L/L) \times 1000}{RGR (células \times 10^{12}/L)}$$

Concentración globular media de hemoglobina (CGMH):

Para obtener este parámetro se realizó la siguiente formula (Buenaño, 2010):

$$CGMH (g/L) = \frac{Hb (g/L) \times 100}{Hcto (L/L)}$$

El análisis de la morfología leucocitaria y eritrocitaria se realizó con base a frotis sanguíneos delgados, secados en el aire, fijados en metanol y teñidos por la

técnica estándar de Diff-Quick (Conroy y Conroy, 2007). Los frotis fueron observados con lente de 100 x y aceite de inmersión. Cada campo se visualizó siguiendo un patrón estándar de zigzag, identificando diferentes tipos de glóbulos blancos y trombocitos hasta llegar a 200 células. Cada tipo de leucocito y trombocito se expresó en número de células por $10^9/L$ y se les tomaron fotos. Para cada organismo se observaron dos laminillas para obtener un promedio. Cada tipo de célula observada en el microscopio fue medida tanto en el ancho y largo del citoplasma como el del núcleo, usando el programa INFINITY ANALYZE (Buenaño, 2010).

9.2.4.3. Análisis de datos.

Los datos fueron analizados con la prueba de Shapiro-Wilk W, para ver si presentan una distribución normal. Posteriormente se utilizó el análisis de varianza (ANDEVA) para evaluar las diferencias entre los grupos usando el programa JMP, versión 6.0, con un nivel de significancia del 0.05. Los valores obtenidos de cada uno de los tratamientos se expresaron con la media \pm error estándar. Además se midió el diámetro del citoplasma y núcleo de cinco células de cada tipo identificado por organismo, para analizar si hay diferencias en el tamaño de las células, debido a, el sexo del organismo.

9.2.5. Resultados

Las muestras se obtuvieron a partir de 90 organismos reproductores de *O. niloticus*, 30 hembras, 30 machos de la línea Stirling y 30 Supermachos.

Los valores de los parámetros físicos y químicos del agua donde fueron cultivadas las tilapias se muestran en el cuadro 10.

Cuadro 10. Parámetros físicos y químicos del agua, promedio y error estándar.

PARÁMETRO	UNIDAD ACUÍCOLA DE MORELIA
Temperatura (°C)	28.68 \pm 0.0
Presión (mmHg)	608.92 \pm 0.04

Saturación de Oxígeno (%)	88.74 ± 0.53
Oxígeno disuelto (mg/L)	5.33 ± 0.01
Total de sólidos disueltos (TDS)	550.38 ± 0.86
NH₄⁺-N (mg/L)	0.68 ± 0.01
NH₃-N (mg/L)	0.19 ± 0.04
Conductividad (C-us/cm)	920.92 ± 4.68
pH	8.36 ± 0.01
Salinidad	0.41 ± 0.01

El peso y la longitud patrón presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0.0001$) y ($p = 0.0001$) respectivamente, los supermachos presentaron el mayor peso y longitud patrón, seguido por los machos Stirling (Figura 3).

Los valores hematológicos de las variables hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos, recuento de glóbulos blancos y CGMH fueron menores en las hembras que en los machos y supermachos, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en esos parámetros, a excepción del recuento de glóbulos blancos ($p = 0.684$, $p = 0.343$, $p = 0.4$, $p = 0.025$, $p = 0.649$ respectivamente) (Figura 4). El parámetro hematológico recuento de trombocitos inmaduros presentó diferencias significativas ($p = 0.015$) entre tratamientos, los supermachos presentaron el mayor recuento, seguido por los machos Stirling (Figura 4).

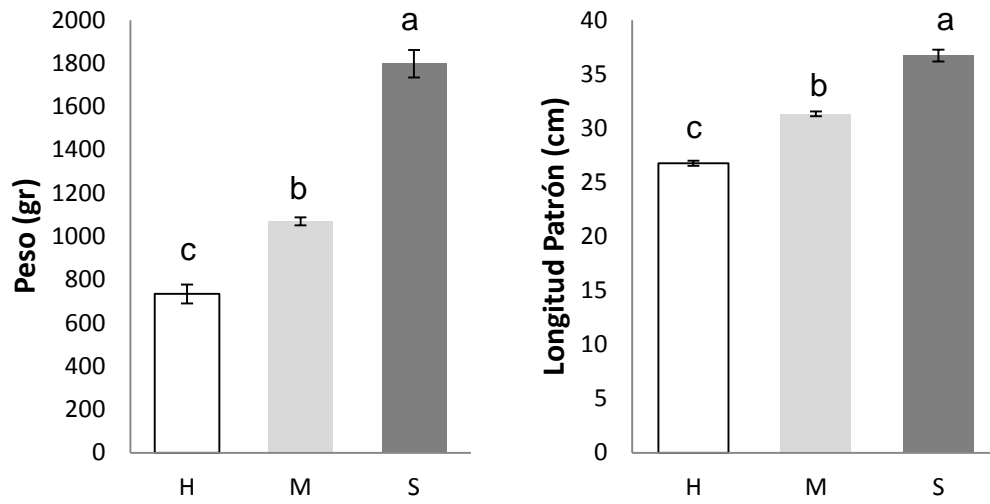


Figura 3. Peso y longitud patrón de los organismos de tres tratamientos: Hembras (H), Machos (M) y Supermachos (S). Letras diferentes indican diferencias significativas.

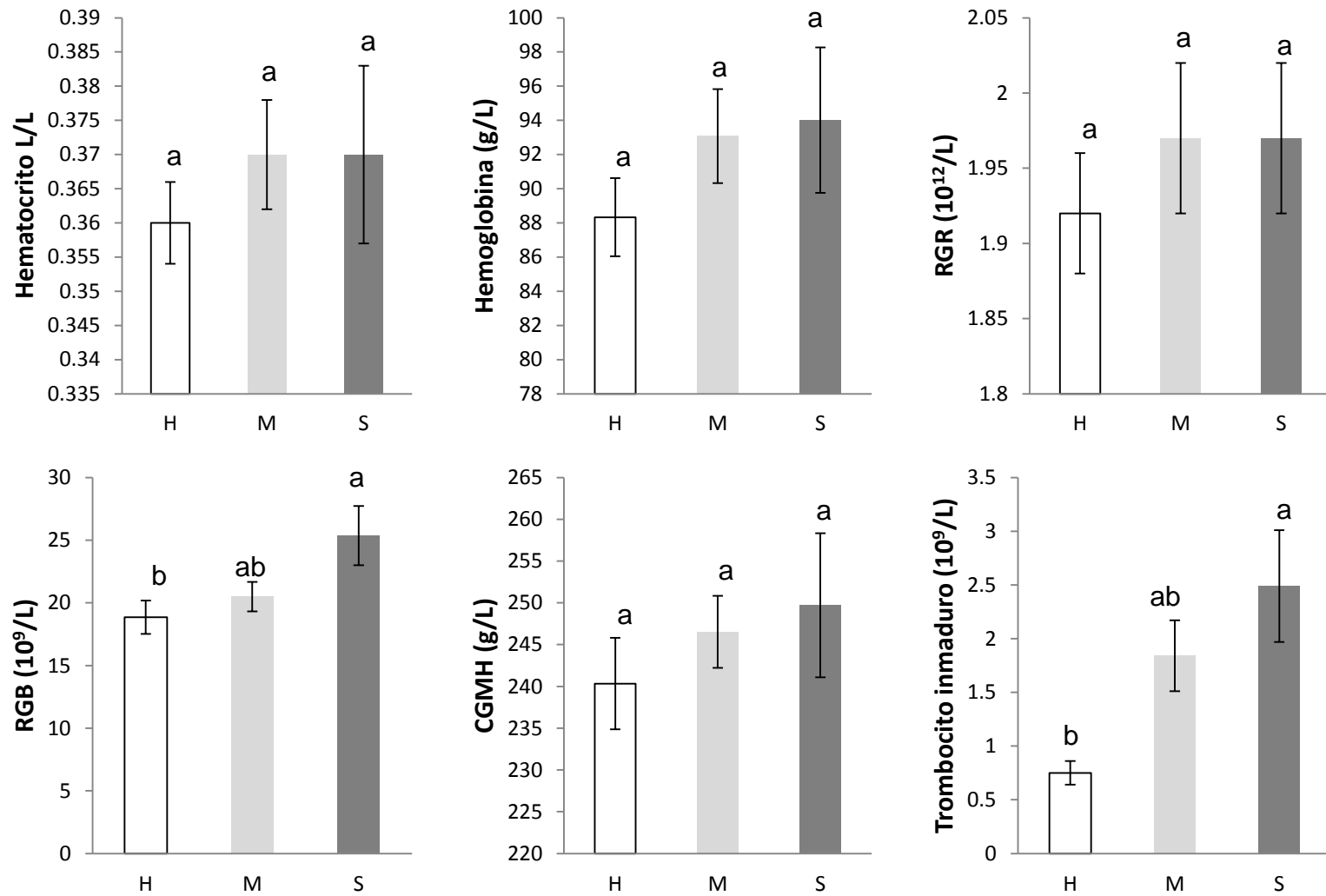


Figura 4. Parámetros hematológicos de tres tratamientos: Hembras (H), Machos (M) y Supermachos (S). Letras diferentes indican diferencias significativas.

Los análisis no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$), para los parámetros hematológicos VSE, VGM, recuento de neutrófilos mielocitos, neutrófilos metamielocitos, neutrófilos adultos, monocitos, linfocitos menores de 10 μm , linfocitos con pseudópodos, linfocitos mayores de 10 μm y trombocitos maduros (Anexo 1 y 2).

Tamaño de las células entre los diferentes tratamientos

El eritrocito maduro es diferente en cuanto a la medida ancho del citoplasma ($p = 0.037$), las hembras presentan un citoplasma más ancho que los supermachos (Figura 5). También se registraron diferencias en la célula trombocito maduro ($p = 0.013$), las hembras presentan un citoplasma más largo y por lo tanto un núcleo más largo que los supermachos, al contrario, los supermachos presentan un citoplasma más ancho y por lo tanto un núcleo más ancho que las hembras (Figura 5). No hay diferencias significativas ($p > 0.05$) en el tamaño de las células eritrocito inmaduro, linfocito mayor de 10 μm , neutrófilo metamielocito y neutrófilo adulto (Anexo 3).

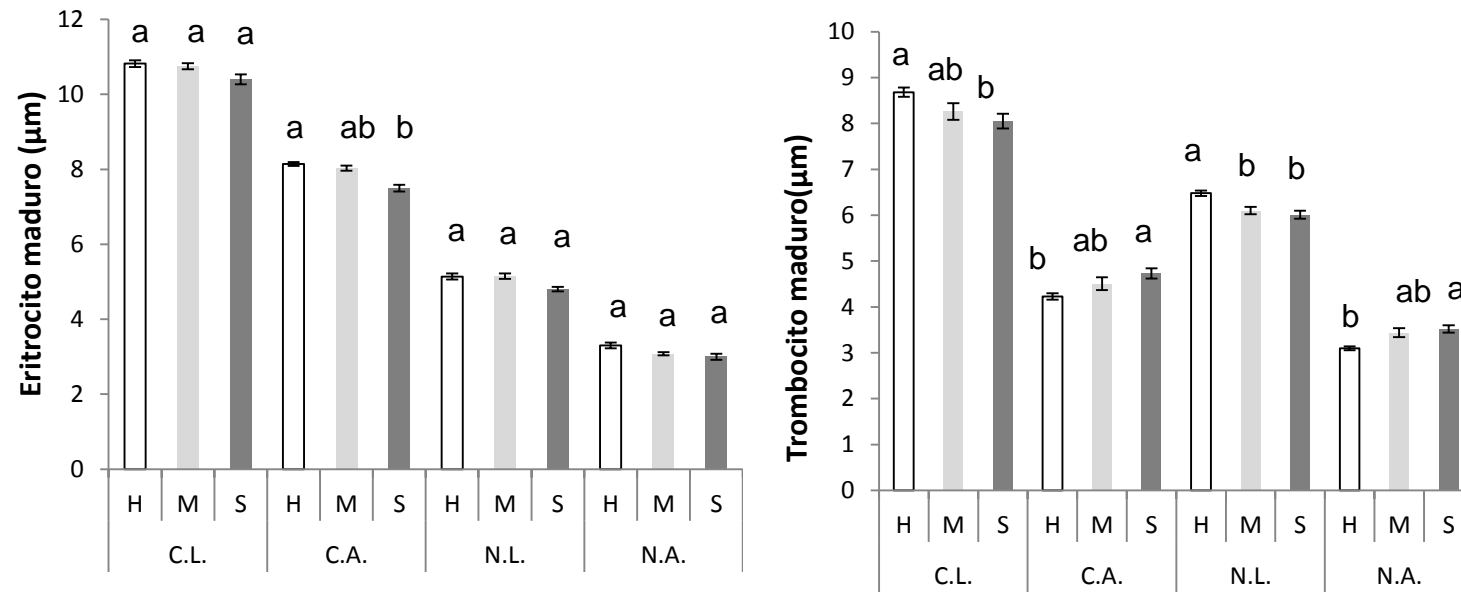


Figura 5. Tamaño de las células, medidas: citoplasma largo (C.L.), citoplasma ancho (C.A.), núcleo largo (N.L.) y núcleo ancho (N.A.), entre tratamientos: hembras (H), machos (M) y supermachos (S). Letras diferentes indican diferencias significativas.

9.2.6. Discusión

Los estudios previos no evidenciaron diferencias en los parámetros hematológicos debido al género de los organismos (Ezzat *et al.*, 1974; Bastardo *et al.*, 1992; Gabriel *et al.*, 2004; Correa-Negrete *et al.*, 2009; Gabriel *et al.*, 2011; Odedeyi, 2013; Ejraei *et al.*, 2015). Resultados similares encontramos en el presente estudio para la especie *O. niloticus*, no hay diferencias significativas en los parámetros hematológicos, RGR, hematocrito, hemoglobina, VGM, CGMH entre machos y hembras, sin embargo, estos parámetros fueron más elevados en los machos que en las hembras. Por el contrario, en estudios realizados en la paragua (*Chaetodipterus faber*), en la carpa (*Cyprinus carpio*), la dorada (*Acanthopagrus latus*) y el esturión estrellado (*Acipenser stellatus*) se encontraron diferencias significativas en los parámetros RGR, hematocrito y hemoglobina entre machos y hembras, siendo más altos estos valores en los machos (Bastardo y Díaz, 2004; Golemi *et al.*, 2013; Karimi *et al.*, 2013; Baghizadeh y Khara, 2015), lo cual indica que este aspecto no es una característica constante en los peces. En general los machos presentan una mayor actividad metabólica, lo que ocasiona que su consumo de oxígeno sea mayor al de las hembras, sobre todo en periodo de reproducción (Docan *et al.*, 2014). A mayor actividad del pez, los eritrocitos son más pequeños y numerosos haciendo más eficientes el intercambio de gases debido a la mayor relación de superficie/volumen (Bastardo y Díaz, 2004), estos resultados concuerdan con los del presente trabajo, de esta forma, los machos de la línea supermachos presentan un menor tamaño en sus eritrocitos a diferencia de los eritrocitos de las hembras. Los valores más altos de algunos índices hematológicos para los machos coparativamente con las hembras son causados por variación de la actividad de la eritropoyetina. Esto se debe a que la hormona sexual masculina (testosterona), estimula su producción, mientras que los estrógenos, que son las hormonas femeninas, tienen un efecto supresor (Raizada *et al.*, 1983).

En el estudio realizado en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se encontraron diferencias significativas entre sexos en el desarrollo ontogenético. Los valores de hemoglobina y hematocrito fueron mayores en organismos machos de los

tres estadios; juveniles, adultos y reproductores. Mientras que en el recuento de glóbulos rojos no encontraron diferencias significativas entre la interacción del estadio de madurez o sexo. Sin embargo si encontraron diferencias significativas en el recuento de glóbulos blancos, siendo las hembras en etapa juvenil las que poseen el mayor recuento de glóbulos blancos, seguido de los machos juveniles y en el último lugar los machos reproductores (Buenaño, 2010). Esta diferencia entre machos y hembras juveniles con machos y hembras reproductores es debido a los cambios fisiológicos a los que se encuentran sometidos los organismos reproductores, afectando negativamente al sistema de defensa por el incremento de corticoides y esteroides sexuales (Maule *et al.*, 1996 en Buenaño, 2010).

En un estudio realizado en la carpa común (*Cyprinus carpio*) se observaron diferencias significativas en el recuento de glóbulos blancos en machos y hembras, con un valor mayor en machos (Baghizadeh y Khara, 2015), esta observación es consistente con los resultados obtenidos en nuestra investigación. Por lo contrario, en el estudio realizado en el betta (*Betta splendens*), se encontraron que el recuento de glóbulos blancos y los linfocitos eran diferentes estadísticamente, más altos en hembras que en machos, pero los machos tenían significativamente más alto el recuento de neutrófilos (Motlagh *et al.*, 2012). En la especie *Schroederichthys chilensis* no encontraron diferencias significativas en el recuento de glóbulos blancos ni en el diferencial (Valenzuela *et al.*, 2003). Las diferencias en los recuentos de glóbulos blancos se podrían atribuir a factores bióticos como la edad, la madurez y los patógenos. Y a factores abióticos como la temperatura del agua, pH, contenido de oxígeno disuelto y en particular al estrés (Kefas *et al.*, 2015). En el estudio realizado en la especie *Schroederichthys chilensis* el no encontrar diferencias significativas en el recuento de glóbulos blancos ni en el diferencial entre machos y hembras, puede ser ocasionado por, la presencia del protozoo *Trypanosoma humboldti* en los organismos. La diferencia estadística en el recuento de glóbulos blancos entre hembras y machos para el presente estudio, puede deberse a, una respuesta diferente por parte de los machos al manejo en cautiverio; es decir, los machos fueron más sensibles que las hembras, esta respuesta diferente puede ser dada ya que los machos son más territoriales y agresivos (Correa-Negrete *et al.*,

2009). Esto puede ser inferido puesto que ambos se encontraban en el mismo ambiente, sometidos a situaciones iguales, sin embargo los machos revelaron la condición de un animal estresado.

Los basófilos y eosinófilos no fueron observados en la presente investigación, de la misma forma en las especies *Clarias gariepinus*, *Sorubim cuspicaudus* y *Acanthopagrus latus* (Gabriel *et al.*, 2004; Correa-Negrete *et al.*, 2009; Karimi *et al.*, 2012).

9.2.7. Conclusión

El índice hematológico de referencia determinado en el presente trabajo puede ser empleado en la evaluación de la especie *O. niloticus* indistintamente del sexo.

9.2.8. Literatura Citada

Baghizadeh E. and H. Khara. 2015. **Variability in hematology and plasma indices of common carp *Cyprinus carpio*, associated with age, sex and hormonal treatment.** Iranian Journal of Fisheries Sciences, 14(1): 99-111.

Bastardo Hilda R., Zaida J. Coché, Pedro J. Salinas e Isbelia Hernández. 1992. **Determinaciones hematológicas en trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, en Mérida, Venezuela.** Veterinaria Tropical, 17: 31-39.

Bastardo Asmine y Rosario Díaz. 2004. **Parámetros hematológicos de la paragua, *Chaetodipterus faber* (Broussonet) (Pices: Ehippidae), en condiciones de cultivo.** Zootecnia Trop., 22 (4):361-370.

Buenaño Martha V. 2010. **Hemograma de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en tres etapas de producción en la cuenca alta de la provincia del Napo, Ecuador.** Bol. Téc. 9, Ser. Zool., 6: 1-14.

Campos-Mendoza Antonio. 2004. **Regulatory Mechanisms Associated with Egg Production and Egg Activation in *Oreochromis niloticus*.** Tesis de Doctorado. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, Scotland U.K. 245 pp.

- Conroy, D. A. 1998. **Manual de métodos y técnicas de laboratorio de uso común en la hematología pisciaria**. Departamento de Biología, Microbiología y Bacteriología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Santa. Venezuela. 25p.
- Conroy D. y G. Conroy. 2007. **Atlas Básico de las Células Sanguíneas Normales y Anormales en Tilapias Cultivadas**. Patterson Peddie Consulting Ltd.
- Correa-Negrete J. C., A. A. Garrido-Correa, M. J. Prieto-Guevara, V. J. Atencio-García, S. C. Pardo-Carrasco. 2009. **Caracterización de células sanguíneas y parámetros hematológicos en blanquillo *Sorubim cuspicaudus***. Zootecnia Trop., 27 (4): 393-405.
- Docan A., L. Dediu, L. Grecu, V. Cristea and M. Maereanu. 2014. **Hematological profiles of mature *Acipenser stellatus* from Danube River during spring season**. Lucrări Științifice - Seria Zootehnie, (62).
- Ejraei F., M. Ghiasi and K. Hossein. 2015. **Evaluation of hematological and plasma indices in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, with reference to age, sex, and hormonal treatment**. Arch. Pol. Fish., 23: 163-170.
- Ezzat A. A., M . B. Shaban and A. M. Farghaly. 1974. **Studies on the blood characteristics of *Tilapia zifli* (Gervais) I. Blood cells**. J. Fish Bid., 6: 1-12.
- Gabriel U.U., G. N. O. Ezeri and O. O. Opabunmi. 2004. **Influence of sex, source, health status and acclimation on the haematology of *Clarias gariepinus* (Burch,1822)**. African Journal of Biotechnology, 3 (9): 463-467.
- Gabriel Ugwem U., Ojo A. Akinrotimi and Funkeye Eseimokumo. 2011. **Haematological Responses of Wild Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* after Acclimation to Captivity**. Jordan Journal of Biological Sciences, 4 (4):322-327.
- Golemi S., N. Medja and D. Lacej. 2013. **Influence of Sex on the Hematological and Morphometric Parameters of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) from**

Shkodra Lake. Academic Journal of Interdisciplinary Studies MCSER Publishing, 2 (8): 45-49.

Hahn-Von-Hessberg C. M., A. Grajales-Quintero y A. V. Gutiérrez-Jaramillo. 2011. **Parámetros hematológicos de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1757) con peso entre 250 g y 350 g, en el Centro Experimental Piscícola de la Universidad de Caldas.** Vet. Zootec., 5 (1): 47-61.

Hrubec T. C. and S. A. Smith. 2010. **Hematology of fishes.** En: Douglas J. W. y K. J. Wardrop (6° Edición). **Veterinary Hematology.** Editorial WILEY-BLACKWELL. USA. pp. 994-1003.

Karimi Sh., P. Kochinian and A. P. Salati. 2013. **The effect of sexuality on some haematological parameters of the yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus* in Persian Gulf.** Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University, 14 (1):65-68.

Kefas M., K. Abubakar and A. Ja'afaru. 2015. **Haematological indices of tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Lake Geriyo, Yola, Adamawa State, Nigeria.** International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 3(1): 09-14.

Motlagh S. P., A. M. Zarejabad, R. G. Nasrabadi and M. Molaee. 2012. **Haematology, morphology and blood cells characteristics of male and female Siamese fighting fish (*Betta splendens*).** Springer, Comparative Clinical Pathology, 21 (1): 15-21.

Odedeyi D. O. 2013. **Seasonal, sex and size variation in some blood parameters of snakehead fish (*Parachanna obscura*, Gunther 1861) in ose River, Southwest – Nigeria.** G.J.B.A.H.S., 2 (4): 107-110.

Raizada, M.N., K. K. Jain and S. Raizada. 1983. **Monthly variations in the hematocrit values (PCV) in a teleost, *Cirrhinus mrigala* (Ham.).** Journal of Comparative Physiology, 3: 196–198.

Valenzuela A., K. Alveal y E. Tarifeño. 2002. **Respuestas hematológicas de truchas (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) a estrés hipoxico agudo: serie roja.** Gayana, 66 (2): 255-261.

Valenzuela A., C. Oyarzún and V. Silva. 2003. **Blood cells of the *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): the leukocytes (Elasmobranchii, Scyliorhinidae).** Gayana 67, (1): 130-136.

9.3. Variaciones hematológicas en la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1757) provocadas por el efecto de un gradiente altitudinal de 0-2000 msnm

9.3.1. Resumen

La Tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* es el segundo pez de cultivo más importante en todo el mundo por su excelente rendimiento productivo y aceptación en el mercado. Poco se conoce acerca de la variación de los parámetros hematológicos a diferentes altitudes. El objetivo de esta investigación fue comparar los parámetros hematológicos de organismos cultivados de *O. niloticus* a través de un gradiente altitudinal (27, 553, 912 y 1920 msnm). Las muestras de sangre fueron recolectadas de 120 organismos (30 organismos por altitud). La sangre fue analizada utilizando técnicas estándar. Los resultados no mostraron diferencias significativas en el hematocrito, VGM y el recuento de glóbulos rojos entre organismos cultivados a diferentes altitudes. Hay diferencias en el recuento de glóbulos blancos, pero estas diferencias se atribuyen a las condiciones propias de cultivo de cada granja.

Palabras clave: tilapia, parámetros hematológicos, altitud, hipoxia.

9.3.2. Abstract

The Tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* is the second most important cultivated fish in the world, due its excellent production performance and market acceptance. Little is known about the variation of haematological parameters at different altitudes. The objective of this research was to compare the hematological parameters of *O. niloticus* cultivated through an altitudinal gradient (27, 553, 912 and 1920 msnm). Blood samples were collected from 120 organisms (30 organisms per altitude). Blood was analyzed using standard techniques. The results show no significant differences in hematocrit, VGM and red blood cell count between organisms grown at different altitudes. There are differences in white blood cell count, but these differences are attributed to the characteristics of each fish farm conditions.

Keywords: tilapia, hematological parameters, altitude, hypoxia.

9.3.3. Introducción

La presión parcial de oxígeno en la atmosfera disminuye exponencialmente a medida que aumenta la altura de la corteza terrestre, de modo que en alturas relativamente moderadas (aproximadamente 3.000 msnm) encontramos solamente 2/3 partes de oxígeno disponible a nivel del mar (Ruiz *et al.*, 1987). Muchos estudios sobre la adaptación a la hipoxia producida por una altitud elevada se han centrado en la sangre debido a su papel en el transporte de oxígeno (Weber, 2007; Zubieta-Calleja *et al.*, 2007; Storz y Moriyama, 2008; Crait *et al.*, 2012). La disminución de la presión parcial de oxígeno, asociada a una disminución de la presión barométrica, estimula la eritropoyesis, lo que ocasiona policitemia (Klever-Sáenz *et al.*, 2008).

Uno de los cambios más conocidos que presenta el hombre y otras especies como respuesta de aclimatación a la altura o de aclimatación a la hipoxia experimental es el aumento del número de eritrocitos y de los niveles de hemoglobina (Ruiz *et al.*, 1987; Storz, 2007; Shrivastava *et al.*, 2010; Al-Sweedan y Alhaj, 2012; Lu *et al.*, 2015).

Pero que pasa entonces con los organismos que dependen de un medio acuático como los peces, ¿también producirán más eritrocitos cuando se encuentran cultivados a altitudes cada vez más altas? Debido a estas interrogantes el presente trabajo tuvo la finalidad de comparar los parámetros hematológicos de organismos cultivados de *O. niloticus* a diferentes altitudes.

9.3.4. Materiales y Métodos

La presente investigación se realizó en tres granjas acuícolas del estado de Michoacán: la granja Jauja localizada en Lázaro Cardenas a una altitud de 27 msnm, la granja Las Parotas en Nuevo Urecho a una altitud de 553 msnm y la granja El Piojito en Pedernales a una altitud de 912 msnm y La Unidad Acuícola localizada en Morelia a una altitud de 1920 msnm.

9.3.4.1. Trabajo de campo

Calidad del agua

Durante los días de muestreo se midieron los parámetros físicos y químicos del agua con un multiparamétrico (YSI Modelo 6820V2, USA), tales como pH, temperatura, oxígeno disuelto, amonio, nitritos, salinidad y turbidez. Los parámetros físicos y químicos del agua se midieron entre las 10 y las 11 de la mañana, siempre a la misma hora en cada granja.

Organismos utilizados

Las muestras de sangre se obtuvieron a partir de 120 organismos adultos de *O. niloticus* revertidos sexualmente, 30 organismos por granja.

Manipulación de los organismos y anestesia

La toma de muestras de sangre y la medición de las variables longitud total, longitud patrón y peso total, se llevó a cabo bajo anestesia para minimizar la influencia del estrés por manipulación durante el muestreo, así como para cumplir con normas éticas para la experimentación con seres vivos (Hrubec y Smith, 2010). Los peces fueron anestesiados por inmersión en un 10 % (p/v) de benzocaína (solución de 4-aminobenzoato de etilo). La concentración de esta solución en agua fue de 1:10,000. Una vez extraída la sangre de los peces, estos se colocaron en recipiente de plástico con agua limpia y oxigenada para su pronta recuperación, y cuando estuvieron totalmente recuperados fueron asignados a otros estanques (Campos-Mendoza, 2004).

Procedimiento para la toma de muestra de sangre

La toma de muestras de sangre se realizó a través de punción de la vena caudal con jeringas estériles de insulina (1 mL) y agujas 23 G impregnadas con heparina, el cual es un anticoagulante (4-mg/mL). De cada organismo se obtuvo 1 mL de sangre y en el lugar que se realizó la punción se le colocó azul de metileno con una torunda. Inmediatamente después del muestreo, la aguja se retiró de la jeringa, seguidamente, las muestras de sangre se depositaron en microtubos

eppendorf que contenían heparina para 1 mL de sangre y se colocaron en hielo hasta que se completó el muestreo (Campos-Mendoza, 2004).

9.3.4.2. Trabajo de laboratorio

Los análisis de las muestras de sangre incluyeron:

Velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSE):

Un tubo de microhematocrito se llenó hasta una altura de 50 mm y se selló uno de los extremos colocándose en posición vertical por una hora a temperatura ambiente. Con papel milimétrico se determinó el descenso de los eritrocitos en la columna de sangre. El resultado se expresó como VSE en mm/hora (Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011).

Hemoglobina (Hb):

Para ésta prueba se utilizó el reactivo de Drabkin y se siguió el método de la cianometahemoglobina. Un tubo de ensayo se llenó con 1.5 mL del reactivo de Drabkin y con seis microlitros de sangre, se mezcló y se dejó reposar durante 10 minutos. Después la muestra se centrifugó durante 5 minutos y posteriormente se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 546 nm. El resultado de la concentración de hemoglobina se expresó en g/L (Valenzuela *et al.*, 2002; Correa-Negrete *et al.*, 2009; Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011).

Recuento de eritrocitos (RGR) y leucocitos (RGB):

Para la evaluación de este parámetro se utilizó la solución de Natt y Herricks, una pipeta hematológica de toma calibrada, la cámara de Neubauer y el microscopio.

Lo primero que se realizó fue tomar 5 microlitros de sangre con la pipeta de toma, después tomar de la solución de Natt y Herricks hasta llegar a una dilución 1:200 de sangre-solución. Posteriormente se mezcló durante un minuto y se depositó una gota en uno de los compartimientos de la cámara de Neubauer, extendiéndose por capilaridad entre la cámara y el cubreobjetos, se dejó reposar durante tres minutos y se observó en el microscopio (Conroy, 1998). El recuento de eritrocitos se realizó en el cuadro central de la cámara (solo se contaron cinco cuadros, los

cuadros de las esquinas y el cuadro central). El recuento de los leucocitos se realizó en los cuatro cuadros grandes de la cámara (Buenaño, 2010; Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011). El número de eritrocitos se expresó en células por $10^{12}/L$ y el número de leucocitos se expresó en células por $10^9/L$ (Buenaño, 2010).

Hematocrito (Hcto):

Un tubo de microhematocrito se llenó con sangre hasta una altura de cinco centímetros. Para evitar burbujas de aire se selló uno de los extremos del tubo, se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos. La lectura se realizó utilizando una regla milimétrica, el resultado se expresó en L/L (Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011).

Volumen globular medio (VGM):

Para obtener este parámetro se realizó la siguiente fórmula (Buenaño, 2010; Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011):

$$VGM (fL) = \frac{Hcto (L/L) \times 1000}{RGR (células \times 10^{12}/L)}$$

Concentración globular media de hemoglobina (CGMH):

Para obtener este parámetro se realizó la siguiente fórmula (Buenaño, 2010):

$$CGMH (g/L) = \frac{Hb (g/L) \times 100}{Hcto (L/L)}$$

El análisis de la morfología leucocitaria y eritrocitaria se realizó con base a frotis sanguíneos delgados, secados en el aire, fijados en metanol y teñidos por la técnica estándar de Diff-Quick (Conroy y Conroy, 2007). Los frotis fueron observados con lente de 100 x y aceite de inmersión. Cada campo se visualizó siguiendo un patrón estándar de zigzag, identificando diferentes tipos de glóbulos blancos y trombocitos hasta llegar a 200 células. Cada tipo de leucocito y trombocito se expresó en número de células por $10^9/L$ y se les tomaron fotos. Para cada organismo se observaron dos laminillas para obtener un promedio. Cada tipo de célula observada en el

microscopio fue medida tanto en el ancho y largo del citoplasma como el del núcleo, usando el programa INFINITY ANALYZE (Buenaño, 2010).

Comparación de los valores hematológicos de las diferentes granjas con los parámetros de referencia

Los parámetros hematológicos obtenidos de los organismos de las diferentes granjas se compararon con los parámetros hematológicos de referencia obtenidos en el punto 9.1.

9.3.4.3. Análisis de datos

Con el objetivo de detectar las correlaciones entre las variables analizadas de los parámetros físico-químicos del agua determinados y ordenarlos de acuerdo a las cuatro granjas, se realizó un dendograma y un Análisis de Componentes Principales (ACP) usando el programa JMP, versión 6.0.

Los datos fueron analizados con la prueba de Shapiro-Wilk W, para ver si presentaban una distribución normal. Posteriormente se utilizó el análisis de varianza (ANDEVA), con el objetivo de determinar si los parámetros hematológicos de las tilapias *O. niloticus* presentaron diferencias de acuerdo a los factores de variación como son sitio a cierta altitud, usando el programa JMP, versión 6.0., con un nivel de significancia del 0.05. Los valores obtenidos de cada parámetro hematológico se expresaron con la media \pm error estándar. Además se tomaron los intervalos de referencia del diámetro de cada célula, para ello se midieron cinco células de cada tipo identificado por cada organismo.

Para determinar si los parámetros hematológicos presentaban algún tipo de relación con los parámetros físico-químicos del agua determinados, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP), usando el programa JMP, versión 6.0.

9.3.5. Resultados

Con el ACP y el análisis de clúster de los parámetros físicos-químicos del agua determinados como variables se pudo observar que: la granja Las Parotas es

más parecida a la granja el Piojito y la más diferente entre ellas es la Unidad Acuícola de Morelia (Figura 6 y Cuadro 11).

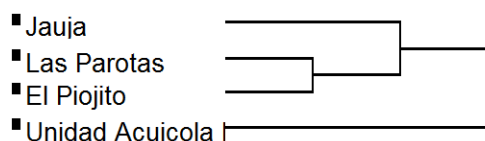


Figura 6. Análisis de clúster con los parámetros físicos y químicos del agua.

Cuadro 11. Parámetros físicos y químicos del agua de las diferentes granjas.

PARAMETRO	JAUJA	LAS PAROTAS	EL PIOJITO	UNIDAD ACUÍCOLA DE MORELIA
Temperatura (°C)	30.6	23.9	21	28.5
Presión (mmHg)	756.5	714.6	685.4	608.9
Saturación de Oxígeno (%)	34	77.6	52.8	89.9
Oxígeno disuelto (mg/L)	2.48	6.15	4.24	5.25
Total de sólidos disueltos (TDS)	409.5	170.95	194.35	468
NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	0.84	1.19	0.98	0.74
NH ₃ -N (mg/L)	0.05	0.02	0.01	0.18
Conductividad (C-us/cm)	713	257.3	276.4	764
pH	7.77	7.4	7.48	8.3
Salinidad	0.3	0.12	0.14	0.35

En la granja Jauja se encuentra la mayor temperatura, menor saturación de oxígeno y menor concentración de oxígeno disuelto. Los estanques de la granja Las Parotas presentaron la mayor cantidad de oxígeno disuelto, menor salinidad, mayor concentración del ion amonio y menor pH. Los estanques de la granja El Piojito presentan la menor temperatura, la mayor presión atmosférica y la menor

concentración de amoniaco. Los estanques que se encuentran en la Unidad Acuícola de Morelia presentan la mayor saturación de oxígeno, mayor conductividad, mayor cantidad de solidos disueltos en el agua, mayor salinidad y el mayor pH (Figura 7) (Figura 8 y Cuadro 12).



Figura 7. Granjas del estado de Michoacán: Jauja (a), Las Parotas (b), El Piojito (c) y La Unidad Acuícola de Morelia (d).

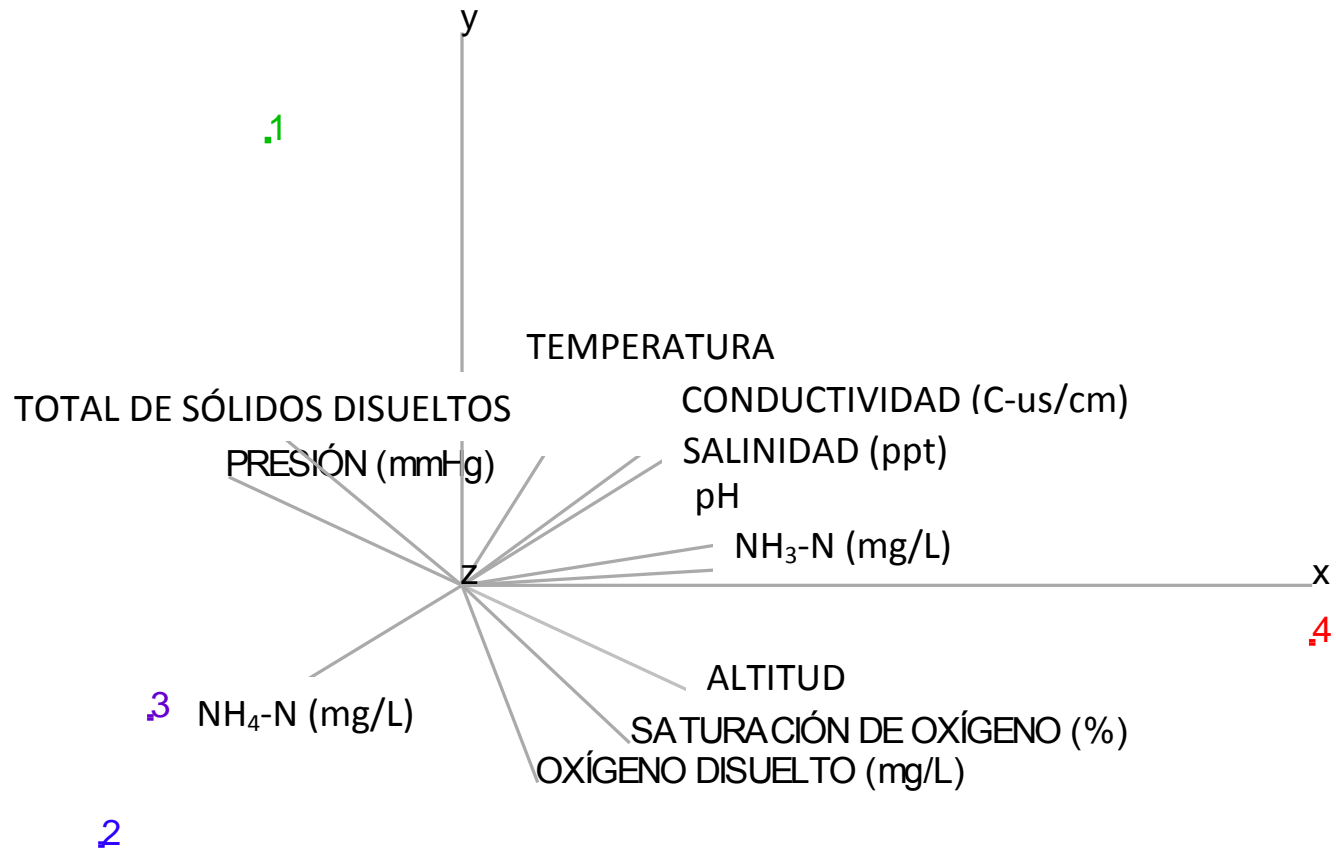


Figura 8. ACP con los parámetros físicos y químicos del agua, 1: granja Jauja, 2: granja Las Parotas, 3: granja El Piojito y 4: Unidad Acuícola de Morelia.

Cuadro 12. Eigenvectores, dirección e intensidad de efecto de los componentes principales (CP), dada por los primeros tres componentes principales (Eigenvalores).

	CP1	CP2	CP3
Altitud (msnm)	0.33941	-0.23592	-0.30026
Temperatura (°C)	0.16462	0.39815	0.51036
PRESIÓN (mmHg)	-0.33607	0.24039	0.31291
SATURACIÓN DE OXÍGENO (%)	0.24723	-0.35376	0.39001
OXÍGENO DISUELTO (mg/L)	0.11128	-0.43652	0.43513
CONDUCTIVIDAD (C-us/cm)	0.29197	0.33132	0.14031
TOTAL DE SÓLIDOS DISUELTOS (TDS) (mg/L)	-0.27434	0.35615	0.05171
SAL (ppt)	0.31894	0.2965	0.07354
NH ₄ ⁺ -N(mg/L)	-0.30439	-0.2778	0.40749
NH ₃ -N (mg/L)	0.4	0.03832	0.12729
pH	0.39543	0.09579	0.00278

El peso y longitud patrón de los organismos entre tratamientos ($p = 0.0001$) y ($p = 0.0001$) respectivamente, presentaron diferencias significativas. En la granja Las Parotas y Jauja se encontraron los organismos con mayor tamaño a diferencia de la granja El Piojito y La Unidad Acuícola de Morelia (Figura 9).

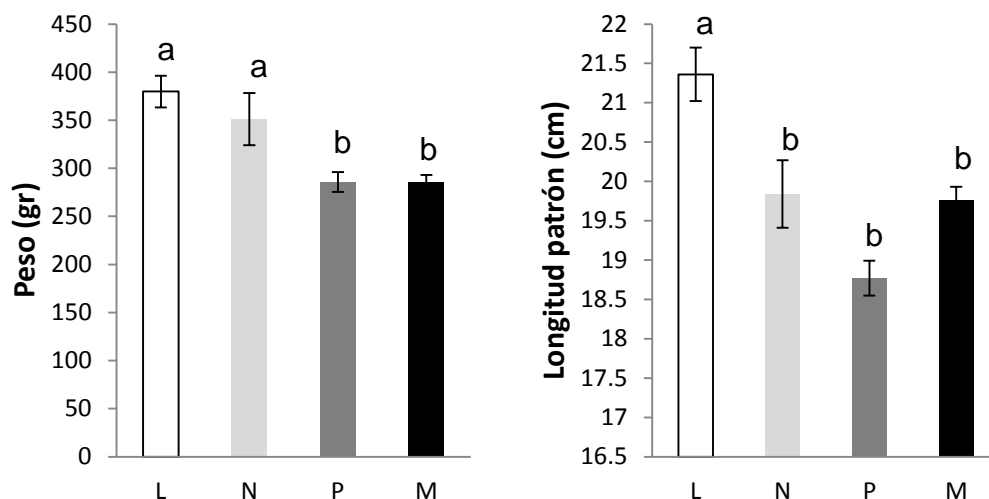


Figura 9. Peso y longitud patrón de los organismos de cuatro granjas: Jauja (L), Las Parotas (N), El Piojito (P) y Unidad Acuícola de Morelia (M). Letras diferentes indican diferencias significativas.

Los valores hematológicos indicaron una diferencia significativa en VSE ($p = 0.0001$), recuento de glóbulos blancos ($p = 0.0001$), policromatocitos ($p = 0.0001$), eritrocitos con núcleo segmentado ($p = 0.0001$), citoplasma abombado del eritrocito ($p = 0.0001$), hipocromía ($p = 0.0066$), poiquilocitos ($p = 0.0004$), neutrófilos metamielocitos ($p = 0.0004$), adultos ($p = 0.0037$), monocitos ($p = 0.0049$), linfocito menor de $10 \mu\text{m}$ ($p = 0.0002$), linfocito menor de $10 \mu\text{m}$ con seudópodos ($p = 0.0004$), trombocito maduro ($p = 0.0001$) y trombocito inmaduro ($p = 0.0001$) (Figuras 10 y 11).

Las tilapias a una altitud de 27 msnm tienen mayor velocidad de sedimentación eritrocitaria a diferencia de las otras altitudes. El recuento de glóbulos blancos es mayor en organismos con una altitud de 553 y 912 msnm a diferencia de las demás altitudes. Hay mayor número de policromatocitos en los organismos a una altitud de 1920 y 912 msnm, seguido por la altitud de 553 msnm y por ultimo a una altitud de 27 msnm. Los organismos que se encontraron a una altitud de 553 y 912 presentan el mayor número de eritrocitos con núcleos segmentados, seguido por los organismos de las altitudes de 1920 y 27 msnm. Se encontraron mayor número de linfocitos menor de $10 \mu\text{m}$ y linfocito menor de $10 \mu\text{m}$ con seudópodos a una altitud

de 553 msnm a diferencia de las otras altitudes. A altitudes más altas se encontraron en los organismos mayor número de monocitos. A una altitud de 1920 msnm se encontró el mayor número de trombocitos maduros a diferencia de las otras altitudes, por el contrario, a esta misma altitud se encontró el menor número de trombocitos inmaduros (Figuras 10 y 11).

Los organismos que se encuentran a una altitud de 553 msnm presentaron el mayor número de células con citoplasma abombado, el mayor número de poiquilocitos que son eritrocitos que presentan diferentes formas, igual que el mayor número de eritrocitos hipocrómicos, junto con los organismos que se encuentran a una altitud de 912 msnm (Anexo 4). A una altitud de 1920 msnm se encontraron organismos con mayor recuento de neutrófilos metamielocitos y adultos (Anexo 4).

No hay diferencias significativas ($p > 0.05$) en los parámetros hematológicos hematocrito, recuento de glóbulos rojos (Figura 10), velocidad globular media, neutrófilo mielocito, juvenil y linfocito mayor de $10 \mu\text{m}$ (Anexo 4).

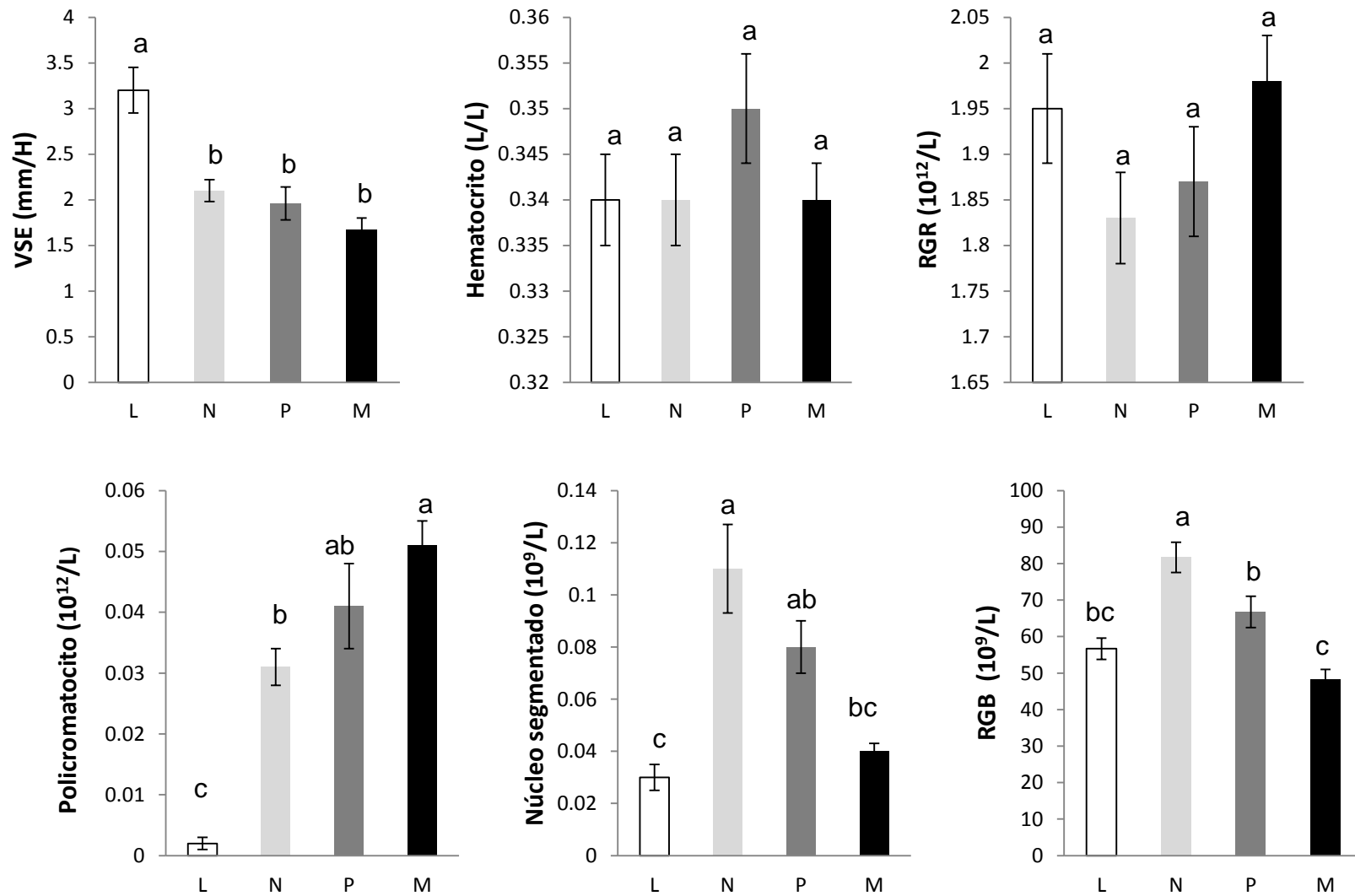


Figura 10. Parámetros hematológicos de cuatro granjas: Jauja (L), Las Parotas (N), El Piojito (P) y Unidad Acuícola de Morelia (M). Letras diferentes indican diferencias significativas.

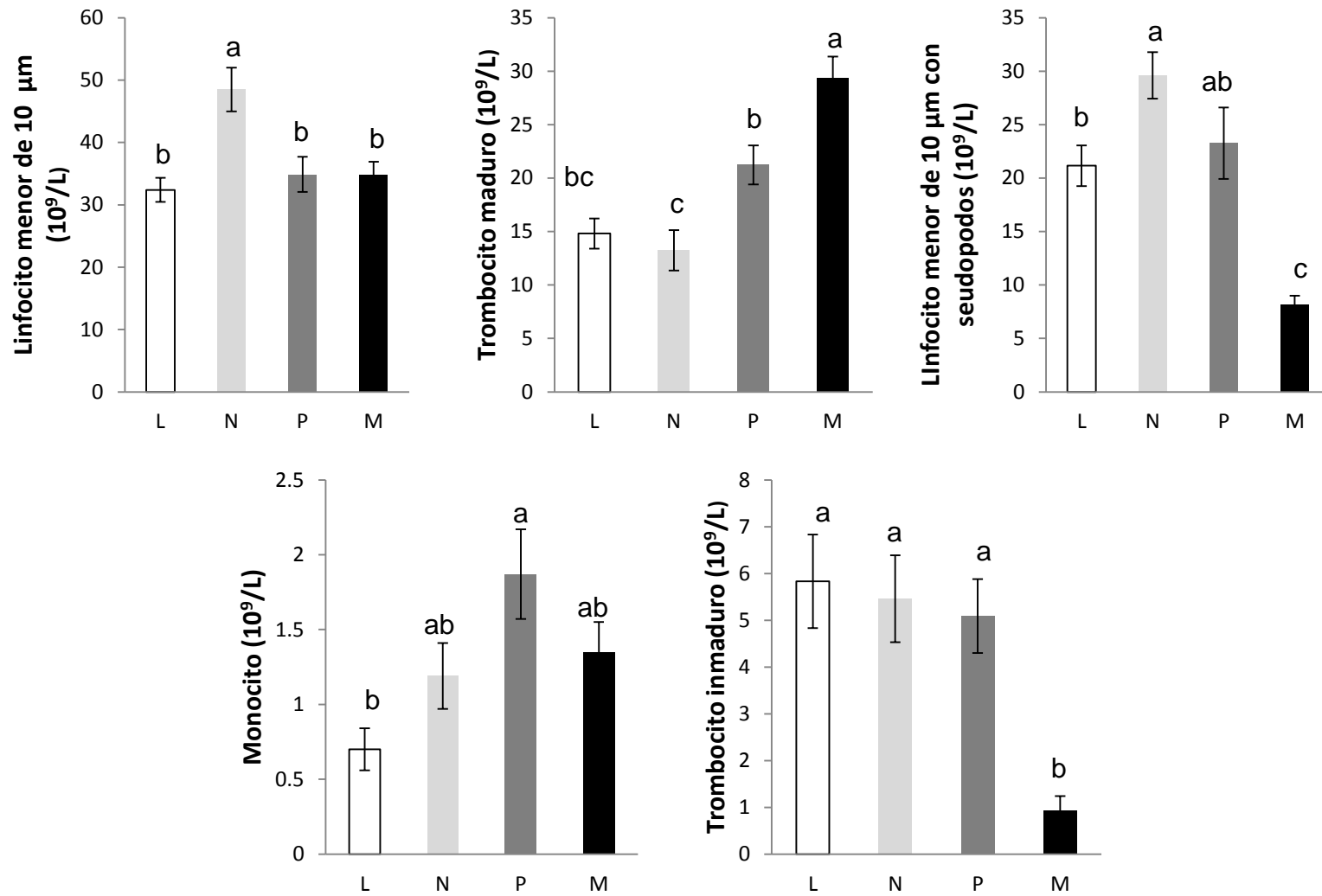


Figura 11. Parámetros hematológicos de cuatro granjas: Jauja (L), Las Parotas (N), El Piojito (P) y Unidad Acuícola de Morelia (M). Letras diferentes indican diferencias significativas.

Tamaño de las células entre los diferentes tratamientos

Hay diferencias significativas en el tamaño de las células entre los diferentes tratamientos ($p > 0.05$). Los eritrocitos maduros tienen mayor tamaño a altitudes de 912 y 553 msnm (Figura 12). Lo mismo pasa en los trombocitos maduros (Figura 13). A altitudes altas 1920 y 912 msnm se encuentran linfocitos menor de $10 \mu\text{m}$, neutrófilos mielocitos y monocitos más grandes (Figura 13). No hay diferencias significativas ($p > 0.05$) en el tamaño de los linfocitos mayores de $10 \mu\text{m}$, neutrófilos metamielocitos y juveniles (Anexo 5).

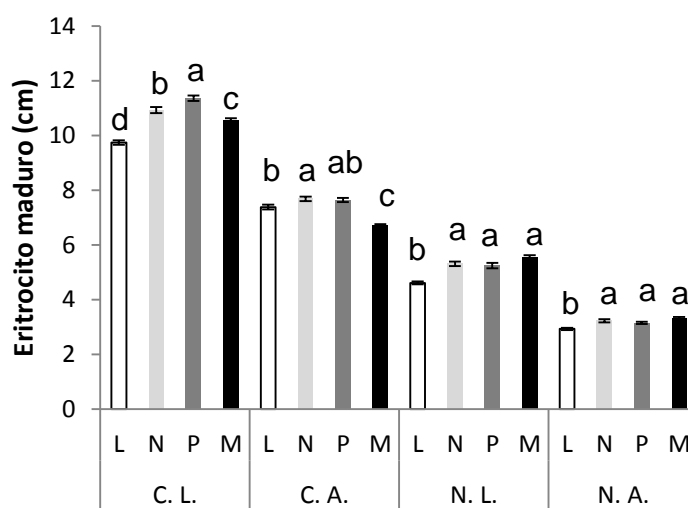


Figura 12. Tamaño de las células, medidas: citoplasma largo (C.L.), citoplasma ancho (C.A.), núcleo largo (N.L.) y núcleo ancho (N.A.), entre granjas: Jauja (L), Las Parotas (N), El Piojito (P) y Unidad Acuícola de Morelia (M). Letras diferentes indican diferencias significativas.

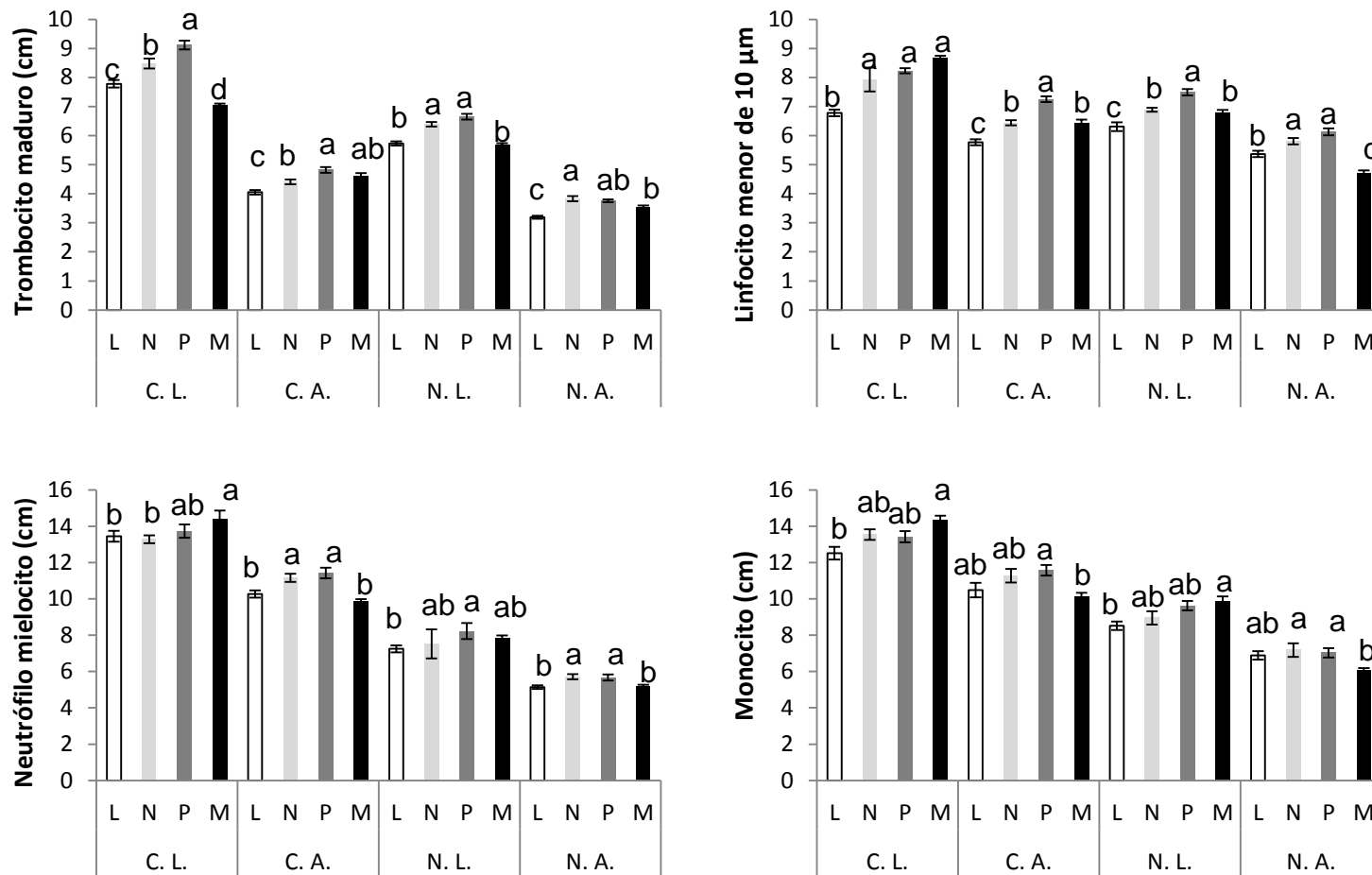


Figura 13. Tamaño de las células, medidas: citoplasma largo (C.L.), citoplasma ancho (C.A.), núcleo largo (N.L.) y núcleo ancho (N.A.), entre granjas: Jauja (L), Las Parotas (N), El Piojito (P) y Unidad Acuícola de Morelia (M). Letras diferentes indican diferencias significativas.

Con el Análisis de Componentes Principales se redujeron el número de variables, se tomaron en cuenta las que aportan más a la variación como: VSE, hematocrito, recuento de glóbulos rojos y blancos, policromatocitos, eritrocitos con núcleos divididos y segmentados, poiquilocitos, neutrófilos metamielocitos y trombocitos maduros (Figura 14) y (Cuadro 13). Las granjas se ordenaron en tres grupos, la granja El Piojito y Las Parotas conforman el primer grupo, el segundo grupo está formado por la Unidad Acuícola de Morelia y el tercer grupo por la granja Jauja. Hay variables clave para cada grupo. En el primer grupo encontramos la mayor concentración de NH_4^+ , saturación de oxígeno y oxígeno disuelto, pero la menor temperatura, para el segundo grupo tenemos la mayor concentración de pH y NH_3 , para el tercer grupo la mayor temperatura. Los organismos al ser cultivados en estas condiciones presentan parámetros hematológicos propios. El primer grupo tiene mayor recuento de eritrocitos con núcleo segmentado y dividido, además de linfocitos con seudópodos. El segundo grupo mayor recuento de trombocitos maduros y el tercer grupo mayor valor de velocidad de sedimentación eritrocitaria.

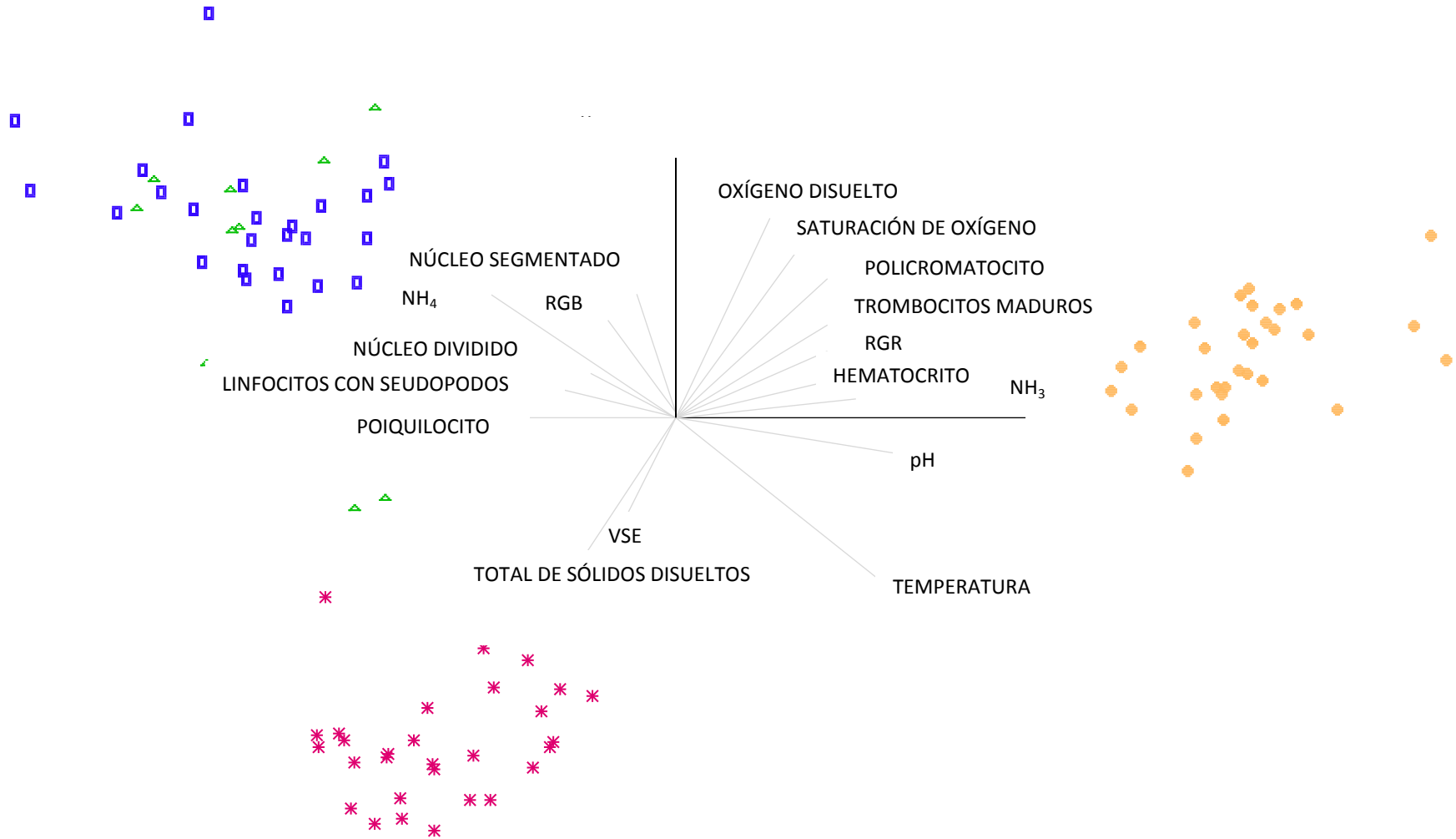


Figura 14. ACP con los parámetros físicos y químicos del agua y parámetros hematológicos. Rosa: granja Jauja, azul: granja Las Parotas, verde: granja El Piojito y amarillo: Unidad Acuícola de Morelia.

IVETTE MARAI VILLA VILLASEÑOR

Cuadro 13. Eigenvectores, dirección e intensidad de efecto de los componentes principales (CP), dada por los primeros tres componentes principales (Eigenvalores).

	CP1	CP2	CP3
TEMPERATURA (°C)	0.17937	-0.34446	0.09344
SATURACIÓN DE OXÍGENO (%)	0.24592	0.3621	-0.16566
OXÍGENO DISUELTO (mg/L)	0.10022	0.43492	-0.18731
TOTAL DE SÓLIDOS DISUELTOS (TDS) (mg/L)	-0.28595	-0.35363	0.14393
NH ₄ -N(mg/L)	-0.3354	0.25985	-0.09833
NH ₃ -N (mg/L)	0.41916	-0.01115	-0.02352
pH	0.41834	-0.06972	0.00413
VSE (mm/H)	-0.12967	-0.26504	-0.21163
HT (L/L)	0.02512	0.06982	0.51037
RGR TOTAL (1012/L)	0.08836	0.08288	0.5348
RGB (109/L)	-0.15083	0.2504	0.18522
POLICROMATOCITO	0.13626	0.26749	-0.10734
NU. SEGMENTADO	-0.14773	0.27776	0.08852
NU. DIVIDIDO	-0.11507	0.17617	0.13704
HIPOCROMÍA	-0.12489	0.12167	0.23182
POIQUILOCITO	-0.27002	0.01811	0.10323
N. METAMIELOCITO	0.16893	-0.02175	0.35248
LINFOCITO CON SEUDOPODOS	-0.28275	0.11311	0.03061
TROMBOCITO MADURO	0.23176	0.10334	0.21092

Comparación de los valores hematológicos de las diferentes granjas con los parámetros de referencia

En el cuadro 14 se puede observar los valores hematológicos que se encuentran fuera del intervalo de referencia de los parámetros hematológicos de la tilapia *O. niloticus* de las diferentes granjas.

Cuadro 14. Valores hematológicos de las diferentes granjas comparados con los parámetros hematológicos de referencia de la tilapia *O. niloticus*.

Parámetro hematológico	Valor en las diferentes granjas	Intervalo de Referencia	Término médico
VSE	3.20 granja Jauja	1.81 - 2.12	
Leucocitos	81.69 granja Las Parotas 66.75 granja El Piojito	44.50 - 50.84	Leucocitosis
Néutrofilos juveniles	0.13 granja Jauja	0.006 - 0.05	Neutrofilia
Monocitos	1.87 granja El Piojito	0.05 - 1.20	Monocitosis
Trombocitos maduros	13.24 granja Las Parotas 14.82 granja Jauja	26.48 - 30.77	Trombocitopenia

9.3.6. Discusión

Los estudios previos en bovinos Hosten, en humanos, en la nutria de río (*Lontra canadensis*) y un género de iguanios (*Phrynocephalus*) evidenciaron diferencias significativas en los parámetros hematológicos debido a la influencia de la altitud (Arango *et al.*, 1992; Al-Sweedan y Alhaj, 2012; Crait *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2015). Cuando los organismos se mantienen a grandes alturas, se produce en ellos la adaptación del organismo a la disminución del oxígeno ambiental, debido a que en las alturas, al disminuir la presión atmosférica total, se presenta una disminución en la presión parcial del oxígeno disponible en el medio. Exigiendo al organismo una serie de ajustes, expresados inicialmente en un aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria. Además se registra en el organismo una mayor actividad del sistema hematológico, una elevación de la hemoglobina sanguínea y por ende, un aumento

en el número de glóbulos rojos y hematocrito (Arango *et al.*, 1992). Lo que no concuerda con los resultados del presente estudio, ya que no se encontraron diferencias significativas en las variables hematocrito y recuento de glóbulos rojos a diferentes altitudes. Resultados similares a los nuestros se observarán en la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) a diferentes altitudes (Burton, 1969). La diferencia en encontrar aumentos en las variables hemoglobina y recuento de glóbulos rojos en mamíferos y reptiles a altitudes altas a diferencia de los peces, radica en que, ellos respiran aire y mantienen un metabolismo oxidativo basal que requiere un suministro continuo de oxígeno, mientras los peces no tienen esta necesidad específica de oxígeno y algunas especies pueden extraer suficiente oxígeno de un ambiente acuoso (Burton, 1969).

La disminución de la presión parcial de oxígeno implica varios efectos en la homeostasis de los individuos, como la generación de una hipoxia como efecto principal y la distensión de los gases como efecto secundario. La hipoxia, es en último término, una disminución del abastecimiento de oxígeno a nivel celular, que altera el metabolismo y la producción de energía en los organismos (Brito-Richards, 2007). En un estudio realizado en la tilapia nilótica (*O. niloticus*), la cual fue sometida a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto (3 mg/L y 5.5 mg/L) no se observaron diferencias significativas en los parámetros hematológicos hematocrito, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina, VGM y CGMH entre los organismos sometidos a una concentración de oxígeno de 3 mg/L y los organismos sometidos a una concentración de oxígeno de 5.5 mg/L (Tran-Duy *et al.*, 2008). Resultados diferentes se muestran en el estudio realizado en el pez perca atruchada (*Micropterus salmoides*), cuando fue sometido a diferentes concentraciones de oxígeno (2 mg/L, 3 mg/L y 8 mg/L) lo que provocó diferencias significativas entre organismos expuestos a altas concentraciones de oxígeno y bajas concentraciones de oxígeno, los organismos sometidos a bajas concentraciones de oxígeno presentaron mayor hemoglobina y hematocrito (Gaulke *et al.*, 2014). Resultados similares se observaron en el estudio realizado en el pez lenguado (*Solea senegalensis*), el cual fue sometido a diferentes saturaciones de oxígeno (80 %, 100 % y 150 %) se encontraron diferencias significativas en el recuento de glóbulos rojos

y hematocrito, más elevados en los organismos sometidos a una saturación de oxígeno de 80 % a diferencia de organismos sometidos a una saturación de oxígeno del 100 % (Taveira-Malheiro, 2015). Las diferencias entre los diversos estudios de peces sometidos a hipoxia, podrían deberse a la exposición de corta duración de los peces a bajos niveles de oxígeno disuelto, ya que, en el estudio realizado en *O. niloticus* los peces fueron expuestos a esas concentraciones de oxígeno durante 25 días, mientras que, en el estudio realizado en *M. salmoides*, los peces fueron expuestos durante 50 días. También va depender de la especie, que tan resistente es a las bajas concentraciones de oxígeno.

El tamaño de los eritrocitos de los organismos de las diferentes granjas es diferente significativamente, los organismos de la granja Jauja presentaron eritrocitos más pequeños, tanto en el ancho y largo del citoplasma a diferencia de los organismos de las granjas Las Parotas y El Piojito. Esta diferencia podría deberse a que los organismos muestreados en la granja Jauja se encontraban en condiciones de oxígeno disuelto en el agua por debajo del óptimo para el cultivo. Los eritrocitos de menor tamaño, con un número más elevado y mayor concentración de hemoglobina hacen más eficiente el intercambio de gases debido a la mayor relación de superficie/volumen. Además el menor tamaño eritrocitario permite mantener una baja viscosidad sanguínea y mayor perfusión capilar a los tejidos (Bastardo y Díaz, 2004).

Las diferencias encontradas en el presente estudio en la variable núcleo segmentado, tienen que ver con las condiciones propias del cultivo. Según Clauss *et al.* (2008) los núcleos anormales de eritrocitos (es decir, amitosis, la segmentación y la fragmentación), pueden referirse a trastornos nutricionales, tales como la deficiencia de ácido fólico o vitamina E, lo que podía explicar el aumento de eritrocitos con núcleo segmentado en la granja Las Parotas a una altitud de 553 msnm.

En el presente estudio se encontraron diferencias significativas en el recuento de glóbulos blancos, linfocitos, monocitos y VSE entre los organismos de las diferentes granjas. Resultados diferentes se observaron en el estudio realizado en el

pez lenguado (*Solea senegalensis*), el cual fue sometido a diferentes saturaciones de oxígeno (80 %, 100 % y 150 %) no se encontraron diferencias significativas en el recuento de glóbulos blancos (Taveira-Malheiro, 2015). Por lo que las diferencias significativas atribuidas a los organismos de las diferentes granjas tienen que ver con las condiciones propias del cultivo. Las diferencias en los recuentos de glóbulos blancos se podrían atribuir a factores bióticos como la edad, la madurez y los patógenos. Y a factores abióticos como la temperatura del agua, pH, contenido de oxígeno disuelto y en particular al estrés (Kefas *et al.*, 2015). Los peces también demuestran una respuesta inflamatoria típica que consiste en una neutrofilia y linfocitosis (Hrubec y Smith, 2010), lo que explica el aumento en el recuento de glóbulos blancos y por lo tanto el aumento de linfocitos en la granja Las Parotas.

9.3.7. Conclusión

Diferencias en la altitud (0-2000 msnm) no provoca cambios en los parámetros hematológicos de la tilapia nilótica *O. niloticus*, lo que se ve reflejado en no encontrar diferencias significativas en el recuento de glóbulos rojos, hematocrito y VGM en los organismos de las diferentes granjas.

9.3.8. Literatura Citada

Al-Sweedan S. A. and M. Alhaj. 2012. **The effect of low altitude on blood count parameters. Hematol Oncol Stem Cell Ther**, 5 (3): 158-161.

Arango Nora Cecilia, Ramón Oquen-Dólope y Gloria Lucía-Agudelo. 1992. **Influencia de la altitud en parámetros fisiológicos generales y hemáticos de bovinos holstein**. Rev. Fac. Nal. Agr. Medejlln., 45 (2): 51-60.

Bastardo Asmine y Rosario Díaz. 2004. **Parámetros hematológicos de la paragua, *Chaetodipterus faber* (Broussonet) (Pices: Ehippidae), en condiciones de cultivo**. Zootecnia Trop., 22 (4):361-370.

Brito-Richards Julio. 2007. **Hipoxia Hipobárica Intermitente Crónica en Gran Altura: Construcción de la Historia Natural de una Nueva Situación Epidemiológica y Biológica**. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina,

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad Autónoma de Madrid, España. 169 pp.

Buenaño Martha V. 2010. **Hemograma de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en tres etapas de producción en la cuenca alta de la provincia del Napo, Ecuador.** *Bol. Téc. 9, Ser. Zool.*, 6: 1-14.

Buenaño Martha V. 2010. **Hemograma de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en tres etapas de producción en la cuenca alta de la provincia del Napo, Ecuador.** *Bol. Téc. 9, Ser. Zool.*, 6: 1-14.

Burton R. R. 1969. **Comparative hematology of high-altitude poikilotherms (fish) and homeotherms (chickens).** In: Natural History of the White-Inyo Range, Eastern California and Western Nevada and High Altitude Physiology, edited by Hall CA, Jr. And Young DJ. Bishop: White Mountain Research Station: 193-202.

Campos-Mendoza Antonio. 2004. **Regulatory Mechanisms Associated with Egg Production and Egg Activation in *Oreochromis niloticus*.** Tesis de Doctorado. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, Scotland U.K. 245 pp.

Clauss Tonya M., D. Alistair, M. Dove and Jill E. Arnold. 2008. **Hematologic disorders of fish.** *Vet Clin Exot Anim.*, 11: 445-462.

Conroy, D. A. 1998. **Manual de métodos y técnicas de laboratorio de uso común en la hematología pisciaria.** Departamento de Biología, Microbiología y Bacteriología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Santa. Venezuela. 25p.

Conroy D. y G. Conroy. 2007. **Atlas Básico de las Células Sanguíneas Normales y Anormales en Tilapias Cultivadas.** Patterson Peddie Consulting Ltd.

Correa-Negrete J. C., A. A. Garrido-Correa, M. J. Prieto-Guevara, V. J. Atencio-García y S. C. Pardo-Carrasco. 2009. **Caracterización de células sanguíneas y parámetros hematológicos en blanquillo *Sorubim cuspicaudus*.** *Zootecnia Trop.*, 27 (4): 393-405.

- Crait Jamie R., Henry D. Prange, Noah A. Marshall, Henry J. Harlow y Clark Cotton. 2012. **High altitude diving in river otters: coping with combined hypoxic stresses**. Journal of Experimental Biology, 215 (2): 256-263.
- Gaulke Greg L., Clark E. Dennis III, David H. Wahl and Cory D. Suski. 2014. **Acclimation to a low oxygen environment alters the hematology of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)**. Fish Physiol Biochem, 40: 129–140.
- Hahn-Von-Hessberg C. M., A. Grajales-Quintero y A. V. Gutiérrez-Jaramillo. 2011. **Parámetros hematológicos de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1757) con peso entre 250 g y 350 g, en el Centro Experimental Piscícola de la Universidad de Caldas**. Vet. Zootec., 5 (1): 47-61.
- Hrubec T. C. and S. A. Smith. 2010. **Hematology of fishes**. En: Douglas J. W. y K. J. Wardrop (6° Edición). **Veterinary Hematology**. Editorial WILEY-BLACKWELL. USA. pp. 994-1003.
- Klever-Sáenz Flor, Luis Narváez G y Marcelo Cruz. 2008. **Valores de referencia hematológicos en población altoandina ecuatoriana**. Rev Mex Patol Clin 55 (4): 207-215.
- Lu Songsong, Ying Xin, Xiaolong Tang, Feng Yue, Huihui Wang, Yucheng Bai, Yonggang Niu y Qiang Chen. 2015. **Differences in Hematological Traits between High and Low Altitude Lizards (Genus Phrynocephalus)**. PLoS ONE, 10 (5): 1-16.
- Ruiz Gricelda, Mario Rosenmann y Alberto Veloso. 1987. **Valores hematológicos y distribución altitudinal de anfibios chilenos**. Arch. Biol. Med. Exp. 20: 79-84.
- Shrivastava A., A. Goyal y K. S. Negi. 2010. **Effect of high altitude on haematological parameters**. Indian J. Prev. Soc. Med., 41 (1): 15-20.
- Storz Jay F. 2007. **Hemoglobin function and physiological adaptation to hypoxia in high-altitude mammals**. Journal of Mammalogy, 88 (1): 24–31.

- Storz Jay F. y Hideaki Moriyama. 2008. **Mechanisms of Hemoglobin Adaptation to High Altitude Hypoxia**. High Altitude Medicine & Biology, 9 (2): 148-157.
- Taveira-Malheiro Diogo Brazão. 2015. **Effects of oxygen availability on hematological parameters, immune status, gill histomorphology and gene expression of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): the role of acute hyperoxia**. Tesis de Maestro en Ciencias. Instituto de Ciencias Biomedicas Abel Salazar, Universidad de Porto. 51 pp.
- Tran-Duy An, Johan W. Schrama, Anne A. Van-Dam, Johan A. J. Verreth. 2008. **Effects of oxygen concentration and body weight on maximum feed intake, growth and hematological parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus***. Aquaculture, 275: 152–162.
- Valenzuela A., K. Alveal y E. Tarifeño. 2002. **Respuestas hematológicas de truchas (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) a estrés hipoxico agudo: serie roja**. Gayana, 66 (2): 255-261.
- Weber R. E. 2007. **High altitude adaptations in vertebrate hemoglobins**. Respiratory Physiology and Neurobiology, 158: 132–142.
- Zubieta-Calleja G. R., P. E. Paulev, L. Zubieta-Calleja y G. Zubieta-Castillo. 2007. **Altitude adaptation through hematocrit changes**. Journal of Physiology and Pharmacology, 58 (5): 811-818.

CAPITULO II

VARIACIONES EN

LOS PARÁMETROS

HEMATOLÓGICOS

PROVOCADAS

POR ESTRESORES

10. CAPITULO II

10.1. Variación en los parámetros hematológicos de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1757) provocadas por un estresor ambiental: disminución de la temperatura del agua de 28 a 22 °C.

10.1.1. Resumen

La tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* es un pez importante para la acuicultura, debido a esto, es necesario tener índices que nos permitan conocer el estado de salud de los organismos con el fin de asegurar supervivencia y mejorar el rendimiento en los cultivos de peces. El objetivo de la presente investigación fue determinar las variaciones hematológicas en la tilapia *O. niloticus* provocadas por un estresor ambiental: disminución de la temperatura del agua de 28 a 22 °C en una hora. Las muestras de sangre fueron recolectadas de 90 organismos (30 organismos por tratamiento), se realizaron tres tratamientos: tratamiento A) organismos control, tratamiento B) toma de muestra de sangre de los organismos inmediatamente después de aplicar el estresor, tratamiento C) toma de muestra de sangre de los organismos una hora después de aplicar el estresor. La sangre fue analizada utilizando técnicas estándar. En el tratamiento C se encontraron diferencias significativas en el hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos, policromatocitos en comparación con el tratamiento A (grupo control), estos valores fueron más elevados en el tratamiento C, también se observaron diferencias significativas en el recuento de glóbulos blancos, siendo menor en el tratamiento C a diferencia del tratamiento A.

Palabras clave: tilapia, parámetros hematológicos, estrés, temperatura.

10.1.2. Abstract

The Nile tilapia *Oreochromis niloticus* is an important aquaculture fish, because of this, it is necessary to have indexes that allow us to know the state of health of organisms in order to ensure survival and improve performance in fish farms. The

objective of this research was to determine variations in the hematological tilapia *O. niloticus* caused by an environmental stressor. The fishes was stressed by a drastic decrease of water temperature from 28 to 22 °C in a hour. Blood samples were collected from 90 organisms (30 organisms per treatment). Three treatments were conducted: A) control treatment, B) taking blood sample immediately after the stressor, C) sampling blood an hour after the stressor. Treatment C shows significative diferences in hematocrit, hemoglobin, red blood cell count, and policromatocitos compared to treatment A (control group). These values were higher in the treatment C, also significant differences in the count of white blood cells were found, being lower in the treatment C than in the treatment A.

Keywords: tilapia, hematological parameters, stress, temperature.

10.1.3. Introducción

El estrés es una reacción de respuesta de los peces a un estímulo y esta puede alterar el estado homeostático de los peces (Pickering, 1998). Las respuestas al estrés pueden ser primarias, secundarias o terciarias y pueden ser utilizadas como indicador de cualquier alteración homeostática de los peces. Las respuestas primarias son mediadas por el sistema neuro-endocrino e incluyen la liberación rápida de las hormonas del estrés: adrenalina, noradrenalina y cortisol. Las respuestas secundarias incluyen ajustes bioquímicos y fisiológicos y son mediadas, hasta cierto punto, por las hormonas liberadas durante la respuesta primaria. Entre estas respuestas están los efectos metabólicos, como alteración de la glicemia, el ácido láctico y el glucógeno hepático y muscular. Los efectos hematológicos que muestran afectaciones durante esta etapa son principalmente la concentración de hemoglobina, el tamaño de los eritrocitos y la alteración en el recuento de células rojas y blancas. Por último ocurren efectos electrolíticos, tales como la alteración de los niveles de cloro, sodio y potasio en la concentración plasmática (Barton *et al.*, 2002; Fast *et al.*, 2008; Corredor y Landines, 2009).

Las respuestas terciarias tienen que ver con en el crecimiento, condición y estado de salud general de los organismos, los cuales se ven reflejados en diversos

índices, como el factor de condición (k) y la relación longitud- peso. Estos índices tienden a ser relativamente insensibles a corto plazo (estrés agudo), sin embargo, pueden contribuir a la comprensión de las tendencias a largo plazo de las poblaciones de peces expuestos a factores de estrés provocados por estresores ambientales crónicos (Adams *et al.*, 1993).

Los cambios en las condiciones ambientales pueden provocar estrés en los peces. Los cambios rápidos de temperatura son algunos de los factores de estrés con un alto impacto fisiológico en los peces. Estos tienen efectos inmediatos en los peces debido a la alta tasa de intercambio de calor entre el animal y el agua (Tanck *et al.*, 2000), como se puede observar en los trabajos realizados en las especies *Oncorhynchus mykiss*, *Shizothorax richardsonii*, *Scophthalmus maximus* y *Epinephelus akaara* (Docan *et al.*, 2013; Tyagi *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2015; Cho *et al.*, 2015). Por lo que el objetivo de la presente investigación fue determinar las variaciones hematológicas en la tilapia *Oreochromis niloticus* provocadas por un estresor ambiental: disminución de la temperatura del agua de 28 a 22 °C.

10.1.4. Materiales y Métodos

La presente investigación se realizó en la Unidad Acuícola del Laboratorio de Biología Acuática J. Javier Alvarado Díaz, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

10.1.4.1. Diseño experimental

Organismos utilizados y Tratamientos

En la presente investigación se utilizaron 500 crías de la tilapia *O. niloticus*, línea GIFT, con un peso promedio de 0.5 gramos, procedentes de la granja acuícola Tecnopez. Los organismos fueron cultivados en la Unidad Acuícola del laboratorio de Biología Acuática, durante cinco meses en condiciones óptimas para el cultivo de tilapia, según lo propuesto en la Carta Nacional Acuícola (Cuadro 5).

Después de este periodo, seleccionamos un total de 90 tilapias adultas con peso promedio \pm error estándar de 250.2 ± 4.6 y con una longitud patrón promedio

de 18.9 ± 0.1 . Los peces se colocaron en un sistema de recirculación que cuenta con seis estanques, tres de ellos con capacidad de 2.5 m^3 y los otros tres con capacidad de 5.8 m^3 cada uno. En los estanques más pequeños se colocó una jaula de un metro de ancho por dos de largo y un metro de profundidad, en los estanques más grandes se colocó dos jaulas por estanque, de las mismas dimensiones. En cada jaula se colocaron 10 organismos, repartidos en 30 organismos por tratamiento. Se mantuvieron en aclimatación en estos estanques durante dos meses. Todos los días se revisaron las variables físicas y químicas del agua con una sonda multiparamétrica (YSI Modelo 6820V2, USA). La alimentación de los peces se realizó *ad libitum* seis veces al día, con alimento comercial de la marca Nutripec, cabe destacar que el alimento suministrado era el recomendado para cada etapa en la que se encontraban las tilapias. Después de los dos meses de aclimatación se realizó la toma de muestra de sangre de los organismos. A estos peces también se les midió la longitud total, longitud patrón y peso total (Figura 15).

Se elaboraron tres tratamientos con tres replicas cada uno:

- Tratamiento “A” los organismos fueron mantenidos en condiciones óptimas de cultivo con una temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Tratamiento “B” los organismos fueron sometidos a un efecto de estrés por la disminución de la temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta llegar a $22 \text{ }^\circ\text{C}$, el tiempo que tardo en cambiar la temperatura de 28 a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ fue de una hora. Después de aplicar el estresor se procedió inmediatamente a tomar la muestra de sangre.
- Tratamiento “C” los organismos fueron sometidos a un efecto de estrés por la disminución de la temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta llegar a $22 \text{ }^\circ\text{C}$, el tiempo que tardo en cambiar la temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C}$ a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ fue de una hora. Después de una hora de aplicar el estresor se procedió inmediatamente a tomar la muestra de sangre (Adams *et al.*, 1993) (Figura 15).

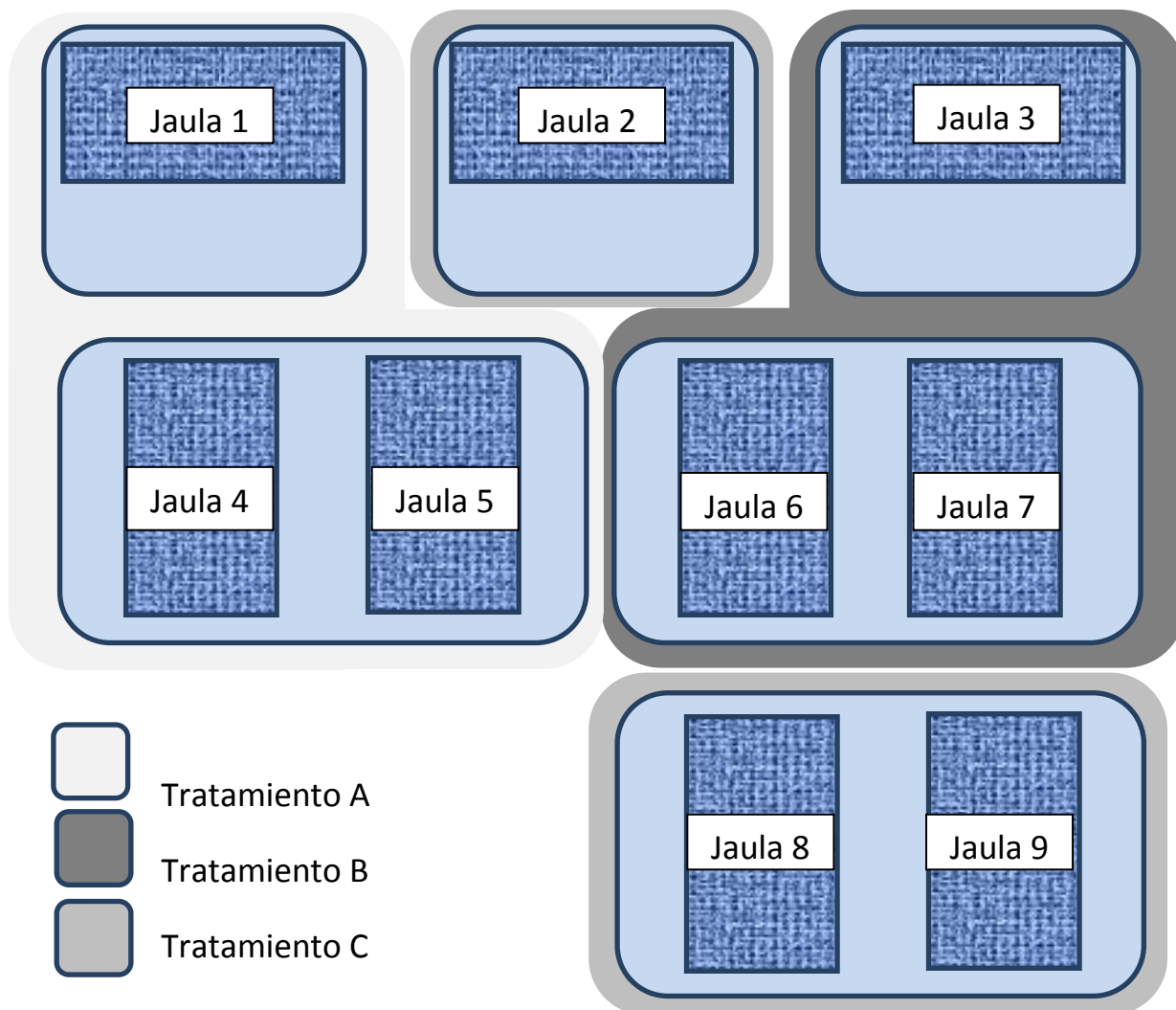


Figura 15. Diagrama del sistema de recirculación y tratamientos utilizados en la prueba de agentes estresantes ambientales: disminución de la temperatura.

Manipulación de los organismos y anestesia

La toma de muestras de sangre y la medición de las variables longitud total, longitud patrón y peso total, se llevó a cabo bajo anestesia para minimizar la influencia del estrés por manipulación durante el muestreo, así como para cumplir con normas éticas para la experimentación con seres vivos (Hrubec y Smith, 2010). Los peces fueron anestesiados por inmersión en un 10% (p/v) de benzocaína (solución de 4-aminobenzoato de etilo). La concentración de esta solución en agua

fue de 1:10,000. Una vez extraída la sangre de los peces, estos se colocaron en recipiente de plástico con agua limpia y oxigenada para su pronta recuperación, y cuando estuvieron totalmente recuperados fueron asignados a otros estanques (Campos-Mendoza, 2004).

Procedimiento para la toma de muestra de sangre

La toma de muestras de sangre se realizó a través de punción de la vena caudal con jeringas estériles de insulina (1 mL) y agujas 23 G impregnadas con heparina, el cual es un anticoagulante (4-mg/mL). De cada organismo se obtuvo 1 mL de sangre y en el lugar que se realizó la punción se le colocó azul de metileno con una torunda. Inmediatamente después del muestreo, la aguja se retiró de la jeringa, seguidamente, las muestras de sangre se depositaron en microtubos eppendorf que contenían heparina para 1 mL de sangre y se colocaron en hielo hasta que se completó el muestreo (Campos-Mendoza, 2004).

10.1.4.2. Trabajo de laboratorio

Indicadores metabólicos de respuesta secundaria

Los análisis de las muestras de sangre incluyeron:

Velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSE):

Un tubo de microhematocrito se llenó hasta una altura de 50 mm y se selló uno de los extremos colocándose en posición vertical por una hora a temperatura ambiente. Con papel milimétrico se determinó el descenso de los eritrocitos en la columna de sangre. El resultado se expresó como VSE en mm/hora (Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011).

Hemoglobina (Hb):

Para ésta prueba se utilizó el reactivo de Drabkin y se siguió el método de la cianometahemoglobina. Un tubo de ensayo se llenó con 1.5 mL del reactivo de Drabkin y con seis microlitros de sangre, se mezcló y se dejó reposar durante 10 minutos. Después la muestra se centrifugó durante 5 minutos y posteriormente se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 546 nm. El resultado de la concentración

de hemoglobina se expresó en g/L (Valenzuela *et al.*, 2002; Correa-Negrete *et al.*, 2009; Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011).

Recuento de eritrocitos (RGR) y leucocitos (RGB):

Para la evaluación de este parámetro se utilizó la solución de Natt y Herricks, una pipeta hematológica de toma calibrada, la cámara de Neubauer y el microscopio.

Lo primero que se realizó fue tomar 5 microlitros de sangre con la pipeta de toma, después tomar de la solución de Natt y Herricks hasta llegar a una dilución 1:200 de sangre-solución. Posteriormente se mezcló durante un minuto y se depositó una gota en uno de los compartimientos de la cámara de Neubauer, extendiéndose por capilaridad entre la cámara y el cubreobjetos, se dejó reposar durante tres minutos y se observó en el microscopio (Conroy, 1998). El recuento de eritrocitos se realizó en el cuadro central de la cámara (solo se contaron cinco cuadros, los cuadros de las esquinas y el cuadro central). El recuento de los leucocitos se realizó en los cuatro cuadros grandes de la cámara (Buenaño, 2010; Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011). El número de eritrocitos se expresó en células por $10^{12}/L$ y el número de leucocitos se expresó en células por $10^9/L$ (Buenaño, 2010).

Hematocrito (Hcto):

Un tubo de microhematocrito se llenó con sangre hasta una altura de cinco centímetros. Para evitar burbujas de aire se selló uno de los extremos del tubo, se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos. La lectura se realizó utilizando una regla milimétrica, el resultado se expresó en L/L (Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011).

Volumen globular medio (VGM):

Para obtener este parámetro se realizó la siguiente fórmula (Buenaño, 2010; Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011):

$$VGM (fL) = \frac{Hcto (L/L) \times 1000}{RGR}$$

$$RGR (células \times 10^{12}/L)$$

Concentración globular media de hemoglobina (CGMH):

Para obtener este parámetro se realizó la siguiente fórmula (Buenaño, 2010):

$$CGMH (g/L) = \frac{Hb (g/L) \times 100}{Hcto (L/L)}$$

El análisis de la morfología leucocitaria y eritrocitaria se realizó con base a frotis sanguíneos delgados, secados en el aire, fijados en metanol y teñidos por la técnica estándar de Diff-Quick (Conroy y Conroy, 2007). Los frotis fueron observados con lente de 100 x y aceite de inmersión. Cada campo se visualizó siguiendo un patrón estándar de zigzag, identificando diferentes tipos de glóbulos blancos y trombocitos hasta llegar a 200 células. Cada tipo de leucocito y trombocito se expresó en número de células por $10^9/L$ y se les tomaron fotos. Para cada organismo se observaron dos laminillas para obtener un promedio. Cada tipo de célula observada en el microscopio fue medida tanto en el ancho y largo del citoplasma como el del núcleo, usando el programa INFINITY ANALYZE (Buenaño, 2010).

Con el recuento diferencial de los neutrófilos y los linfocitos se obtuvo el índice de N/L (neutrófilos/linfocitos), el cual es un indicador secundario de la respuesta de estrés en los vertebrados. Los cambios provocados en los organismos son el aumento en el número de neutrófilos (neutrofilia) y la disminución en el número de linfocitos (linfopenia). Los números de neutrófilos y linfocitos se ven afectados por el estrés en direcciones opuestas, los organismos que presentan estrés van a tener alterado éste índice, presentando valores más altos. Un índice de N/L alto se relaciona con un sistema inmunológico deprimido (Davis *et al.*, 2008).

Indicadores de respuesta terciaria

El factor de condición de Fulton (Adams *et al.*, 1993) se registró también, donde:

$$K = 100 * (\text{peso de los organismos}/\text{longitud patrón}^3)$$

10.1.4.2. Análisis de datos

Los datos fueron analizados con la prueba de Shapiro-Wilk W, para ver si presentaron una distribución normal. Para evaluar las diferencias entre los grupos Se utilizó el análisis de varianza (ANDEVA) usando el programa JMP, versión 6.0., con un nivel de significancia del 0.05. Los valores obtenidos de cada uno de los tratamientos se expresaron con la media \pm error estándar. Además se midió el diámetro del citoplasma y núcleo de cinco células de cada tipo identificado por organismo, para analizar si hay diferencias en el tamaño de las células, debido a, el efecto de la disminución de la temperatura del agua donde se encontraron las tilapias.

10.1.5. Resultados

Las muestras se obtuvieron a partir de 90 organismos de *O. niloticus*, con tres tratamientos.

Los valores de los parámetros físicos y químicos del agua donde fueron cultivadas las tilapias se muestran en el cuadro 15.

Cuadro 15. Parámetros físicos y químicos del agua, promedio y error estándar.

PARÁMETRO	UNIDAD ACUÍCOLA DE MORELIA
Temperatura (°C)	27.41 \pm 0.11
Presión (mmHg)	608.92 \pm 0.19
Saturación de Oxígeno (%)	99.31 \pm 0.77
Oxígeno disuelto (mg/L)	5.87 \pm 0.04
Total de sólidos disueltos (TDS)	578.40 \pm 1.89
NH₄⁺-N (mg/L)	0.68 \pm 0.01
NH₃-N (mg/L)	0.17 \pm 0.04
Conductividad (C-us/cm)	931.47 \pm 4.06
pH	8.45 \pm 0.10
Salinidad	0.43 \pm 0.01

No se encontraron diferencias significativas en el peso y longitud patrón de los organismos entre tratamientos ($p > 0.05$) (Figura 16).

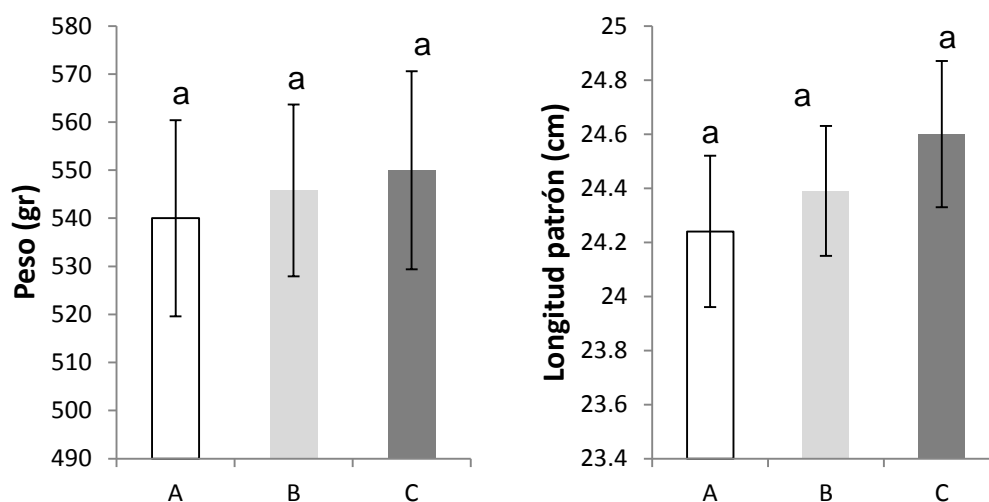


Figura 16. Peso y longitud patrón de los organismos de tres tratamientos: Tratamiento A (A), tratamiento B (B) y tratamiento C (C). Letras diferentes indican diferencias significativas.

Indicadores metabólicos de respuesta secundaria

Los parámetros hematológicos: hematocrito ($p = 0.008$), hemoglobina ($p = 0.006$), recuento de glóbulos rojos ($p = 0.004$), recuento de glóbulos blancos ($p = 0.0001$), velocidad globular media ($p = 0.001$), policromatocito ($p = 0.0001$), monocito ($p = 0.0001$), linfocito menor de $10 \mu\text{m}$ ($p = 0.0001$), linfocito menor de $10 \mu\text{m}$ con pseudópodos ($p = 0.0001$) e índice neutrófilos/linfocitos ($p = 0.0001$) presentaron diferencias significativas (Figuras 17 y 18).

En el parámetro hematológico neutrófilo mielocito se observó un aumento en el tratamiento C a diferencia del tratamiento A, sin embargo no hay diferencias significativas ($p = 0.059$) (Figura 18).

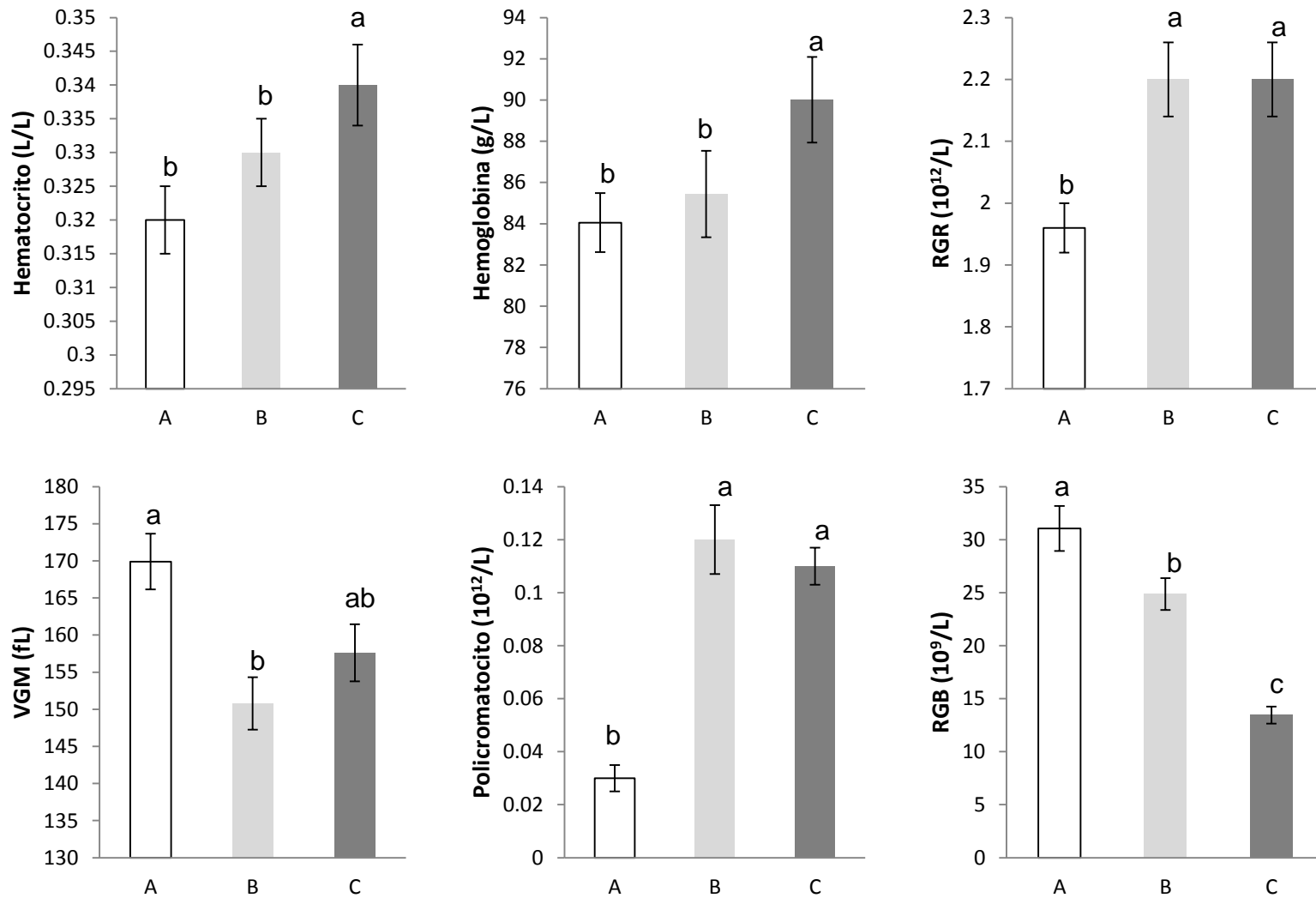


Figura 17. Parámetros hematológicos de los organismos de tres tratamientos: Tratamiento A (A), tratamiento B (B) y tratamiento C (C). Letras diferentes indican diferencias significativas.

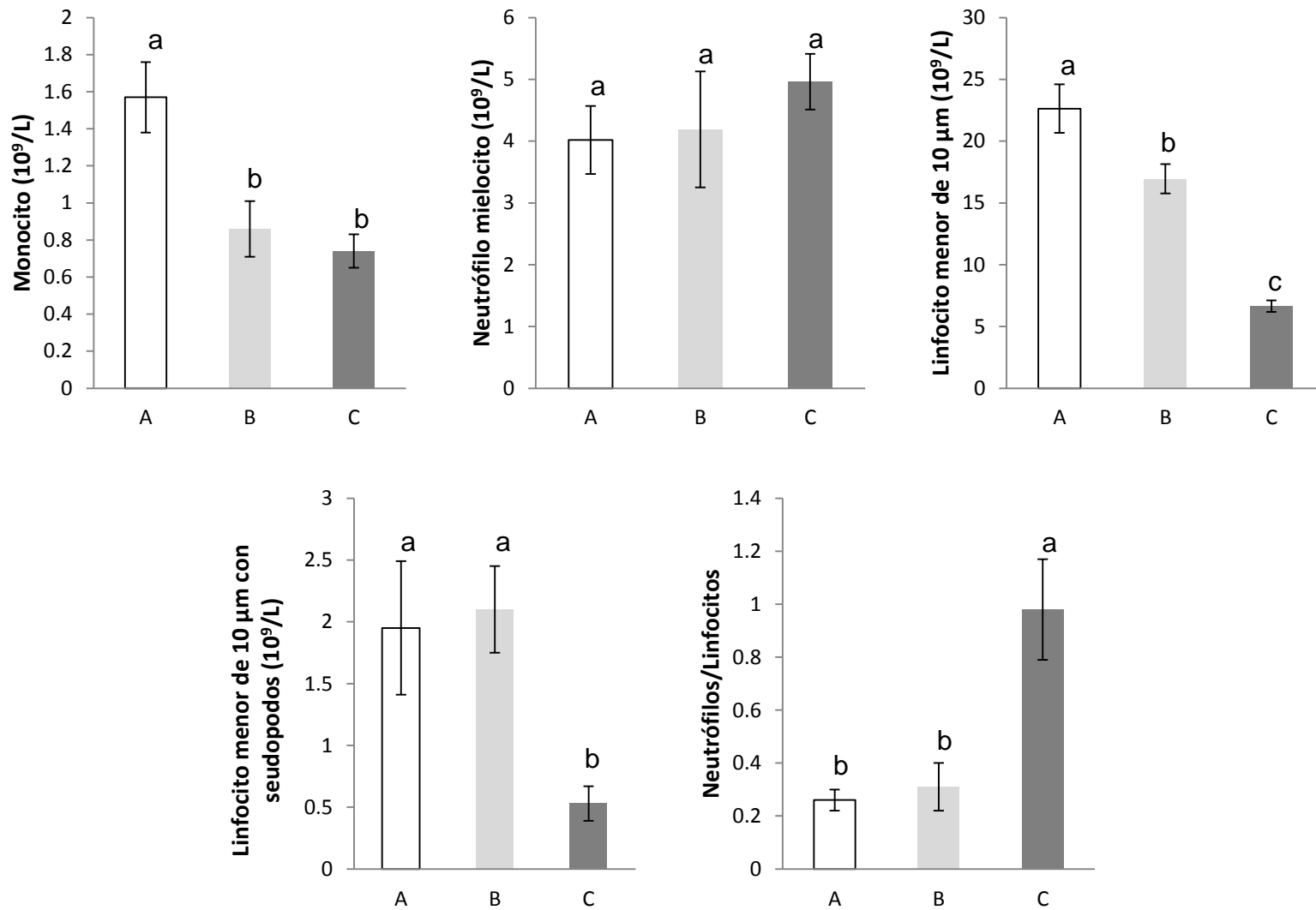


Figura 18. Parámetros hematológicos de los organismos de tres tratamientos: Tratamiento A (A), tratamiento B (B) y tratamiento C (C). Letras diferentes indican diferencias significativas.

No hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los distintos tratamientos en los parámetros hematológicos velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSE), concentración globular media de hemoglobina (CGMH), núcleo segmentado del eritrocito, neutrófilo metamielocito, juvenil, adulto, trombocito maduro e inmaduro (Anexo 6).

Indicadores de respuesta terciaria

No hay diferencias significativas en el factor de condición de Fulton ($p = 0.098$) (Figura 19).

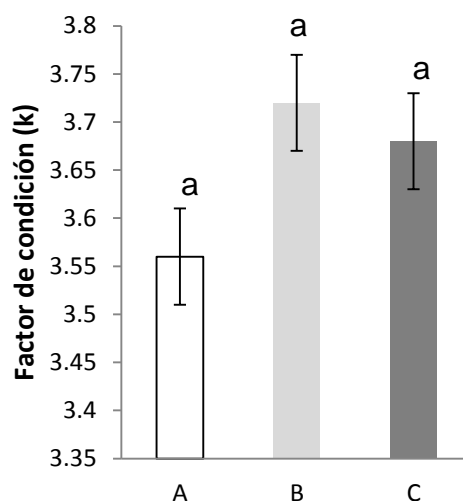


Figura 19. Factor de Condición de Fulton. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Tamaño de las células, entre los diferentes tratamientos

No hay diferencias significativas en el tamaño de las células entre los diferentes tratamientos ($p > 0.05$) (Figura 20) y (Anexo 7).

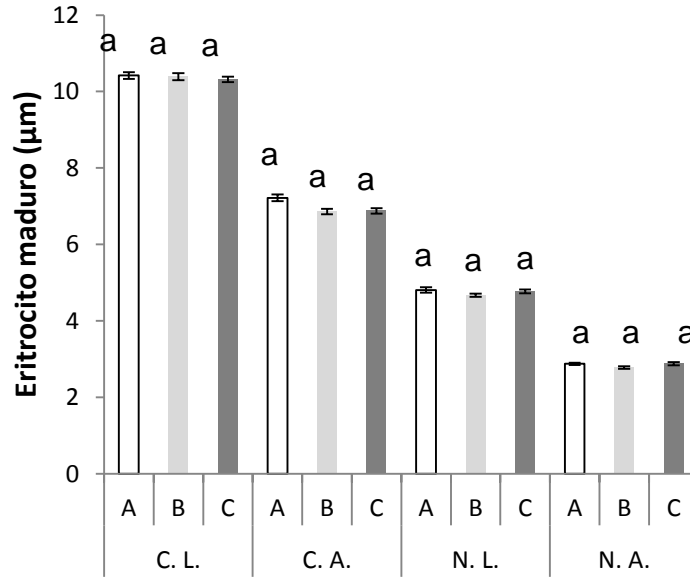


Figura 20. Tamaño de la célula Eritrocito Maduro, medidas: citoplasma largo (C.L.), citoplasma ancho (C.A.), núcleo largo (N.L.) y núcleo ancho (N.A.), entre tratamientos: tratamiento (A), tratamiento (B) y tratamiento (C). Letras diferentes indican diferencias significativas.

10.1.6. Discusión

Los resultados de la presente investigación muestran el efecto de la disminución de la temperatura de 28 °C a 22 °C en una hora en los parámetros hematológicos de *O. niloticus*. Las variables hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos y policromatocitos fueron significativamente más elevados en el tratamiento C, cuando se tomó la muestra de sangre una hora después de que se aplicó el estresor. Resultados similares se observaron en el pez *Barbus balcanicus* cuando fue sometido a un aumento de la temperatura de 19 °C a 29 °C en una hora, los valores de hematocrito y VGM se elevaron significativamente a diferencia de los peces control, también se observaron aumentos en los parámetros hemoglobina y recuento de glóbulos rojos, pero estos no fueron diferentes significativamente entre peces sometidos y no sometidos al aumento de la temperatura (Radoslav *et al.*, 2013).

En un estudio donde se sometió al pez plano (*Scophthalmus maximus*) al descenso de la temperatura de 18 C° a 13, 8, 5, 3 y 1 °C en un periodo de nueve

horas, se observó que a partir de la temperatura de 5 °C se encontraron diferencias significativas en las variables hematocrito, hemoglobina y recuento de glóbulos rojos, estas variables presentaron una disminución a medida que descendió la temperatura (Ji *et al.*, 2015). Resultados similares a los encontrados en *S. maximus* se observaron en el pez *Shizothorax richardsonii* cuando se sometió a la disminución de la temperatura de 20 °C a 5 °C durante 96 horas, cada 24 horas realizaban tomas de muestra de sangre para ver cómo se comportaban los parámetros hematológicos, lo que encontraron es una disminución significativa del hematocrito, hemoglobina y recuento de glóbulos rojos a partir de las 24 horas de exposición a la temperatura de 5 °C (Tyagi *et al.*, 2013).

La misma tendencia se observó en el pez *Epinephelus akaara* cuando fue sometido a temperaturas elevadas de 15 °C a 20 y 25 °C, no se encontraron diferencias significativas en estos mismos parámetros a los dos días después de aplicar el estresor, solo encontraron diferencias significativas a partir del séptimo día y solo en la variable hematocrito, en el cual se observó una disminución (Cho *et al.*, 2015).

El pez *Channa punctatus* fue sometido a diferentes temperaturas 15, 20, 25, 30, 35 y 40 °C, la temperatura control fue de 26 °C, durante 96 horas, cada 24 horas se tomaba una muestra de sangre, dentro de los resultados se observaron que la hemoglobina disminuye significativamente cuando disminuye la temperatura y aumenta cuando aumenta la temperatura, se mantiene esta tendencia durante las 96 horas. En el parámetro recuento de glóbulos rojos se observó lo mismo, disminuye y aumenta dependiendo de si la temperatura también disminuye o aumenta (Jagtap, 2012; Jagtap *et al.*, 2013). Cuando disminuye la temperatura, el metabolismo se suprime, lo que resulta en un conteo de glóbulos rojos reducidos y concentración de Hemoglobina. Sin embargo ante un aumento en la temperatura, se observa un aumento en estas variables ya que hay una disminución de oxígeno disuelto en el agua, por lo que el organismo necesita compensar esa falta de oxígeno (Cho *et al.* (2015).

En un estudio se sometió a la tilapia *Oreochromis mossambicus* a diferentes temperaturas tales como 20, 25, 30, 35 y 40 °C durante 96 horas, la temperatura de 28 °C fue el control, cada 24 horas se tomaba una muestra de sangre. Los organismos que fueron expuestos a la temperatura de 20 °C siempre tuvieron el recuento de glóbulos rojos significativamente menor que el grupo control durante las 96 horas, a las 24 y 48 horas se observaron un mayor recuento de glóbulos rojos en las temperaturas de 35 y 40 °C, a partir de las 72 horas en éstas mismas temperaturas, en los organismos se observaron significativamente un descenso del recuento de glóbulos rojos a diferencia de los organismos expuestos a la temperatura control. El recuento de glóbulos blancos en los organismos sometidos a temperatura de 20, 35 y 40 °C siempre se mantuvo en valores significativamente más bajos que el grupo control (Mali y Chavan, 2014). Resultados similares se observaron en la presente investigación las tilapias *O. niloticus* expuestas a la disminución de la temperatura mostraron una disminución significativa en el recuento de glóbulos blancos a diferencia de las tilapias que no fueron expuestas a la disminución de la temperatura.

En el presente trabajo las diferencias observadas en los parámetros hematológicos son consecuencia del estrés agudo, el cual ocurre rápidamente como respuesta a perturbaciones a corto plazo en este caso la disminución de la temperatura en una hora. Se espera para el estrés agudo que se presente un aumento del hematocrito, hemoglobina y recuento de glóbulos rojos debido a las catecolaminas que estimulan la liberación rápida de los glóbulos rojos del bazo en el torrente sanguíneo y también causan hinchazón de los eritrocitos (Martínez-Porchas *et al.*, 2009), además se espera la disminución de los glóbulos blancos debido a la presencia elevada de cortisol en el torrente sanguíneo, el cual va a ocasionar un aumento de neutrófilos y una disminución de los linfocitos como se pudo observar en el índice N/L (Davis *et al.*, 2008). El organismo se encuentra en la fase de resistencia ya que responde a la acción del cortisol y las catecolaminas, si se mantiene la situación de estrés y los niveles de cortisol durante un largo período puede llegar a ser letal para los organismos ya que la activación del metabolismo interfiere con los demás procesos fisiológicos. El sistema inmunológico está inmunosuprimido lo que

puede ocasionar que el organismo no este en las mejores condiciones para contener una infección (Barandica y Tort, 2008).

El factor de condición de Fulton no mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, esto era de esperar, debido a que este índice es más usado para medir un estrés crónico (Adams *et al.*, 1993).

10.1.7. Conclusión

La disminución de la temperatura del agua donde se cultivaron los organismos de 28 °C a 22 °C en una hora, causó estrés agudo en los organismos de *O. niloticus*, lo que se refleja en un aumento de hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos, N/L y una disminución en el recuento de glóbulos blancos por parte de los organismos estresados a diferencia de los organismos control. Si se mantiene la situación de estrés durante un largo período puede llegar a ser letal para los organismos.

10.1.8. Literatura Citada

Adams, S. M., A. M. Brown and R. W. Goede. 1993. **A quantitative health assessment index for rapid evaluation of fish condition in the field.** Trans. Am. Fish. Soc., 122: 63-73.

Barandica C. Lilian M. y Luis Tort B. 2008. **Neuroendocrinología e Inmunología de la Respuesta al Estrés en Peces.** Rev. Acad. Colomb. Cienc., 32 (123): 267-284.

Barton, B. A., J. D. Morgan, and M. M. Vijayan. 2002. **Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish.** Chapter 4 in S.M. Adams, editor. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. In press.

Buenaño Martha V. 2010. **Hemograma de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en tres etapas de producción en la cuenca alta de la provincia del Napo, Ecuador.** Bol. Téc. 9, Ser. Zool., 6: 1-14.

- Campos-Mendoza Antonio. 2004. **Regulatory Mechanisms Associated with Egg Production and Egg Activation in *Oreochromis niloticus***. Tesis de Doctorado. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, Scotland U.K. 245 pp.
- Cho h. C., J. E. Kim, H. B. Kim and H. J. Baek. 2015. **Effects of Water Temperature Change on the Hematological Responses and Plasma Cortisol Levels in Growing of Red Spotted Grouper, *Epinephelus akaara***. Dev Reprod., 19 (1): 19–24.
- Conroy, D. A. 1998. **Manual de métodos y técnicas de laboratorio de uso común en la hematología pisciaria**. Departamento de Biología, Microbiología y Bacteriología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Santa. Venezuela. 25p.
- Conroy D. y G. Conroy. 2007. **Atlas Básico de las Células Sanguíneas Normales y Anormales en Tilapias Cultivadas**. Patterson Peddie Consulting Ltd.
- Correa-Negrete J. C., A. A. Garrido-Correa, M. J. Prieto-Guevara, V. J. Atencio-García y S. C. Pardo-Carrasco. 2009. **Caracterización de células sanguíneas y parámetros hematológicos en blanquillo *Sorubim cuspicaudus***. Zootecnia Trop., 27 (4): 393-405.
- Corredor A. S. y M. A. Landines. 2009. **Efecto del ácido ascórbico sobre la respuesta de los peces ante condiciones de estrés**. Rev. Med. Vet. Zoot. 56: 53-66.
- Davis A. K., D. L. Maney and J. C. Maerz. 2008. **The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists**. Functional Ecology, 22: 760-772.
- Docan, A., V. Cristea and L. Dediu. 2013. **Influence of thermal stress on the hematological profile of *Oncorhynchus mykiss* held in different stocking densities in recirculating aquaculture systems**. Lucrari Sttinifice, Seria Zootehnie, 55: 262-272.

- Fast Mark D., Sho Hosoya, Stewart C. Johnson and Luis O. Afonso. 2008. **Cortisol response and immune-related effects of Atlantic Salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short and long term stress.** Fish and Shellfish Immunology 24: 194-204.
- Hahn-Von-Hessberg C. M., A. Grajales-Quintero y A. V. Gutiérrez-Jaramillo. 2011. **Parámetros hematológicos de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1757) con peso entre 250 g y 350 g, en el Centro Experimental Piscícola de la Universidad de Caldas.** Vet. Zootec., 5 (1): 47-61.
- Hrubec T. C. and S. A. Smith. 2010. **Hematology of fishes.** En: Douglas J. W. y K. J. Wardrop (6° Edición). **Veterinary Hematology.** Editorial WILEY-BLACKWELL. USA. pp. 994-1003.
- Jagtap A. R. 2012. **Influence of acute temperature stress on hemoglobin content in snakeheaded fish, *Channa punctatus* Godavari River, Nanded.** International Journal of Biomedical and Advance Research, 3 (11): 823-827.
- Jagtap A. R., R. P. Mali and R. D. Barde. 2013. **Thermoacclimatory variation in the red blood cell indices of freshwater fish, *Channa punctatus* Godavari river, Nanded.** Int. J. of Life Sciences, 1 (1): 17-21.
- Ji L., K. Jiang, M. Liu, B. Wang, L. Han, M. Zhang and L. Wang. 2015. **Low temperature stress on the hematological parameters and *HSP* gene expression in the turbot *Scophthalmus maximus*.** Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 34 (3): 430-440.
- Mali R. P. and P. N. Chavan. 2014. **Temperature Dependent Haematological Alterations of Freshwater Cultivable Fish, *Oreochromis Mossambicus* from Nanded District (Ms) India.** International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology, 3 (11): 71-80.
- Martínez-Porchas Marcel, Luis R. Martínez-Córdova and Rogelio Ramos-Enriquez. 2009. **Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress?** Pan-American Journal of Aquatic Sciences, 4 (2): 158-178.

- Pickering Alan D. 1998. **Stress responses of farmed fish**. En: Black Kenneth D. y Pickering Alan D. **Biology of Farmed Fish**. Sheffield Academic Press Ltd. England. pp. 222-255.
- Radoslav Dekić, Ivanc Aleksandar, Gnjato Rajko, Trbić Goran, Četković Danijela and Lolić Svjetlana. 2013. **Effect of thermal stress of short duration on the red blood cell parameters of *Barbus balcanicus* Kotlik, Tsigenopulos, Rab, Berrebi**. African Journal of Biotechnology, 12(18): 2484-2491.
- Tanck, M. W. T., G. H. R. Booms, E. H. Eding, S. E. Wendelaar and J. Komen. 2000. **Cold shocks: a stressor for common carp**. Journal of Fish Biology, 57: 881–894.
- Tyagi A., S. Ali and A. Barat. 2013. **Impact of exposure of cold temperature on hematological parameters and plasma electrolytes of cold water fish *Shizothorax richardsonii***. Journal of information, knowledge and research in biomedical engineering, 2 (2): 38-41.
- Valenzuela A., K. Alveal y E. Tarifeño. 2002. **Respuestas hematológicas de truchas (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) a estrés hipoxico agudo: serie roja**. Gayana, 66 (2): 255-261.

11. DISCUSIÓN GENERAL

Los parámetros hematológicos en los peces indican su estado fisiológico, que a su vez sirve para evaluar el control de enfermedades infecciosas, desbalance nutricional, efectos tóxicos, condiciones anóxicas y cambios ambientales (Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011), debido a esto, las técnicas hematológicas se convierten en una herramienta diagnóstica que permiten conocer el estado de salud de los peces. Pero antes de que los parámetros hematológicos de una especie sean empleados para evaluar variaciones fisiológicas, deben establecerse los índices de referencia. La tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* es cultivada en todo el mundo, sin embargo, son pocos los reportes acerca de sus parámetros hematológicos de referencia en condiciones de manejo propias de cada explotación. En el presente estudio se determinaron los parámetros hematológicos de referencia de *O. niloticus*, al compararlos con lo reportado en la literatura para esta misma especie, en otros países (Hrubec *et al.*, 2000; Hahn-Von-Hessberg *et al.*, 2011), se encontraron resultados similares, sin embargo, los intervalos obtenidos para los parámetros hematológicos en nuestra investigación son más homogéneos y presentan una menor amplitud, estas diferencias podrían estar dadas por el tamaño de muestra, por lo que, este es clave en los resultados observados en los diversos trabajos. Una de las dificultades en la determinación del estado de salud de una población de peces, es la falta de referencias confiables de la condición normal de salud. Para una mayor confiabilidad, deben analizarse un mínimo de 120 muestras para establecer los intervalos de referencia. En general, entre más animales se muestrean es más probable que los intervalos de referencia verdaderamente reflejen el intervalo de valores que se espera en los animales sanos (Geffre *et al.*, 2009; Kjelgaard-Hansen y Lunderff-Jensen, 2010).

Los parámetros hematológicos de los peces varían, debido a, factores intrínsecos y extrínsecos. Los factores intrínsecos son la heredabilidad, la edad, el sexo y la madurez sexual, los factores extrínsecos son el estado nutricional, contaminación o efectos tóxicos, factores ambientales, el estrés causado por la captura, manipulación y procedimientos de muestreo (Kefas *et al.*, 2015). La

presente investigación no evidenció diferencias en los parámetros hematológicos de *O. niloticus* debido al género de los organismos, no hay diferencias significativas en los parámetros hematológicos, RGR, hematocrito, hemoglobina, VGM, CGMH entre machos y hembras, sin embargo, estos parámetros fueron más elevados en los machos que en las hembras, resultados similares se reportan en la literatura (Ezzat *et al.*, 1974; Bastardo *et al.*, 1992; Gabriel *et al.*, 2004; Correa-Negrete *et al.*, 2009; Ejraei *et al.*, 2015). En general los machos presentan una mayor actividad metabólica, lo que ocasiona que su consumo de oxígeno sea mayor al de las hembras (Docan *et al.*, 2014).

En los mamíferos se ha reportado que la altitud es un factor que también influye en los parámetros hematológicos, provocando aumento del número de eritrocitos y de los niveles de hemoglobina (Ruiz *et al.*, 1987; Storz, 2007; Lu *et al.*, 2015). Esto planteaba la problemática de si los parámetros hematológicos de referencia ya establecidos en otros países para la especie *O. niloticus* se podrían utilizar en las condiciones propias de Michoacán. Por lo que, en la presente investigación se determinó si la altitud influye en los parámetros hematológicos. En los resultados no se encontraron diferencias significativas en las variables hematocrito y recuento de glóbulos rojos a diferentes altitudes. La diferencia en encontrar aumentos en las variables hemoglobina y recuento de glóbulos rojos en mamíferos a altitudes altas a diferencia de los peces, radica en que, ellos respiran aire y mantienen un metabolismo oxidativo basal que requiere un suministro continuo de oxígeno, mientras los peces no tienen esta necesidad específica de oxígeno y algunas especies pueden extraer suficiente oxígeno de un ambiente acuoso (Burton, 1969). El encontrar diferencias en los peces en estos parámetros va a depender de las condiciones propias del cultivo donde se encuentren.

El presente estudio confirmó que los parámetros hematológicos son indicadores sensibles de la respuesta secundaria de *O. niloticus* al estrés. De acuerdo a los resultados los parámetros hematológicos no muestran cambios inmediatamente después de someter a los organismos a estresores, sino, después de una hora e incluso hasta más tiempo, esto es importante tomarlo en cuenta para

nuevos experimentos o para cuando se utilice el índice hematológico como una herramienta diagnóstica. Las diferencias observadas en los parámetros hematológicos de los organismos sometidos a la disminución de la temperatura de 28 °C a 22 °C en una hora, son consecuencia del estrés agudo, el cual se puede observar en un aumento del hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos, índice N/L y en la disminución de los glóbulos blancos.

12. CONCLUSIONES GENERALES

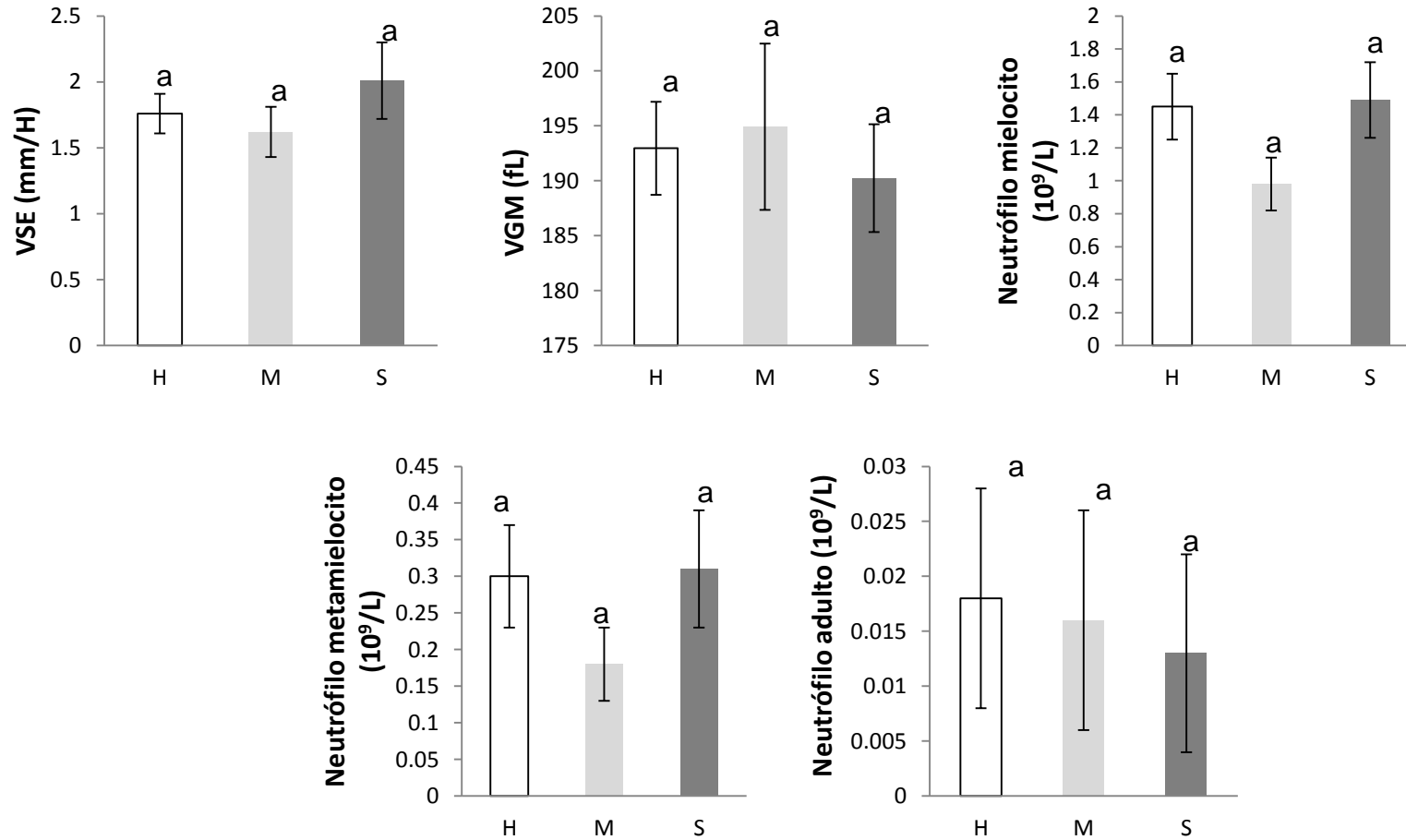
- Los parámetros hematológicos son buenos indicadores de cambios originados por estrés agudo en *Oreochromis niloticus*.
- Los parámetros hematológicos de referencia obtenidos en esta investigación, pueden ser empleados como una herramienta diagnóstica para evaluar el estado de salud de la especie *Oreochromis niloticus*, indistintamente del sexo y de la altitud donde se encuentran los organismos.

13. LITERATURA CITADA

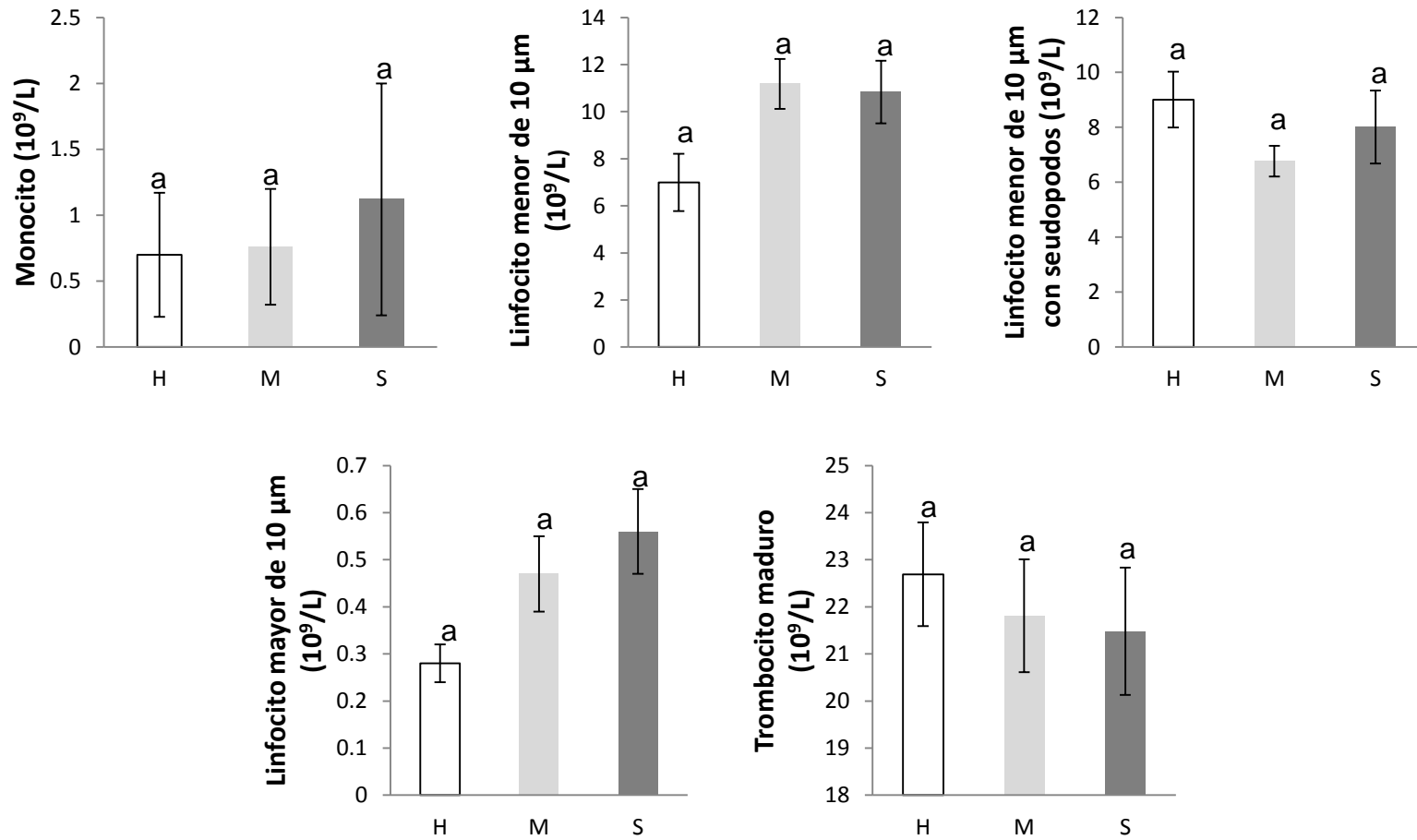
- Bastardo Hilda R., Zaida J. Coché, Pedro J. Salinas e Isbelia Hernández. 1992. **Determinaciones hematológicas en trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, en Mérida, Venezuela.** Veterinaria Tropical, 17: 31-39.
- Burton R. R. 1969. **Comparative hematology of high-altitude poikilotherms (fish) and homeotherms (chickens).** In: Natural History of the White-Inyo Range, Eastern California and Western Nevada and High Altitude Physiology, edited by Hall CA, Jr. And Young DJ. Bishop: White Mountain Research Station: 193-202.
- Correa-Negrete J. C., A. A. Garrido-Correa, M. J. Prieto-Guevara, V. J. Atencio-García y S. C. Pardo-Carrasco. 2009. **Caracterización de células sanguíneas y parámetros hematológicos en blanquillo *Sorubim cuspicaudus*.** Zootecnia Trop., 27 (4): 393-405.
- Docan A., L. Dediu, L. Grecu, V. Cristea and M. Maoreanu. 2014. **Hematological profiles of mature *Acipenser stellatus* from Danube River during spring season.** Lucrări Științifice - Seria Zootehnie, (62).
- Ejraei F., M. Ghiasi and K. Hossein. 2015. **Evaluation of hematological and plasma indices in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, with reference to age, sex, and hormonal treatment.** Arch. Pol. Fish., 23: 163-170.
- Ezzat A. A., M . B. Shaban and A. M. Farghaly. 1974. **Studies on the blood characteristics of *Tilapia zifli* (Gervais) I. Blood cells.** J. Fish Bid., 6: 1-12.
- Gabriel U.U., G. N. O. Ezeri and O. O. Opabunmi. 2004. **Influence of sex, source, health status and acclimation on the haematology of *Clarias gariepinus* (Burch,1822).** African Journal of Biotechnology, 3 (9): 463-467.
- Geffre A, K. Friedrichs, K. Harr, D. Concordet, C. Trumel and J. P. Braun. 2009. **Reference values: a review.** Veterinary Clinical Pathology, 38(3): 288–298.

- Hahn-Von-Hessberg C. M., A. Grajales-Quintero y A. V. Gutiérrez-Jaramillo. 2011. **Parámetros hematológicos de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1757) con peso entre 250 g y 350 g, en el Centro Experimental Piscícola de la Universidad de Caldas.** Vet. Zootec., 5 (1): 47-61.
- Hrubec T. C., J. L. Cardinale and S. A. Smith. 2000. **Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*).** Veterinary Clinical Pathology, 29 (1): 7-12.
- Kefas M., K. Abubakar and A. Ja'afaru. 2015. **Haematological indices of tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Lake Geriyo, Yola, Adamawa State, Nigeria.** International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 3 (1): 09-14.
- Kjelgaard-Hansen Mads and Asger Lundorff-Jensen. 2010. **Reference Intervals.** En: Douglas J. W. y K. J. Wardrop (6° Edition). **Veterinary Hematology.** Editorial WILEY-BLACKWELL. USA. pp. 1034-1038.
- Lu Songsong, Ying Xin, Xiaolong Tang, Feng Yue, Huihui Wang, Yucheng Bai, Yonggang Niu and Qiang Chen. 2015. **Differences in Hematological Traits between High and Low Altitude Lizards (Genus Phrynocephalus).** PLoS ONE, 10 (5): 1-16.
- Ruiz Gricelda, Mario Rosenmann y Alberto Veloso. 1987. **Valores hematológicos y distribution altitudinal de anfibios chilenos.** Arch. Biol. Med. Exp., 20: 79-84.
- Storz Jay F. 2007. **Hemoglobin function and physiological adaptation to hypoxia in high-altitude mammals.** Journal of Mammalogy, 88 (1): 24–31.

14. ANEXOS



Anexo 1. Parámetros hematológicos de tres tratamientos: Hembras (H), Machos (M) y Supermachos (S). Letras diferentes indican diferencias significativas.



Anexo 2. Parámetros hematológicos de tres tratamientos: Hembras (H), Machos (M) y Supermachos (S). Letras diferentes indican diferencias significativas.

IVETTE MARAI VILLA VILLASEÑOR

Anexo 3. Cuadro de los promedios \pm error estándar del tamaño de las células (μm), de hembras, machos de la línea Stirling y Supermachos. Letras diferentes indican diferencias significativas.

CÉLULA/TRATA MIENTO	MEDIDA DE LA CÉLULA	HEMBRAS STIRLING	MACHOS STIRLING	SUPERMACHOS
Trombocito Inmaduro	Citoplasma Largo	6.29 \pm 0.14 ^a	6.18 \pm 0.08 ^a	6.08 \pm 0.11 ^a
	Citoplasma Ancho	5.41 \pm 0.10 ^a	5.33 \pm 0.07 ^a	5.24 \pm 0.52 ^a
	Núcleo Largo	4.96 \pm 0.10 ^a	4.86 \pm 0.10 ^a	4.81 \pm 0.12 ^a
	Núcleo Ancho	4.21 \pm 0.60 ^a	4.12 \pm 0.38 ^a	4.16 \pm 0.36 ^a
Linfocito menor de 10 μm	Citoplasma Largo	8.47 \pm 0.10 ^a	8.48 \pm 0.08 ^a	8.32 \pm 0.12 ^a
	Citoplasma Ancho	6.49 \pm 0.08 ^{ab}	6.72 \pm 0.09 ^a	6.37 \pm 0.09 ^b
	Núcleo Largo	6.64 \pm 0.10 ^a	6.85 \pm 0.09 ^a	6.82 \pm 0.11 ^a
	Núcleo Ancho	4.98 \pm 0.07 ^a	5.09 \pm 0.09	4.94 \pm 0.09
Linfocito mayor de 10 μm	Citoplasma Largo	12.23 \pm 0.41 ^a	11.59 \pm 0.32 ^a	12.01 \pm 0.26 ^a
	Citoplasma Ancho	8.02 \pm 0.79 ^a	7.24 \pm 0.43 ^a	7.49 \pm 0.42 ^a
	Núcleo Largo	8.68 \pm 0.26 ^a	8.75 \pm 0.40 ^a	8.67 \pm 0.30 ^a
	Núcleo Ancho	5.40 \pm 0.39 ^a	5.36 \pm 0.39 ^a	5.17 \pm 0.23 ^a
Neutrófilo Mielocito	Citoplasma Largo	15.37 \pm 0.25 ^{ab}	14.72 \pm 0.21 ^b	15.69 \pm 0.36 ^a
	Citoplasma Ancho	10.88 \pm 0.19 ^a	10.63 \pm 0.23 ^a	10.93 \pm 0.23 ^a
	Núcleo Largo	7.79 \pm 0.14 ^a	7.85 \pm 0.18 ^a	7.90 \pm 0.25 ^a
	Núcleo Ancho	5.12 \pm 0.12 ^a	5.09 \pm 0.10 ^a	5.24 \pm 0.17 ^a
Neutrófilo Metamielocito	Citoplasma Largo	15.43 \pm 0.55 ^a	14.78 \pm 0.31 ^a	15.84 \pm 0.52 ^a
	Citoplasma	10.90 \pm 0.25 ^a	11.77 \pm 0.34 ^a	10.68 \pm 0.22 ^a

IVETTE MARAI VILLA VILLASEÑOR

	Ancho			
	Núcleo Largo	7.61±0.27 ^a	7.66±0.16 ^a	7.88±0.25 ^a
	Núcleo Ancho	5.22±0.16 ^a	5.30±0.16 ^a	5.16±0.18 ^a
Neutrófilo Adulto	Citoplasma Largo	14.21±1.71 ^a	16.18±0.31 ^a	18.23±3.64 ^a
	Citoplasma	10.99±0.91 ^a	12.62±2.93 ^a	15.58±2.33 ^a
	Ancho			
	Núcleo Largo	8.35±0.92 ^a	9.35±0.23 ^a	10.10±3.18 ^a
	Núcleo Ancho	4.50±1.06 ^a	5.92±1.21 ^a	5.69±0.80 ^a
Monocito	Citoplasma Largo	14.92±0.24 ^a	14.27±0.42 ^a	15.26±0.29 ^a
	Citoplasma	10.59±0.19 ^a	11.12±0.34 ^a	10.87±0.30 ^a
	Ancho			
	Núcleo Largo	9.44±0.15 ^a	8.77±0.21 ^b	9.77±0.23 ^a
	Núcleo Ancho	6.28±0.09 ^a	6.42±0.20	6.24±0.20 ^a

Anexo 4. Cuadro de las variaciones en los parámetros hematológicos causados por diferentes altitudes. Letras diferentes indican diferencias significativas.

PARÁMETRO HEMATOLÓGICO	ALTITUD 27 msnm	ALTITUD 553 msnm	ALTITUD 912 msnm	ALTITUD 1920 msnm
Hemoglobina	101.11±2.04 ^a	92.41±2.40 ^{bc}	99.94±2.34 ^a	90.34±1.23 ^c
VGM	190.39±6.83 ^a	190.76±5.26 ^a	190.48±4.55 ^a	176.06±3.52 ^a
CGMH	293.95±3.79 ^a	268.94±4.63 ^b	285.61±5.08 ^a	262.14±3.10 ^b
Citoplasma abombado del Eritrocito	0.007±0.001 ^b	00.021±0.005 ^a	0.006±0.001 ^b	0.002±0.0006 ^b
Hipocromía	0.001±0.0007 ^{ab}	0.003±0.001 ^{ab}	0.004±0.001 ^a	0.0003±0.0001 ^b
Neutrófilo Mielocito	1.91±0.19 ^a	1.75±0.36 ^a	1.47±0.24 ^a	1.91±0.28 ^a
Neutrófilo Metamielocito	0.27±0.07 ^{ab}	0.09±0.04 ^b	0.06±0.03 ^b	0.41±0.09 ^a
Neutrófilo Juvenil	0.13±0.05 ^a	0.05±0.04 ^a	0.01±0.01 ^a	0.03±0.02 ^a

IVETTE MARAI VILLA VILLASEÑOR

Neutrófilo Adulto	0.16±0.05 ^a	0.00±0.00 ^b	0.01±0.01 ^b	0.05±0.02 ^{ab}
Linfocito Mayor de 10 µm	0.11±0.0 ^a	0.14±0.05 ^a	0.44±0.19 ^a	0.53±0.13 ^a

Anexo 5. Cuadro de los promedios ± error estándar del tamaño de las células (µm), a diferentes altitudes. Letras diferentes indican diferencias significativas.

CÉLULA/TR ATAMIENTO	MEDIDA DE LA CÉLULA	ALTITUD 27 msnm	ALTITUD 553 msnm	ALTITUD 912 msnm	ALTITUD 1920 msnm
Eritrocito Inmaduro	Citoplasma	8.08±0.19 ^{bc}	8.52±0.10 ^{ab}	8.68±0.10 ^a	7.75±0.08 ^c
	Largo				
	Citoplasma	6.22±0.17 ^{bc}	6.58±0.10 ^{ab}	6.94±0.11 ^a	6.13±0.05 ^c
	Ancho				
	Núcleo	4.45±0.08 ^c	5.54±0.10 ^a	4.97±0.05 ^b	5.23±0.08 ^{ab}
	Largo				
Trombocito Inmaduro	Núcleo	3.02±0.10 ^c	4.00±0.08 ^a	3.92±0.06 ^a	3.98±0.05 ^a
	Ancho				
	Citoplasma	5.73±0.08 ^b	6.14±0.13 ^b	6.82±0.13 ^a	6.22±0.20 ^b
	Largo				
	Citoplasma	4.79±0.8 ^c	5.11±0.09 ^{bc}	5.66±0.13 ^a	5.32±0.23 ^{ab}
	Ancho				
Neutrófilo Metamielocit o	Núcleo	4.79±0.06 ^c	5.13±0.08 ^b	5.68±0.10 ^a	4.76±0.13 ^{bc}
	Largo				
	Núcleo	3.89±0.06 ^c	4.30±0.07 ^b	4.76±0.10 ^a	4.16±0.18 ^{bc}
	Ancho				
	Citoplasma	13.88±0.36 ^a	12.99±1.33 ^a	12.53±0.33 ^a	13.92±0.23 ^a
	Largo				
Neutrófilo Metamielocit o	Citoplasma	10.31±0.43 ^a	11.86±1.20 ^a	11.05±0.65 ^a	10.74±0.45 ^a
	Ancho				
	Núcleo	7.10±0.31 ^a	8.13±1.12 ^a	8.87±0.53 ^a	7.93±0.29 ^a
	Largo				

IVETTE MARAI VILLA VILLASEÑOR

Núcleo	5.42±0.18 ^a	5.46±0.50 ^a	6.92±0.71 ^a	5.19±0.16 ^a
Ancho				

Anexo 6. Cuadro de las variaciones en los parámetros hematológicos causados por un estresor. Letras diferentes indican diferencias significativas.

PARÁMETRO HEMATOLÓGICO	TRATAMIENTO A	TRATAMIENTO B	TRATAMIENTO C
VSE	3.74±0.33 ^a	4.58±0.43 ^a	3.42±0.27 ^a
CGMH	254.99±2.30 ^a	261.26±5.47 ^a	263.72±3.40 ^a
Núcleo Seg. del Eritrocito	0.05±0.02 ^a	0.06±0.02 ^a	0.06±0.02 ^a
Neutrófilo	0.63±0.10 ^a	0.54±0.13 ^a	0.38±0.07 ^a
Metamielocito			
Neutrófilo Juvenil	0.04±0.02 ^a	0.01±0.01 ^a	0.03±0.02 ^a
Neutrófilo Adulto	0.04±0.01 ^a	0.01±0.01 ^a	0.02±0.01 ^a
Linfocito Mayor de 10 µm	0.14±0.05 ^a	0.19±0.05 ^a	0.09±0.03 ^a
Trombocito Maduro	36.11±1.65 ^a	33.02±1.29 ^a	33.78±1.51 ^a
Trombocito Inmaduro	2.02±0.26 ^a	1.84±0.20 ^a	1.81±0.32 ^a

Anexo 7. Cuadro de los promedios ± error estándar del tamaño de las células (µm), de los Tratamientos A, B y C. Letras diferentes indican diferencias significativas.

CÉLULA/TRATA MIENTO	MEDIDA DE LA CÉLULA	TRATAMIENTO A	TRATAMIENTO B	TRATAMIENTO C
Eritrocito Inmaduro	Citoplasma Largo	7.99±0.07 ^a	7.93±0.05 ^a	7.96±0.07 ^a
	Citoplasma Ancho	6.16±0.06 ^a	6.18±0.06 ^a	6.12±0.06 ^a
	Núcleo Largo	4.80±0.06 ^a	4.76±0.07 ^a	4.64±0.07 ^a
	Núcleo Ancho	3.60±0.06 ^a	3.56±0.05 ^a	3.46±0.07 ^a

IVETTE MARAI VILLA VILLASEÑOR

Trombocito Maduro	Citoplasma Largo	7.93±0.08 ^a	7.91±0.08 ^a	8.06±0.08 ^a
	Citoplasma Ancho	4.15±0.06 ^a	4.05±0.05 ^a	4.02±0.07 ^a
	Núcleo Largo	6.38±0.07 ^a	6.23±0.07 ^a	6.43±0.08 ^a
	Núcleo Ancho	3.15±0.05 ^a	3.17±0.05 ^a	3.15±0.06 ^a
Trombocito Inmaduro	Citoplasma Largo	6.14±0.08 ^a	6.31±0.08 ^a	6.33±0.09 ^a
	Citoplasma Ancho	5.18±0.08 ^a	5.16±0.07 ^a	5.32±0.10 ^a
	Núcleo Largo	4.77±0.06 ^a	4.99±0.07 ^a	4.92±0.13 ^a
	Núcleo Ancho	4.13±0.60 ^a	4.24±0.06 ^a	4.42±0.10 ^a
Linfocito menor de 10 µm	Citoplasma Largo	8.71±0.09 ^a	8.73±0.09 ^a	8.72±0.10 ^a
	Citoplasma Ancho	6.25±0.07 ^a	6.48±0.10 ^a	6.46±0.11 ^a
	Núcleo Largo	6.67±0.08 ^a	6.76±0.08 ^a	6.61±0.10 ^a
	Núcleo Ancho	4.57±0.06 ^a	4.74±0.07	4.68±0.08
Neutrófilo Mielocito	Citoplasma Largo	14.23±0.16 ^a	14.40±0.14 ^a	14.19±0.13 ^a
	Citoplasma Ancho	11.27±0.19 ^a	11.18±0.17 ^a	11.08±0.12 ^a
	Núcleo Largo	7.56±0.10 ^a	7.63±0.12 ^a	7.60±0.13 ^a
	Núcleo Ancho	5.42±0.07 ^a	5.28±0.10 ^a	5.34±0.07 ^a
Neutrófilo Metamielocito	Citoplasma Largo	13.86±0.24 ^a	14.30±0.26 ^a	14.46±0.35 ^a
	Citoplasma Ancho	11.17±0.26 ^a	11.20±0.27 ^a	11.43±0.33 ^a
	Núcleo Largo	7.46±0.20 ^a	7.49±0.20 ^a	7.68±0.20 ^a
	Núcleo Ancho	5.47±0.11 ^a	5.39±0.14 ^a	5.50±0.22 ^a
Monocito	Citoplasma Largo	15.70±0.21 ^a	15.83±0.30 ^a	15.68±0.31 ^a
	Citoplasma	12.34±0.16 ^a	12.97±0.26 ^a	12.96±0.31 ^a

IVETTE MARAI VILLA VILLASEÑOR

Ancho			
Núcleo Largo	9.55 ± 0.20^a	9.78 ± 0.22^a	9.67 ± 0.23^a
Núcleo Ancho	6.75 ± 0.12^a	6.77 ± 0.15^a	6.73 ± 0.18^a
